

Aus dem Zentrum der Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Klinik für Kinderheilkunde III  
(Direktor: Prof. Dr. T. Klingebiel)

**Inhibitorinzidenz bei erstbehandelten  
Hämophilie A- und B-Patienten -  
Ergebnisse der prospektiven, multizentrischen Studie der  
Gesellschaft für Thrombose und Hämostase (GTH)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der theoretischen Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Silke Kotitschke  
aus Frankfurt/Main

Frankfurt am Main 2003

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Definition, Vorkommen und Ursachen der Hämophilie .....	1
1.2	Die Hämostase .....	2
1.3	Das plasmatische Gerinnungssystem .....	3
1.3.1	Wechselwirkungen des Faktor VIII und IX in der Gerinnungskaskade.....	4
1.4	Molekularbiologie und Genetik der Hämophilie A und B.....	7
1.5	Das FVIII-Protein und seine posttranslationale Modifizierung .....	8
1.6	Die Faktor VIII-Synthese .....	10
1.7	Diagnostik.....	11
1.8	Klinik (Symptome).....	11
1.9	Therapie.....	12
1.9.1	Komplikationen der Behandlung von Hämophiliepatienten mit Faktorenpräparaten .....	15
1.10	FVIII-Inhibitoren.....	16
1.10.1	Klassifizierung von Faktor VIII-Antikörpern .....	16
1.10.2	Mechanismen der FVIII-Inhibition .....	18
1.10.3	Faktoren, die die Inzidenz der Inhibitor-Bildung beeinflussen.....	21
1.10.4	Charakterisierung der Hemmkörper (Epitopemapping) .....	23
1.11	Fragestellung und Studienziel .....	24
<b>2</b>	<b>Patienten und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1	Methoden Studiendesign .....	25
2.1.1	Anamnesebogen .....	25
2.1.2	Patientenkollektiv .....	26
2.2	Studienplan.....	27
2.2.1	Therapeutika und Therapieregime .....	28
2.2.2	Genetische Faktoren .....	28
2.2.3	Studienausschluß- und Studienabbruch-Kriterien.....	29
2.3	Statistische Methoden und verwendete Software .....	29
	Berechnung des Mittelwertes .....	29
	Berechnung des Medians (Zentralwert) .....	29
	Der exakte Test nach Fisher (Fisher's Exact-Test) .....	30

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	31
3.1	Chemikalien, Reagenzien, Apparate und Verbrauchsmaterial.....	31
3.1.1	Verbrauchsmaterial .....	32
3.1.2	Verwendete Testkits .....	32
3.1.3	Verwendete biologische Präparate .....	33
3.1.4	Puffer und Lösungen .....	33
3.1.5	Verwendete Antikörper .....	35
3.2	Methoden.....	36
3.2.1	SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese (4-20%) und anschließende Silberfärbung .....	36
3.2.2	Silberfärbung der Gele .....	37
3.2.3	Immunblot von FVIII-Produkten .....	38
3.2.4	Methode der Hemmkörperbestimmung (Bethesda-Assay) .....	40
3.3	Epitopemapping (Belgien, Leuven).....	42
3.3.1	Translation .....	43
3.3.2	Immunpräzipitation (Patientenproben).....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	46
4.1	Eingeschlossene und behandelte Hämophilie A- und B-Patienten .....	46
4.1.1	Alter zum Zeitpunkt der Erstexposition bei Hämophilie A und B.....	47
4.1.2	Anzahl der Expositionstage bei Nicht-Inhibitorpatienten.....	48
4.2	Inhibitorentwicklung .....	48
4.2.1	Inhibitorentwicklung bei behandelten Hämophilie A- und B-Patienten.....	48
4.2.2	Inhibitorentwicklung in Abhängigkeit von FVIII-Präparaten.....	49
4.2.3	Alter der Erstexposition bei Inhibitor- und Nicht-Inhibitorpatienten.....	51
4.3	Dosierungen des Faktor VIII in der Initialphase der Behandlung bei Patienten mit schwerer Hämophilie A (RA <2%).....	52
4.3.1	FVIII-Dosierung bei High-Respondern.....	53
4.3.2	FVIII-Dosierung bei Low-Respondern (0,6-5 BU).....	54
4.3.3	Dosierung bei Nicht-Inhibitorpatienten (RA < 2%) .....	57
4.4	Mutationen.....	59
4.4.1	Mutationen bei Inhibitorpatienten .....	59
4.4.2	Mutationstypen aller Hämophilie A-Patienten.....	59
4.4.3	Vergleich der Mutationstypen mit anderen Studien.....	61
4.4.4	Verteilung der Mutationen, bezogen auf Präparate .....	63

4.4.5	Mutationstyp und Alter bei erster Exposition .....	63
4.4.6	Mutationstyp und Therapieregime .....	65
4.4.7	Mutationen bei Hämophilie B-Patienten.....	66
4.5	SDS-Page und Immunblot von r- und pdFVIII-Präparaten.....	68
4.6	Densitogramm der SDS-Page und des Immunblots .....	71
4.7	Epitopemapping (Belgien, Leuven).....	76
4.7.1	Mutationstyp, Präparat und Antikörperinzidenz bei Hämophilie A.....	78
4.7.2	Anzahl getesteter Proben und Präparate .....	80
4.7.3	Mutationen, Probenanzahl und Antikörperinzidenz.....	81
4.7.4	Auswertung .....	81
4.8	Epitopspezifität .....	84
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>85</b>
5.1	Immunpräzipitations- und Bethesda-Assay.....	85
5.2	Mutationen als Risikofaktor bei der Hämophilie A .....	86
5.3	Mutationen als Risikofaktor bei der Hämophilie B.....	89
5.4	Niedrige Inhibitorinzidenzrate bei Hämophilie B.....	92
5.5	Inhibitoren bei milder und moderater Hämophilie A.....	93
5.6	Einfluß der FVIII-Dosierung auf die Inhibitorbildung.....	95
5.7	Einfluß des Alters auf die Inhibitorbildung .....	96
5.8	Die produktbezogene Inhibitorinzidenz bei Hämophilie A-Patienten .....	97
5.9	Vergleich der Epidemiologie der Inhibitorentwicklung mit anderen Studien....	99
5.10	Therapieregime bei schwerer Hämophilie A: Bedarf und Prophylaxe .....	102
5.11	Behandlung von Patienten mit Inhibitoren und Immuntoleranz .....	103
5.12	Zusätzliche mögliche beeinflussende Faktoren der Inhibitorentwicklung.....	104
5.12.1	Die Mechanismen, die eine erhöhte Immunogenität in FVIII-Präparaten hervorrufen können .....	105
5.13	Immunologische Aspekte der Inhibitorbildung.....	107
5.14	Ausblick für die Erforschung der Immunantwort gegen Faktor VIII.....	109
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>135</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Definition, Vorkommen und Ursachen der Hämophilie

Die Hämophilie A (HA) und B (HB) ist eine X-chromosomal rezessive Erbkrankheit, der ein Gerinnungsdefekt zugrunde liegt. Die Faktoren VIII bei der HA bzw. Faktor IX bei der HB sind vermindert oder fehlen sogar vollständig infolge einer Mutation.

Die HA ist mit einer Inzidenz von 1:5000–1:10000 der Geburten männlichen Geschlechts deutlich häufiger als die HB mit einer Inzidenz von etwa 1:25000–1:30000. Entsprechend weisen 85% der Patienten eine HA und 15% eine HB auf.

Die Häufigkeit der HA ist durch die hohe Mutationsrate des FVIII-Genes begründet ( $2,7-4,2 \cdot 10^{-5}$ ). Das Hämophilie-Gen wird von der Frau durch eines ihrer X-Chromosomen übertragen, wobei ein 50%-iges Risiko besteht, daß die Krankheit an ihre Kinder weitergegeben wird.

Die meisten Frauen sind asymptotische Konduktorinnen, d.h. sie vererben die Krankheit weiter, ohne selbst zu erkranken. In 30% der Fälle haben sie jedoch eine Blutungsneigung unterschiedlicher Ausprägung.

In 50% der Fälle sind die Mutationen auf dem X-Chromosom durch spontane Mutationen der Eltern- bzw. Großelterngeneration entstanden. 25-40% der Hämophilien entstehen durch Neumutationen ohne Familienanamnese.

Die hohe Spontanmutationsrate zeigt sich auch darin, daß 70% dieser Mutationen nur in einzelnen Stammbäumen zu finden sind (Kazazian et al 1993).

Man unterscheidet zwischen verschiedenen Schweregraden der Hämophilie, abhängig von der Restaktivität des jeweiligen betroffenen Gerinnungsfaktors. Ein gesunder Mensch hat in der Regel 70 bis 120% Aktivität der Blutgerinnungsfaktoren VIII bzw. IX. Eine „schwere“ Hämophilie liegt dann vor, wenn die Restaktivität des betroffenen Gerinnungsfaktors weniger als 1% der Normalfunktion beträgt.

## 1.2 Die Hämostase

Mit dem Mechanismus der Blutungsstillung (Hämostase) schützt sich der Organismus bei Gewebsverletzungen gegen den übermäßigen Verlust von Blut.

Die Gerinnung des Blutes kommt durch das Zusammenwirken von vaskulären (Blutgefäße), zellulären (Thrombozyten) und plasmatischen (Gerinnungsfaktoren) Komponenten zustande.

Die Blutungsstillung nach einer Verletzung läuft in mehreren Phasen ab. In der Phase der „primären Hämostase“ kommt es durch die Reizung glatter Muskelzellen zunächst zu einer reflektorischen Kontraktion der Blutgefäße. Die eintretende Verlangsamung des Blutstromes begünstigt die zelluläre und plasmatische Gerinnung.

### Die zelluläre Hämostase

Der erste Schritt der zellulären Phase besteht in der Adhäsion von Plättchen an Kollagenfasern, die bei der Verletzung des Gefäßendothels freigelegt worden sind. Die Haftung der Plättchen an Kollagen erfolgt über Membranglykoproteine in speziellen Abschnitten des Kollagenmoleküles. Für die Adhäsion ist die Anwesenheit des von Willebrand-Faktors notwendig, der mit dem Faktor VIII im Plasma einen Molekülkomplex bildet.

Wenn die Blutplättchen sich dann zusammenlagern, setzen sie mehrere physiologisch aktive Substanzen frei, darunter Serotonin und Thromboxan A<sub>2</sub>. Diese Stoffe veranlassen die Blutgefäße zur Kontraktion und sorgen so für eine Verringerung des Blutflusses an der Verletzungsstelle.

Gleichzeitig wird das plasmatische Gerinnungssystem durch Kontaktaktivierung am geschädigten Endothel (Kollagen) und durch die Freisetzung von Gewebsthorboplastin aus dem verletzten Gewebe aktiviert.

### 1.3 Das plasmatische Gerinnungssystem

An der plasmatischen Blutgerinnung sind insgesamt 15 Gerinnungsfaktoren beteiligt (*Tabelle 1*). Mit Ausnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind alle Faktoren Proteine.

Sieben Gerinnungsfaktoren sind Zymogene (inaktive Vorstufen) von Serinproteasen, die durch andere, in der Kaskade weiter vorn stehende Serinproteasen, aktiviert werden. Gewöhnlich werden bei der Aktivierung kleinere Peptide abgespalten, die sogenannten Aktivierungspeptide.

In dem kaskadenartigen Ablauf der Aktivierungs-Reaktionen gibt es einige zentrale Reaktionen, die in Komplexen aus Gerinnungsfaktoren,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Phospholipiden ablaufen. Die Phospholipide stammen aus den Plättchen und dienen im Komplex als Matrix.

An die Phospholipide sind die Gerinnungsfaktoren über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gebunden.

Je nach dem auslösenden Mechanismus unterscheidet man die endogene und die exogene Aktivierung (*Abbildung 1*). Nach Initiation erfolgt eine quervernetzte Kaskade sich gegenseitig aktivierender Faktoren.

Die zwei Aktivierungswege unterscheiden sich in der Reaktionsfolge bis zur Bildung des Prothrombin-Aktivators, d.h. bis zur Aktivierung von Faktor X. Über den aktiven Faktor X münden beide Wege in die zentrale Reaktion der Prothrombinaktivierung ein. Drei an das Phospholipid der Thrombozytenmembran gebundene und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abhängige Enzymkomplexe stehen im Zentrum des Gerinnungssystems:

- der Faktor Xa-bildende Komplex der intrinsischen Aktivierung (Xase oder „Tenase-Komplex“) aus dem Faktor IXa und dessen Cofaktor VIIIa
- der Faktor Xa-bildende Komplex der extrinsischen Aktivierung aus dem Faktor VIIa und dem Gewebsthromboplastin-Faktor VII-Komplex
- der Thrombin (Faktor IIa)-bildende Komplex aus Faktor Xa und dessen Cofaktor Va (Prothrombinase-Komplex)

Faktor X kann also entweder von Faktor IXa oder vom Faktor VIIa aktiviert werden.

Gemeinsames Zwischenprodukt des extrinsischen und intrinsischen Systemes ist die Bereitstellung von Faktor Xa für die Aktivierung des Prothrombinkomplexes.

In der gemeinsamen Endstrecke entwickelt das Thrombin seine spezifischen proteolytischen Eigenschaften, aus Fibrinogenmolekülen zwei Peptide abzuspalten, die



sogenannten Fibrinopeptide A und B. Die entstehenden Fibrinmonomere aggregieren zu Polymeren, die noch löslich sind.

Erst durch die Wirkung des fibrinstabilisierenden Faktors (XIII) werden die Fibringerinnsel kovalent vernetzt, wodurch sie unlöslich werden.

Wichtige Bestandteile der Hämostase sind auch die Inhibitoren der Blutgerinnung. Diese sorgen dafür, daß Thrombin nur am Ort des Bedarfs wirken kann. Wichtigster Inhibitor des Thrombins ist das Antithrombin III. Es inaktiviert die Enzyme Thrombin, Faktor IXa, Xa, XIa, XIIa und Plasmin. Weitere Inhibitoren sind die Proteine C und S und der Heparin-Cofaktor II.

Unter physiologischen Bedingungen eines Gesunden herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen gerinnungsaktivierenden und inaktivierenden Reaktionen, welches die intravasale Fließeigenschaft erhält.

### **1.3.1 Wechselwirkungen des Faktor VIII und IX in der Gerinnungskaskade**

Nach Freisetzung in die Kaskade bindet FVIII an den von Willebrand-Faktor mit hoher Affinität ( $K_D = 0,4 \text{ nM}$ ) (Saenko et al., 1995, Saenko et al., 1997). Es sind mehrere Regionen innerhalb der leichten Kette des FVIII-Moleküles vorhanden, die an den VWF binden: die A3- und C2-Domänen. Die schwere Kette interagiert nicht direkt mit dem VWF, aber sie bewirkt eine maximale Affinität der FVIII-VWF-Wechselwirkung. Die Komplexbildung mit dem VWF ist erforderlich, um den normalen FVIII-Spiegel im Plasma zu erhalten.

Die Bindung an den VWF verhindert eine vorzeitige Bildung des Xase-Komplexes und schützt FVIII vor Inaktivierung durch aktiviertes Protein C, FIXa und FX (Morfini et al., 1993). Hohe Konzentrationen an vesikulären Phospholipiden führen zur proteolytischen Abspaltung des VWF und zur Freisetzung des noch inaktiven FVIII (Andersson et al., 1981). Die Aktivierung zu FVIIIa erfolgt dann durch Thrombin, möglicherweise unter Mitwirkung von FXa (Koedam et al., 1990). Der FVIIIa geht dann in den intrinsischen Tenase (Xase)-Komplex ein.

Innerhalb des intrinsischen Xase-Komplexes wird die Cofaktoraktivität des Faktor VIIIa durch seine drei Wechselwirkungen mit den Phospholipid (PL)-Membranen, dem Enzym IXa und dem Substrat FX gefördert. Die leichte Kette des FVIII bewirkt die

hohe Bindungsaffinität des FVIII mit den Phospholipiden der Zellmembran (Saenko et al., 1998).

Die hohe Affinitätswechselwirkung zwischen FVIIIa und FIXa findet durch die A3-Domäne der leichten Kette des FVIII statt, die eine FIXa-Bindungsstelle enthält (Lenting et al., 1996).

Für die normale Funktion in der Gerinnungskaskade benötigt FVIII seine Wechselwirkung mit physiologisch wichtigen Liganden, nämlich VWF, PL, FIXa, Thrombin und FXa.

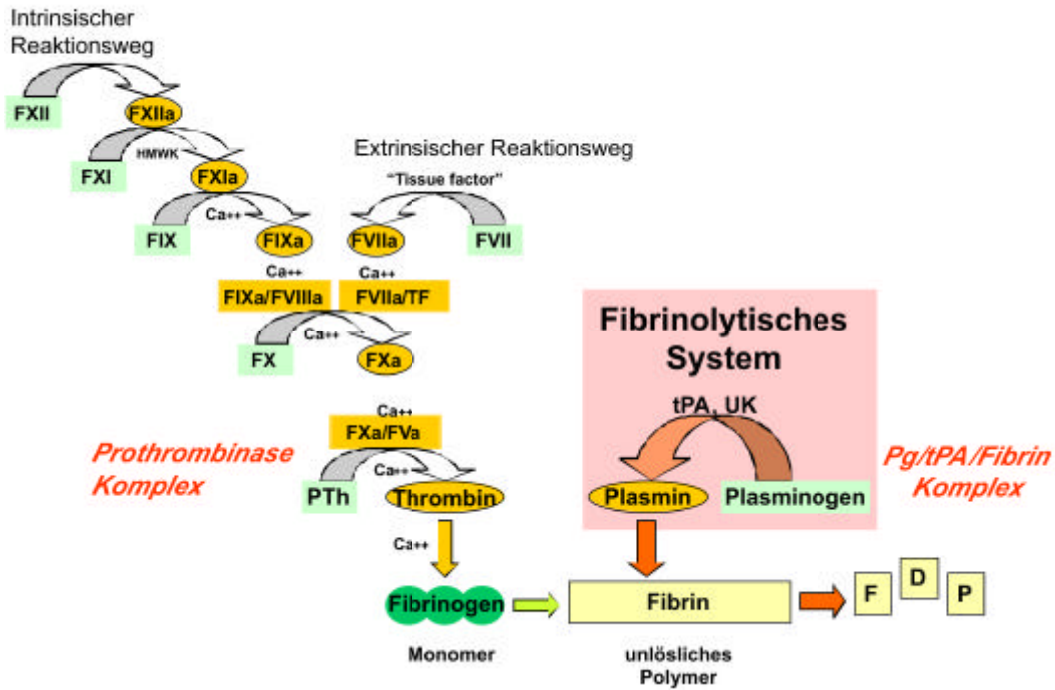
Tabelle 1

Gerinnungsfaktoren

Faktor	Funktion	Synonyme
I	Gerinnselfbildung	Fibrinogen
II	Serinprotease, bildet aus Fibrinogen Fibrin	Prothrombin
III	Bildet mit FVIIa einen Komplex und aktiviert FX zu FXa	Gewebsthromboplastin, -kinase
IV	Notwendig für die Interaktion von Gerinnungsfaktoren mit Phospholipidoberflächen	Ca <sup>2+</sup> -Ionen
V	Cofaktor, beschleunigt FII-Aktivierung	Acceleratorglobulin, Proaccelerin
VI		Nicht bekannt
VII	Serinprotease, aktiviert FX	Proconvertin
VIII	Cofaktor, beschleunigt FX-Aktivierung durch FIX	Antihämophiler Faktor
IX	Serinprotease, aktiviert FX	Plasmathromboplastinkomponente (PTK), Christmas-Faktor
X	Serinprotease, aktiviert FII	Stuart-Power-Faktor, Plasmathromboplastin
XI	Serinprotease, aktiviert FIX	Rosenthal-Faktor, Plasmathromboplastin antecedent
XII	Serinprotease, aktiviert FXI und Prekallikrein	Hagemann-Faktor
XIII	Transglutaminase, stabilisiert das Fibringerinnsel	Fibrinstabilisierender Faktor
PK	Serinprotease, aktiviert FXII, Plasminogen	Präkallikrein, Fletcher-Faktor
HMWK	Cofaktor, beschleunigt FXII-Kontaktaktivierung	Fitzgerald-Faktor

Abbildung 1: Blutgerinnungskaskade ( abgeändert nach Voet, Voet 1994)

### Gerinnungskaskade und Fibrinolyse



#### 1.4 Molekularbiologie und Genetik der Hämophilie A und B

Die Struktur und Sequenz des humanen FVIII-Genes wurde 1984 gleichzeitig von zwei verschiedenen Forschergruppen entschlüsselt (Toole et al. 1984, Gitschier et al. 1984).

Das Gen ist 186 kb groß und umfaßt damit ca. 0,1% des X-Chromosomes, wo es in Telomernähe in der Bande Xq28 lokalisiert ist. Es ist eines der längsten humanen Gene. Die genetische Information für das Faktor VIII-Protein ist auf 26 Exons aufgeteilt, die eine reife m-RNA von ca. 9 kb Länge codieren.

Die Exonlängen variieren zwischen 69-262 Nukleotiden, mit Ausnahme der Exons 14 (3106 Nukleotide) und Exon 26 (1958 Nukleotide) (Antonarakis 1998).

Insgesamt beansprucht die kodierende Sequenz des FVIII-Genes nur 5% des gesamten Genes. Die verbleibenden 177 kb verteilen sich auf Introns von einer Größe zwischen 207 bp bis zu 32,4 kb. Es gibt 6 große Introns von jeweils mehr als 14000 bp (Gitschier et al., 1984).

Seit Klonierung des FVIII-Genes wurde die DNA von mehr als 2500 Hämophilie A Patienten auf Molekulardefekte bzw. Mutationen untersucht, anfänglich nach Spaltung mit Restriktionskartierung, Sequenzierung und Southern Blot-Methode.

Es existiert eine Web-Datenbank der verschiedenen Mutationstypen (Tuddenham et al., 1994, Antonarakis et al., 1995), die kontinuierlich von Tuddenham aktualisiert wird: <http://europium.csc.mrc.ac.uk>.

Das FIX-Gen ist im distalen Bereich des langen Armes des X-Chromosomes (Xq27.1.) in Nachbarschaft des fragilen X-Gens und des Faktor VIII-Genes lokalisiert (Chance et al., 1983).

Das ca. 34 kb große Gen wurde 1985 sequenziert und besteht aus 8 Exons (a-h) und 7 Introns (Yoshitake et al., 1983).

Exon a codiert das hydrophobe Signalpeptid. In Leberzellen wird FIX als Precursor-Molekül synthetisiert, welches im Vergleich als Molekül länger als FIX im Plasma ist (Pang et al., 1990). Die Exons b und c codieren die Propeptidsequenz und die Gla-(Carboxyglutaminsäure)-Domäne, die aus 12 N-terminalen Carboxyglutamyresten besteht. Exon d codiert die erste EGF-ähnliche Domäne und Exon e codiert die zweite EGF-ähnliche Domäne. Exon f codiert das Aktivierungspeptid. Exons g und h codieren die Serinprotease oder katalytische Domäne.

In seiner Struktur ähnelt das FIX-Gen den phylogenetisch verwandten Genen für andere Vitamin K-abhängige Proteine wie Faktor VII, Faktor X und Protein C (Di Scipio et al., 1977).

Das Faktor IX-Protein ist auch Vitamin K abhängig und besteht aus 415 Aminosäuren mit einem MG von 56 kDa. Die biologische Halbwertszeit beträgt 18-24 Stunden.

Analog zur Hämophilie A gibt es viele verschiedene Mutationen des Faktor IX-Genes, die sich klinisch meist durch Schweregrad der Erkrankung und im Fall der Hämophilie B auch im prognostischen Verlauf unterscheiden.

Seit Einführung der PCR wurde die DNA von mehr als 1500 Patienten auf Mutationen untersucht (Lillicrap 1998). Es wurden durch DNA-Sequenzierung ca. 300 verschiedene Mutationen beschrieben (Giannelli et al., 1991; Thompson et al., 1991). Unter diesen machen Nonsense- oder Missense-Punktmutationen etwa 95% aller Mutationen aus. Deletionen, Insertionen und komplexe Genarrangements sind für den verbleibenden Teil verantwortlich (Kurachi et al., 1992). Die Mutationen können alle Abschnitte des Genes betreffen. Mutationen in CpG-Dinukleotiden erscheinen häufiger als Mutationen, die als Sequenzwiederholungen auftreten (Giannelli et al., 1994; Green et al., 1990).

Auch für die HB existiert eine weltweite Mutationsdatenbank (die Adresse lautet: [www.umds.ac.uk/molgen/haemBdatabase](http://www.umds.ac.uk/molgen/haemBdatabase)), die alle Mutationsarten auflistet und jährlich aktualisiert wird (Giannelli et al., 1990).

### **1.5 Das FVIII-Protein und seine posttranslationale Modifizierung**

Das Gen für FVIII codiert ein Polypeptid von 2351 Aminosäuren. Die ersten 19 AS bestehen aus der Signalsequenz, die nach der Sekretion entfernt wird. Das fertige Protein (MG 300 kDa), welches sezerniert werden kann, besteht aus 2332 Aminosäuren. Die biologische Halbwertszeit des Proteines beträgt ca. 8-14 Stunden.

Es setzt sich aus den Domänen A, B und C zusammen, die in der Reihenfolge A1-A2-B-A3-C1-C2 angeordnet sind (Vehar et al., 1984) (*Abbildung 2*).

Die A1-A2-B-Domänen bilden die schwere Kette und die Domänen A3-C1-C2 die leichte Kette, wobei schwere und leichte Ketten über ein 2-wertiges Metall ( $Mn^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$ ) in nichtkovalenter Bindung zusammengehalten werden.

Die A-Domänen (A1= R 1 bis 336, A2= R 380 bis 711, A3= R 1649 bis 2019) haben untereinander eine Aminosäuresequenzhomologie zu etwa 30%. Diese Sequenzen sind auch homolog zu Sequenzen des Ceruloplasmins, einem Kupfer-bindenden Protein im Plasma, und dem Faktor V (Vehar et al., 1984, Koschinsky et al., 1986, Kane et al., 1986).

Die A2 und A3-Domänen sind durch die B-Domäne (R 740-1648) getrennt, welche 19 von 25 potentiellen Glykosylierungsstellen besitzt. Die B-Domäne ist vollständig im 3106 bp langen Exon 14 codiert und ist nicht konserviert zwischen Faktor VIII und Faktor V. Sie hat keine bekannte Funktion (Kane et al., 1986).

Am Carboxylende des Proteins sind die homologen Domänen C1 (R 2020 bis 2172) und C2 (R 2173 bis 2332) lokalisiert. Diese sind auch homolog zu Sequenzen des lipidbindenden Lectins Discoidin 1 von *Dictyostelium discoideum* (Poole et al., 1981), zum FV (Vehar et al., 1984) und zum humanen globulären Membranprotein des Milchfetts (Stubbs et al., 1990).

Auffallend sind weiter drei Regionen mit einem hohen Anteil an sauren Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäuren). Zwischen A1 und A2 liegt *a1* (R 337 bis 374); *a2* (R 711 bis 740) verbindet A2 und B; *a3* liegt zwischen B und A3 (R 1649 bis 1689).

Die saure Region *a3* ist für die Assoziation des FVIII an den VWF von Bedeutung (Saenko et al., 1997).

Die Aminosäuresequenz des FVIII beinhaltet 25 Consensus-Sequenzen für eine Stickstoff-Glykosylierung von Asparagin. Von diesen befinden sich 19 innerhalb der B-Domäne. Diese Glykosylierung ist für die Sekretion des FVIII von Bedeutung (Pittman et al., 1994). Weiterhin besitzt die B-Domäne des murinen Proteines 19 potentielle Glykosylierungsstellen; die humane Sequenz weist dieselbe Anzahl an Glykosylierungsstellen auf, jedoch an anderen Stellen. Vermutlich ist somit die Glykosylierung der B-Domäne wichtig für die Faktor VIII-Biosynthese (Antonarakis 1998).

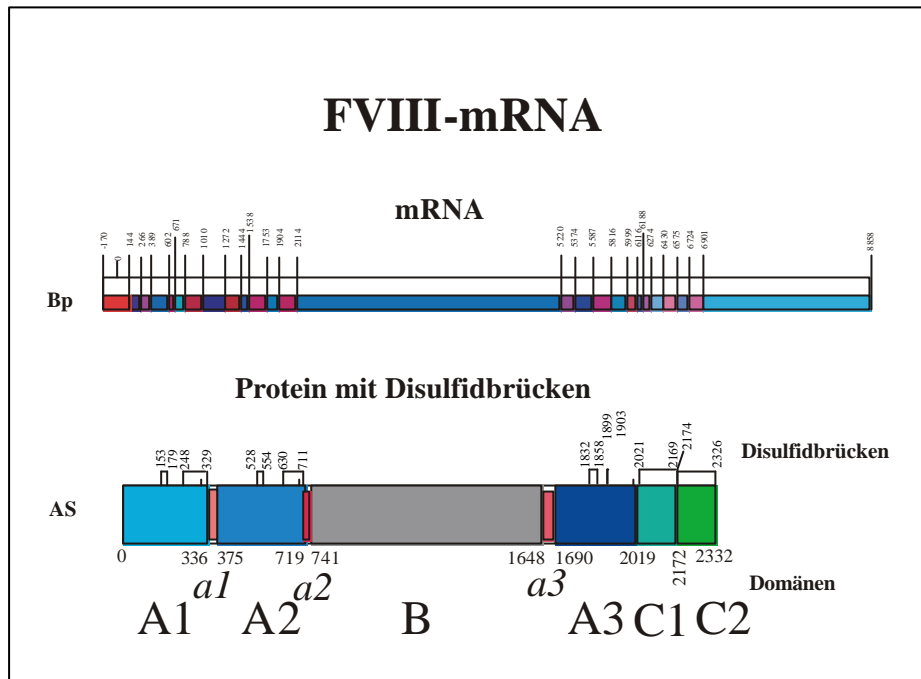


Abbildung 2

Faktor VIII m-RNA und Protein

(abgeändert nach Gitschier 1984)

**1.6 Die Faktor VIII-Synthese**

Der größte Anteil des Faktor VIII wird in der Leber synthetisiert.

Für FVIII spezifische mRNA ist allerdings auch in Milz, Niere und Lymphozyten vorhanden.

Immunultrastrukturuntersuchungen wiesen das FVIII-Protein in den Hepatocytten der Leber sowohl im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als auch im Golgi-Apparat nach (Wion et al., 1985, Zelechowska et al., 1985).

Der erste Schritt der Sekretion ist eine durch die Signalsequenz initiierte Translokation in das Lumen des ER. Diese wird dabei abgespalten. Im ER erfolgen die Stickstoff-Glykosylierungen des reifen 2332 AS langen Polypeptids und eine Interaktion mit zahlreichen Chaperone-Proteinen (Swaroop et al., 1997; Pipe et al., 1998). Im Golgi-Apparat folgen weitere Modifizierungen, wie die Veränderung der Stickstoffgekoppelten Oligosaccharide, eine Sauerstoff-gekoppelte Glykosylierung, Tyrosin-

Sulfatierung und eine proteolytische Spaltung in schwere und leichte Kette (Kaufmann et al., 1988). Diese Spaltungen können nach den AS 1648 (Schnittstelle der B-A3-Domäne) und innerhalb der B-Domäne erfolgen und erzeugen demnach leichte (LC) und schwere Kette (HC). Die Fragmente mit heterogenem Molekulargewicht reichen von 90-220 kDa (HC) und 70-80 kDa (LC). Der für diese Aufspaltung in Heterodimere verantwortliche Mechanismus ist noch nicht bekannt.

Der in der Leber gebildete FVIII bildet mit dem großen Multimerprotein des von Willebrand-Faktors den FVIII-Komplex, in dem das FVIII-Protein nur 2% der Masse repräsentiert.

## 1.7 Diagnostik

Zur Routinediagnostik der Hämophilie gehört bei klassischer Anamnese die Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) und der Einzelfaktoren VIII bzw. IX.

Die PTT erfaßt die Gruppe der plasmatischen Faktoren des endogenes Systemes, also auch den Faktor VIII und FIX, und ist bei deren Mangel verlängert.

Quicktest, Thrombozytenzahl und Blutungszeit sind normal.

Aufgrund ihrer Abhängigkeit von mehreren Faktoren kann die PTT nur als Screening-Untersuchung gewertet werden. Die genaue Diagnose des Hämophilietyps sowie des Schweregrades kann nur über die Einzelfaktorenanalyse, d.h. die Bestimmung von Faktor VIIIc oder Faktor IXc gestellt werden.

## 1.8 Klinik (Symptome)

Die einzelnen Grade der Hämophilie A bzw. Hämophilie B werden entsprechend dem Ausmaß der Aktivitätsminderung des Faktors VIII bzw. IX in vier Gruppen eingeteilt:

Schwere Form: Faktor VIIIc bzw. IXc < 1%

Die Blutungen finden seit frühester Kindheit statt, sie entstehen meist spontan und nach Traumen.



Mittelschwere Form: Faktor VIIIc bzw. IX > 1-5%

Hier finden spontane Blutungen statt, meist aber nach einem Trauma.

Leichte Form: Faktor VIIIc bzw. IX > 5-15%

Die Blutungen finden meist nach einem Trauma oder bei invasiver Diagnostik oder nach Operationen/ Zahnextraktionen statt.

Subhämophilie: Faktor VIIIc bzw. IX: 15-40%

Zwischen Schwere der klinischen Symptome und Grad des Gerinnungsdefektes bzw. Verminderung der Faktor VIII–bzw. FIX–Aktivität im Plasma besteht eine gute Korrelation (Rizza et al., 1983, Hoyer 1987).

Etwa 50% der diagnostizierten Fälle entfallen auf die schwergradige Form. Ca. 10% der Patienten sind von der mittelschweren Form und 30-40% von der leichten Form betroffen (Antonarakis 1998).

Das klinische Bild ist geprägt von spontanen oder nach Traumen stattfindenden Gelenk- und Muskelblutungen sowie Blutungen in innere Organe.

Gelenkblutungen treten im Schulalter in den Vordergrund. Es kommt zu Einblutungen in die großen Gelenke, vor allem in das Knie-, Sprung- und Ellenbogengelenk.

Weitere Blutungen sind die intramuskulären Blutungen, Nierenblutungen und intrakranielle Blutungen. Auch die Haut und Schleimhäute können betroffen sein.

Patienten mit einer leichten oder mittelschweren Hämophilie neigen aber nur selten zu Gelenks- und Muskelblutungen.

## **1.9 Therapie**

Ziel der Substitutionstherapie ist die Anhebung von Konzentration und Aktivität des fehlenden Plasmafaktors in einen hämostatisch aktiven Bereich und diese Aktivitätshöhe zu halten, bis der Heilungsprozeß ausreichend fortgeschritten ist. Der fehlende Plasmafaktor VIII oder IX wird als Konzentrat intravenös injiziert.

Die Präparation der entsprechenden Konzentrate erfolgt durch Aufreinigung aus Spenderplasma oder gentechnisch durch Expression der klonierten Faktoren in Zellkultur.

In den achtziger Jahren wurde die c-DNA des FVIII-Genes kloniert. Sie ermöglichte die gentechnische Herstellung rekombinanter Produkte, die seit 1992 zugelassen sind (Gitschier et al., 1984, Toole et al., 1984, Vehar et al., 1984).

Für die Behandlung der Hämophilie A stehen folgende Präparate zur Verfügung:

- aus Plasma aufgereinigter FVIII (pdFVIII)
- rekombinant erzeugter FVIII (rFVIII)

Die Kohlenhydratseitenketten des rFVIII sind nicht ganz identisch mit denen von pdFVIII. Klinische Untersuchungen zeigten, daß rFVIII nur geringe Nebenwirkungen hat und eine vergleichbare Recovery, Halbwertszeit und funktionelle Äquivalenz mit Plasma-Faktor VIII besitzt (White et al., 1989).

Die Faktor VIII-Präparate lassen sich nach ihrer spezifischen Aktivität (IE Faktor/mg Protein) in mittelgereinigte, hochgereinigte und ultrahochgereinigte Präparate unterscheiden.

Die unterschiedliche Reinheit resultiert aus verschiedenen Mengen an Fremdproteinen. Neuere Reinigungsverfahren beseitigen nicht nur Fremdproteine, sondern reduzieren auch evtl. vorhandene Viren. Dafür wurden verschiedene Techniken entwickelt wie Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie, sowie die Behandlung mit Lösungsmitteln und Detergentien (SD), Pasteurisierung (P), Hitzeinaktivierung (H) und Dampfinaktivierung (S).

Es existieren plasmatische Präparate mit und ohne VWF. Der VWF ist z.B. in Haemate®, Octanate®, Profilate® und Haemoctin® enthalten, nicht jedoch in Beriate® und Monoclate®.

Für die Hämophile B-Behandlung werden vorwiegend plasmatische FIX-Präparate eingesetzt. Es existiert zusätzlich auch ein rekombinantes FIX-Präparat namens Benefix®.

Grundsätzlich werden ähnliche Reinigungs- und Virusinaktivierungsverfahren wie bei den FVIII-Konzentraten durchgeführt.

Die Dosierung ist im Hinblick auf die geringe in-vivo-recovery schwierig zu standardisieren. Im Gegensatz zu FVIII, der vorwiegend intravasal bleibt, verteilt sich FIX im gesamten extravasalen Kompartiment.

Es lassen sich zwei verschiedene Behandlungsformen unterscheiden, deren Indikation vom Schweregrad der Krankheit und vom Alter sowie der klinischen Situation des Patienten abhängig ist:

- die vorbeugende (prophylaktische) Behandlung
- die ereignisorientierte Bedarfs- oder Blutungsbehandlung

Eine prophylaktische Therapie wird z.B. bei folgenden Indikationen empfohlen:

- bei Kindern mit schwerer Hämophilie A oder B, dauerhaft, spätestens nach Auftreten der ersten Gelenkblutung (Langzeitprophylaxe)
- bei rezidivierenden Blutungen
- bei operativen Eingriffen (Kurzzeitprophylaxe)

Die Dosierung der prophylaktischen Behandlung richtet sich individuell nach Faktorenhalbwegszeit und der klinischen Situation (Zustand der Gelenke, Begleiterkrankungen) des Hämophilen. Normalerweise liegt sie bei mindestens dreimal wöchentlich 20-30 IE/kg Körpergewicht FVIII bei der HA. Bei der HB genügen eventuell weniger Injektionen pro Woche wegen der beim FIX längeren Halbwertszeit.

Eine Therapie bei Bedarf ist ereignisorientiert, d.h. eine Substitution von Gerinnungsfaktoren wird nur nach eingetretenen Blutungsereignissen, vor besonderen körperlichen Belastungen oder operativen Ereignissen durchgeführt.

Die Dosierung und Dauer der Behandlung richten sich nach der Schwere der Blutung, der Blutungslokalisation u. dem Kenntnisstand über die Halbwertszeit des FVIII/ FIX beim jeweiligen Patienten. Hieraus wird eine für den Patienten individuelle Dosierung festgelegt, wobei Kinder eine auf das Kilogramm Körpergewicht bezogene höhere Dosierung benötigen als Erwachsene.

Die Dosis kann anhand folgender vereinfachter Formel annähernd ermittelt werden:

Dosis (Einheiten)= 0,5 · Gewicht (kg) · gewünschter Faktor VIII-Anstieg (E/ml).

Eine Einheit Faktor VIII/kg Körpergewicht hebt den Faktor VIII-Spiegel um ca. 1-2%. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit ist etwa die Hälfte dieser Menge als Erhaltungsdosis alle 8-12 Stunden zu infundieren.

Eine Behandlung sollte so lange erfolgen, bis die Blutungssymptome vollständig abgeklungen sind.

### **1.9.1 Komplikationen der Behandlung von Hämophiliepatienten mit Faktorenpräparaten**

Der Einsatz von aus großen Plasma-Pools hergestellten Gerinnungskonzentraten führte bei einer großen Zahl von Patienten in den 80-er Jahren zur Übertragung viraler Krankheiten wie Hepatitis und Aids. In den letzten Jahren ist es aber gelungen, die Gefahr der Übertragung von solchen Viren auf Bluterpatienten nahezu auszuschließen (sorgfältigere Plasmaspenderauswahl und verbesserte Verfahren zur Inaktivierung unerkannt in die Plasma-Pools gelangter Viren). Die rekombinanten Faktor VIII-Präparate gelten als sicher bzgl. der Virustransmission.

Eine andere gravierende Nebenwirkung bleibt jedoch weiterhin bestehen:

Die Möglichkeit der Bildung von neutralisierenden Antikörpern (Inhibitoren) gegen die verabreichten Gerinnungsfaktoren.

Das erste Auftreten eines Inhibitors bei einem Hämophilie A-Patienten infolge einer Transfusion von Faktor VIII wurde 1941 von Lawrence und Johnson beschrieben.

Die erste quantitative Methode, um die Inhibitoraktivität in einem Assay nachzuweisen (Oxford-Methode), wurde von Biggs und Bidwell (1959) entwickelt.

Prospektive Studien mit erstbehandelten Hämophilen (PUPs = previously untreated patients) konnten bei 22-52% der schweren und bei 5,3-12,5% der mittelschweren Hämophilie A Patienten diese Komplikation nachweisen. Selten betroffen sind Patienten mit milder Hämophilie A (13%) (Ehrenforth et al., 1992, Kreuz et al., 1996). Bei der Hämophilie B beträgt die Inhibitorinzidenzrate ca. 3% (Oldenburg et al., 2000). Die Entwicklung eines Inhibitors gegen FIX kann mit einer gleichzeitigen allergischen Reaktion oder Anaphylaxie einhergehen (Warrier et al., 1997).

Die Inhibitoren treten meist in der Kindheit innerhalb der ersten 10-20 Expositionstage der Therapie auf (Kreuz et al., 2002, Kreuz et al., 1995). Nach ca. 200

Behandlungstagen ist das Risiko der Inhibitorbildung sehr gering (Schwartz et al., 1990, De Biasi et al., 1994).

Diese Inhibitoren sind hochspezifische Immunglobuline, sie führen zu einer schnellen Inaktivierung des substituierten Faktor VIII und verringern dadurch die Behandlungsmöglichkeit (Yee et al., 2002).

Der Inhibitorbildung wird durch die Immuntoleranztherapie (ITT) entgegengesteuert, bei der durch hohe FVIII-Konzentrationen (Bonn-Protokoll) eine Toleranz des Immunsystems gegen FVIII induziert werden kann (Oldenburg 1999, Brackmann et al., 1996).

Die Erfolgsrate dieser Therapie des Bonn-Protokolls liegt bei Patienten mit niedrigem Inhibitor titer (0,6-5 BU) bei ca. 100%, bei jenen mit hohem Inhibitor titer (> 5 BU) bei ca. 90%.

Die bisherigen Erkenntnisse zur Inhibitorbildung bei Hämophilen sind trotz zahlreicher Untersuchungen noch sehr lückenhaft. Sie resultieren meist aus Studien mit Hämophilie-A-Patienten, die häufiger Inhibitoren bilden als Hämophilie B-Patienten. Vorwiegend sind Patienten mit schwerer Hämophilie A (FVIII-Restaktivität < 1%) betroffen.

Allergische Reaktionen auf Gerinnungskonzentrate sind seit Einführung der hochreinen Gerinnungskonzentrate sehr selten. Bei der HB treten gelegentlich gleichzeitig mit der Bildung eines Inhibitors schwere anaphylaktische Reaktionen auf FIX-Konzentrate auf. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt.

Sehr selten kommt es zu allergischen Reaktionen auf den Albuminanteil in den Gerinnungskonzentraten.

## **1.10 FVIII-Inhibitoren**

### **1.10.1 Klassifizierung von Faktor VIII-Antikörpern**

FVIII-Antikörper werden unterschieden in Inhibitoren, welche die biologische Aktivität (FVIIIIC) hemmen, und Nicht-Inhibitoren. Diese Nicht-Inhibitoren binden zwar an FVIII, hemmen aber nicht FVIIIIC. Jeder Inhibitorpatient besitzt ein eigenes Profil aus nicht-inhibierenden und inhibierenden Antikörpern (Gilles et al., 1993).

Ein Nachweis aller FVIII- Antikörper im Plasma erfolgt durch Immunassays, während der Bethesda-Assay nur funktionell hemmende Antikörper erfasst (Verbruggen et al., 1995; Kasper et al., 1975).

FVIII-Inhibitoren existieren als Allo-Antikörper im Plasma bei bis zu 25-30% der Patienten mit schwerer Hämophilie A, die mit FVIII- Konzentraten behandelt wurden (Mc Millan et al., 1988, Lacroix-Desmazes et al., 2002, Kreuz et al., 2002).

Seltener werden sie bei Patienten mit funktionell abnormem FVIII-Molekül gefunden. Oder sie existieren als Autoantikörper, die spontan bei Nicht-Hämophilie-Patienten und bei gesunden Personen gebildet werden (Lottenburg et al., 1987; Lacroix-Desmazes 2002). Letztere treten mit einer Inzidenz von 1:1 Million seltener auf (Großmann et al., 1999).

Andauernd-Inhibitor-bildende-Patienten (persistente Inhibitoren) werden per Definition nach dem Inhibitor-Titer in „Low Responders“ von 0,6 bis 5 BU und „High Responders“ größer 5 BU unterteilt (White et al., 2001). Circa 50% der Inhibitoren, die bei der Hämophilie A in Studien entdeckt werden, sind „high responding“-Inhibitoren (Bray et al., 1994, Lusher et al., 1999).

Transiente Inhibitoren sind niedrigtitrig und verschwinden spontan bei der Fortführung bzw. im Verlauf der Behandlung. Dies ist allerdings nur der Fall bei Patienten, die nicht kontinuierlich Faktor VIII-Infusionen erhalten (Rothschild et al., 2000).

Aufgrund der Tatsache, daß „High Responder“-Patienten nicht (ausreichend) auf die Gabe von Faktor VIII reagieren und damit die Gefahr lebensgefährlicher Blutungen drastisch steigt, muß der Inhibitor schnellstmöglich eliminiert werden.

Die Reaktion des menschlichen Immunsystems gegen FVIII ist heterogen.

Die untersuchten Inhibitoren sind meist Immunglobuline der Klasse IgG (meist IgG4 und IgG1, seltener IgG3); es wurden aber auch monoklonale IgM und IgA-Autoantikörper nachgewiesen (Gilles et al., 1998; Lacroix-Desmazes et al., 2002). Die gebildeten Antikörper sind weder präzipitierend noch aktivieren sie das Komplementsystem (Schwarz 1996).

### 1.10.2 Mechanismen der FVIII-Inhibition

FVIII-Inhibitoren wurden entdeckt, nachdem sie FVIII-Aktivität in unfraktioniertem Plasma und bei einem „in vitro assay“ hemmten (Kessler et al., 1991; Verbruggen et al., 1995).

Prinzipiell gibt es für die inhibitorische Wirkung der FVIII-Antikörper zwei verschiedene Mechanismen:

Die Induktion einer Inaktivierung des FVIII oder eine sterische Blockade funktioneller Epitope (Spiegel et al., 2001)(Abb.3).

Anti-FVIII-Antikörper, die in Patienten mit schwerer Hämophilie auftreten, können Faktor VIII hydrolysieren. Dies sind proteolytische Antikörper (Lacroix-Desmazes et al., 1999 u. 2000). Diese hydrolysierenden Antikörper existieren in mehr als 50% der Patienten mit schwerer Hämophilie A (Lacroix-Desmazes et al., 2002).

Zusätzlich sind im Plasma von Inhibitor-positiven Patienten Anti-FVIII-Antikörper vorhanden, die gegen nicht-funktionelle Determinanten des Proteines gerichtet sein können (Gilles et al., 1993).

Die sterische Blockade funktioneller Epitope ist besser untersucht, und durch die Konstruktion von rekombinanten FVIII-Fragmenten konnten Spezifität und Wirkung der Inhibitoren untersucht werden.

Epitopemapping zeigte Spezifitäten gegen die schwere oder leichte Kette oder gegen beide bei verschiedenen Patienten (Fulcher et al., 1987, Scandella et al., 1990).

Während für Auto-Inhibitorpatienten meist nur eine Inhibitorspezifität nachgewiesen werden konnte, zeigen mehr als 80% der Hämophilie-Patienten eine komplexe Immunantwort (Inhibitoraktivität) gegen zwei oder drei Epitope, abhängig vom Inhibitortiter (Peerlinck et al., 1999, Scandella et al., 2001).

Die am häufigsten nachgewiesenen Hemmkörper richten sich gegen folgende B-Zell-Epitop-Domänen: C2 und A3 der leichten Kette und A2 der schweren Kette (Moreau et al., 2000, Saenko et al., 1994, Shima et al., 1988).

Zusätzlich zu den FVIII-Inhibitoren sind im Plasma von Inhibitor-positiven Patienten Anti-FVIII-Antikörper enthalten, die gegen nicht-funktionale Determinanten des FVIII gerichtet sind (Fulcher et al., 1985; Gilles et al., 1993).

#### Inhibitoren der schweren Kette der A2-Domäne: (s. Abb. 3 und 4)

Sie inaktivieren Faktor VIII, indem sie die Wechselwirkung der A2-Domäne mit der Proteasedomäne von Faktor IX a blockieren (Fay et al., 1999).

Die Cofaktor-Funktion des FVIII im Tenase-Komplex wird somit beeinflusst.

#### Inhibitoren der leichten Kette der C2-Domäne:

Diese Inhibitoren verhindern die FVIII-Bindung zu PL (Arai et al., 1989).

Das Überlagern von PL- und VWF-Bindungsstellen innerhalb der C2-Domäne von Faktor VIII (Saenko et al., 1995) erklärt, warum Inhibitoren mit C2-Spezifität auch die Faktor VIII-Bindung zu VWF verhindern (Saenko et al., 1995; Saenko et al., 1994).

Eine direkte funktionelle Hemmung erfolgt durch das Blockieren der membranbindenden Sequenz oder durch die Reduktion der Dissoziationsrate vom VWF (Saenko et al., 1996).

Die A2-Dissoziation vom Faktor VIIIa erfolgt, bevor die Ausbildung des membrangebundenen Tenase (Xase)-Komplexes vollendet ist, da diese durch den VWF verhindert wird.

#### Inhibitoren der leichten Kette der A3-Domäne

Diese treten seltener auf. Sie verhindern die Wechselwirkung zwischen Faktor VIII und Faktor IXa, so daß der Xase-Komplex nicht ausgebildet werden kann (Zhong et al., 1998, Gilles et al., 1993).

#### Inhibitoren weiterer Domänen bzw. Regionen:

Inhibitoren, die die Assoziation von FVIII und VWF blockieren, können neben der C2-Domäne auch gegen die sauren Regionen *a1* und *a3* und gegen C1 gerichtet sein (Lubahn et al., 1989, Foster et al., 1988, Jaquemin et al., 2000).



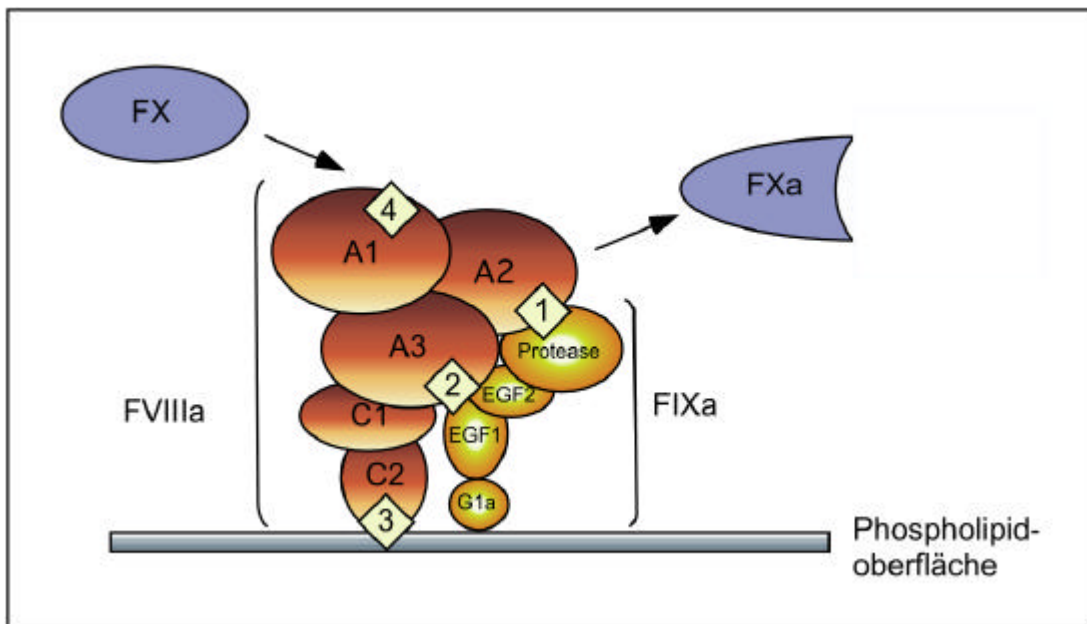


Abbildung 3

Mechanismen der inhibitorischen Antikörper (Saenko 2002)

Die Ziele der Inhibitoren sind mit den Nummern 1-4 gekennzeichnet.

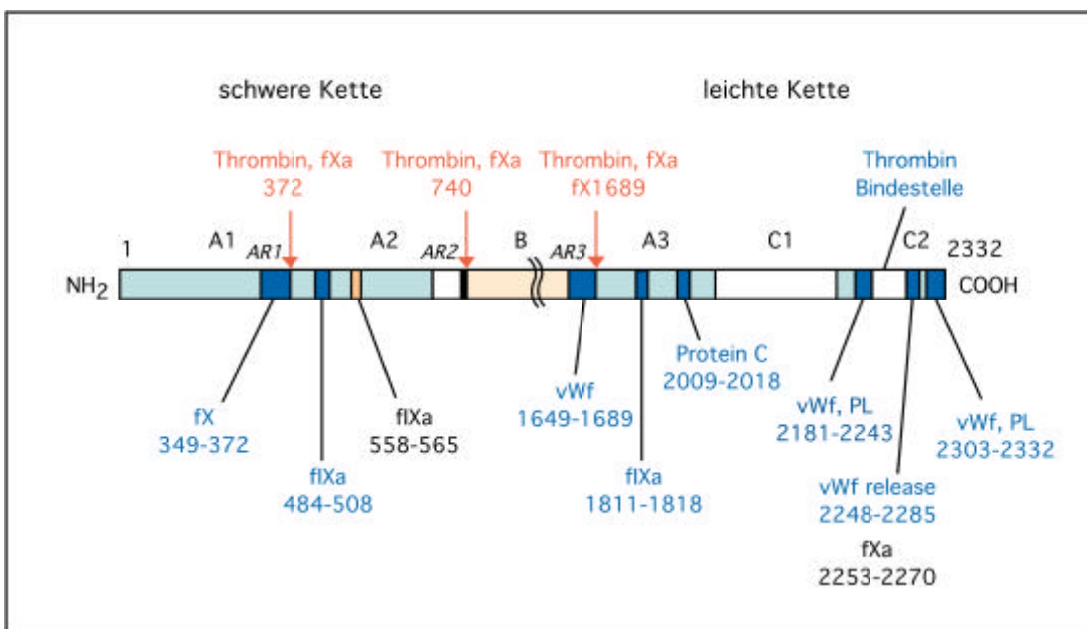


Abbildung 4

Bindungsstellen und Epitope der inhibitorischen Antikörper innerhalb des FVIII-Proteins (übersetzt nach Saenko 2002)

Zu Abb. 4:

FVIII besteht aus der schweren (A1-, A2- und B-Domänen) und der leichten Kette (A3, C1 und C2-Domänen). Die A-Domänen sind durch kurze Segmente flankiert (AR1, AR2 und AR3), die einen hohen Gehalt an sauren Aminosäuren aufweisen. FVIII wird durch Thrombin- oder FXa vermittelte Proteolyse an den Positionen 372, 740 und 1689 (rot) aktiviert. Dieses führt zur Freisetzung der B-Domäne und zum AR3-Peptid. Bindungsstellen für wichtige FVIII-Liganden wie VWF, FIXa, PL, FXa und APC sind zu sehen. Die Ligandbindungsstellen, die auch Ziele für inhibitorische Antikörper darstellen, sind dunkelblau markiert.

**1.10.3 Faktoren, die die Inzidenz der Inhibitor-Bildung beeinflussen**

Mögliche Ursachen und Zusammenhänge, die bei einem Patienten die Ausbildung von Inhibitoren beeinflussen können, wurden bisher an klinischen Studien untersucht und verschiedene beeinflussende Faktoren gefunden.

Kriterien der Evaluierung

Die Inhibitor-Inzidenz schwankt sehr stark, zwischen 22-52% bei schwerer und 5,3-12,5% bei mittelschwerer Hämophilie, da in den verschiedenen Studien die Parameter der Untersuchung sehr unterschiedlich sind (Hay et al., 1998).

Ursachen, die zu diesen Variationen führen, sind Art der Studie (prospektiv oder retrospektiv), Zahl der Patienten, Schweregrad der Hämophilie, Qualität und Quantität der Inhibitor-Messungen, Zahl der Expositionen, transiente oder niedrigtitrige Inhibitoren usw.

Dies alles läßt einen Vergleich der Studien und Erkenntnisse über die Ursachen nur schwer zu und führt zu sehr unterschiedlich erfassten Inzidenzen.

Disposition der Patienten

Mehrere Studien haben gezeigt, daß der Typ der Faktor VIII-Genmutation das Risiko der Inhibitorbildung stark beeinflusst (Oldenburg et al., 2002; Schwaab et al., 1995).

Je stärker das mutierte FVIII-Gen von der Norm abweicht bzw. je weniger FVIII-Moleküle im Blut sind, desto höher scheint die Gefahr, daß Inhibitoren gebildet werden. Für Patienten mit schwerer Hämophilie A ist dementsprechend das Inhibitor-Risiko höher als bei moderaten oder leichten Fällen (Hay et al., 1998).

Patienten mit schwerer Hämophilie A, deren Mutationen in die FVIII-Biosynthese eingreifen (wie Intron 22-Inversionen, große Deletionen oder Nonsense-Mutationen), haben ein sehr hohes Risiko (>30%), einen Inhibitor zu entwickeln. Im Gegensatz dazu ist das Risiko bei Missense-Mutationen oder kleinen Deletionen (4,3% und 7,4%) wesentlich geringer (Schwaab et al., 1995; Oldenburg et al., 2002). Interessanterweise stellen kleine Deletionen und Insertionen jedoch ein hohes Risiko bei der Hämophilie B dar (Oldenburg et al., 2002).

Die Gruppe der Mutationen „Kleine Deletionen und Insertionen“ mit einem Inhibitor-Risiko von 7,4% ist von besonderer Bedeutung (Schwaab et al., 1995). Die geringe Menge des endogen erhalten gebliebenen Faktor VIII-Proteines schützt gegen Inhibitorbildung. Diese Patienten haben fast kein Risiko für die Inhibitorentwicklung (Oldenburg et al., 1998, Becker et al., 1996).

Eigenschaften des Immunsystems (z.B. HLA-Genotyp und HLA-Allele) sind ein weiterer Faktor, der die Inhibitorbildung beeinflussen könnte (Oldenburg et al., 2000). Eine Verbindung zwischen HLA-Genotyp und Inhibitorbildung konnte zwar noch nicht nachgewiesen werden (Oldenburg et al., 1997), aber spezifische HLA-Allele (welche mehr in Nordeuropa vorkommen) erscheinen häufiger in Patienten mit Inhibitoren. Dies wurde auch in Studien von Hay et al. (1997) beobachtet. Außerdem können inflammatorische Prozesse (Kaufmann et al., 1999), der immunologische Status und familiäre Häufungen bedeutend sein (Oldenburg et al., 2000, 1997 und Hay 1997).

Weitere Faktoren, die die Inhibitorbildung möglicherweise beeinflussen, können therapiebezogen sein.

Bei der Therapie können die Anzahl der Expositionen, die Art der Expositionen, das Therapieregime und der Typ des Faktor VIII-Produktes beeinflussend wirken (Oldenburg 2000, Yee et al., 2002, Peerlinck et al., 1993).

Ein weiterhin bekannter patientenabhängiger Faktor ist das Alter, bei welchem die Substitutionstherapie erstmals durchgeführt wird, da zu diesem Zeitpunkt sehr junge Patienten vermehrt Inhibitoren bilden. In zwei neuen verschiedenen Studien wird

gezeigt, daß bei Patienten mit sehr frühem Therapiebeginn (Säuglingsalter) eine höhere Inhibitorinzidenzrate vorliegt als bei Patienten mit späterem Therapiebeginn (Lorenzo et al., 2001; Van der Bom et al., 2003).

#### **1.10.4 Charakterisierung der Hemmkörper (Epitopemapping)**

Die pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen der Immunantwort gegen substituierten Faktor VIII sind bisher kaum geklärt. Die meisten Studien beschäftigen sich ausschließlich mit dem Auftreten von neutralisierenden Antikörpern (Inhibitoren). Jedoch stellen die neutralisierenden Antikörper nur einen Teil der Immunantwort gegen FVIII dar (Gilles et al., 1993). Um die immunologischen Reaktionen gegen FVIII besser zu verstehen, sollten alle Antikörper (neutralisierende und nicht-neutralisierende) erfasst werden. Mit Hilfe dieser Untersuchungen kann evtl. geklärt werden, ob sich die Immunogenität gegenüber rFVIII bzw. pdFVIII-Präparaten unterscheidet und wenn ja, inwiefern.

Zudem könnte die Frage beantwortet werden, ob die Behandlung mit bestimmten Präparaten mit einer Antikörperbildung gegen bestimmte Epitope des FVIII (Epitopenspezifität) einhergeht (Prescott et al., 1997).

Außerdem soll das Auftreten von neutralisierenden und nicht-neutralisierenden Antikörpern mit bekannten Mutationstypen und Präparaten der Patienten korreliert werden.

Daher sollen im Rahmen der Studie bei den bereits behandelten Patienten, die bis zur 50. Exposition substituiert wurden, parallel zu den Inhibitoruntersuchungen (Bethesda-Test) die Untersuchung auf das Vorliegen neutralisierender und nicht-neutralisierender Antikörper und deren Charakterisierung (Epitopemapping) erfolgen, und zwar mit einem Immunpräzipitationstest.

### 1.11 Fragestellung und Studienziel

In dieser Inzidenz-Studie soll für erstbehandelte Hämophilie A und B-Patienten das kumulative Risiko der Entwicklung eines Inhibitors ermittelt werden. Dabei ist die „kumulative Inzidenz“ die Anzahl der Inhibitorpatienten, die über einen sehr langen Beobachtungszeitraum erfaßt werden. Die Inhibitorwirkung soll qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Bei nachgewiesenem Inhibitor wird durch festgelegte Kontrollzeitpunkte der Inhibitorenverlauf bestimmt und dokumentiert.

Bei nachgewiesenen Inhibitoren soll die klinische Relevanz überprüft werden.

Im Rahmen dieser Studie werden folgende Parameter untersucht und mit der Hemmkörperentwicklung korreliert:

- Diagnose HA oder HB
- Schweregrad der Hämophilie
- Alter bei Erstexposition mit FVIII oder FIX und Alter bei Hemmkörperentwicklung
- Anzahl der Expositionstage bis zur Hemmkörperentwicklung, vor allem bei schwerer Hämophilie
- Therapieregime (Prophylaxe oder Bedarf)
- Dosierung und Art des Faktorenpräparates
- Fragestellungen zur Inhibitorbildung aus genetischer, immunologischer und molekularbiologischer Sicht. Es sollten Mutationstyp, neutralisierende und nicht-neutralisierende Antikörper gegen Faktor VIII bzw. IX bestimmt werden.

Die Studie schließt Hämophilie A- bzw. B-Patienten unabhängig vom Schweregrad und Lebensalter ein, die noch nicht mit Plasmaderivaten therapiert wurden. Diese sind sogenannte „PUPs“, d.h. „previously untreated patients“, also zuvor unbehandelte Patienten.

## 2 Patienten und Methoden

### 2.1 Methoden Studiendesign

Bei dieser Studie handelt es sich um die weltweit größte prospektive Multicenter-Studie zur Entwicklung von Hemmkörpern bei zuvor unbehandelten Patienten mit Hämophilie A und B. Sie wurde im Juni 1993 am Zentrum der Kinderheilkunde, Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/ Main, begonnen. Die geplante Studienzeit wurde auf 15 Jahre, der Rekrutierungszeitraum auf 10 Jahre festgelegt. Der Beobachtungszeitraum vom Stand Februar 2003 beträgt bisher 9,25 Jahre.

Die Erhebung der Patientendaten erfolgt mittels standardisierter Anamnesebogen. Diese dokumentieren die persönlichen Daten der Patienten wie Diagnose, den Schweregrad der Hämophilie A oder B und das eventuelle Auftreten eines Hemmkörpers.

#### 2.1.1 Anamnesebogen

Anamnesebogen für Patienten ohne Hemmkörperentwicklung:

Patientencode (Name, Geburtsdatum des Patienten und Name des Behandlers):

Diagnosezeitpunkt:

Familienanamnese : ja/nein

Ausschluß von Willebrand-Faktor: ja/nein

Hämophiliotyp : A oder B

Restaktivität in %:

Datum der Erstbehandlung (1.ED):

Körpergewicht in kg:

Behandlung mit speziellem Präparat (Handelsname):

Faktor VIII- bzw. IX-Einheiten:

Anzahl der Expositionstage mit Datum:

Präparatewechsel (wenn ja, Datum):

Anamnesebogen für Patienten mit Hemmkörperentwicklung:

Dieser sieht wie oben beschrieben aus mit folgenden zusätzlichen Daten:

Erstauftreten des Hemmkörpers (Datum):

Dauer bis Auftreten des Hemmkörper:

Alter des Patienten bei Erstauftreten:

Auftreten des Hemmkörpers nach der .....ED:

### **2.1.2 Patientenkollektiv**

Das Patientenkollektiv setzt sich aus 275 zuvor unbehandelten Hämophiliepatienten zusammen (PUPs), die in verschiedenen Zentren Deutschlands sowie in der Schweiz und in Österreich behandelt werden.

„PUPs“ bedeutet previously untreated patient, d.h. es sind Hämophiliepatienten, die zuvor mit keinem Faktorenpräparat behandelt wurden.

Die Patienten werden je nach Art ihrer Hämophilie in HA- und HB-Patienten unterschieden.

In die Studie eingeschlossen sind 233 Hämophilie A- und 42 Hämophilie B-Patienten.

Zusätzlich werden von jedem Patienten folgende persönliche Eigenschaften dokumentiert:

- der Ort des Behandlungszentrums
- der Schweregrad der Hämophilie A oder B
- das Alter bei Erstsstitution
- der Mutationstyp
- Therapieregime (Bedarf oder Prophylaxe oder kontinuierliche Infusion)
- Typ des Gerinnungspräparates mit Namen, rekombinant (r) oder Plasma-derived (pd)
- Hemmkörperentwicklung: ja/nein
- Beobachtungszeitraum vom Zeitpunkt der Erstbehandlung an

## 2.2 Studienplan

Nach der Diagnosestellung (Hämophilie A oder B und Bestimmung der Restaktivität von Faktor VIII bzw. IX) erfolgt die erste Inhibitorenbestimmung vor der ersten Substitutionsbehandlung mit Gerinnungskonzentrat. Diese „Leerwert-Untersuchung“ ist notwendig, da auch zwischen 0,5% und 1% Inhibitoren gegen Faktor VIII bei gerinnungsgesunden Blutspendern nachgewiesen werden können (Budde 1991), nach Angaben anderer Autoren (Algiman et al., 1992) sogar 17%.

Nach der ersten Substitutionsbehandlung werden Blutuntersuchungen (1,3–3 ml ungekühltes Zitratblut) auf das Vorliegen eines Inhibitors durchgeführt:

- bei klinischem Verdacht auf eine Hemmkörperwirkung
- in der Anfangsphase der Therapie alle 3-4 Expositionstage (innerhalb der ersten 20 Expositionstage)
- danach jeden 10. Expositionstag bis zur 200. Exposition
- nach der 200. Exposition alle 3-6 Monate
- bei selten substituierten Patienten alle 3 Monate
- nach Präparatewechsel sollten die Inhibitor-Aktivitätsbestimmungen wie bei bisher noch nicht vorbehandelten Hämophilen einschließlich einer neuen „Leerwertbestimmung“ durchgeführt werden.

Grundsätzlich muß jeder nachgewiesene Inhibitor durch eine kurzfristige zweite Blutentnahme bestätigt werden. Als Grenzwert für einen Inhibitornachweis gilt der qualitative Nachweis von 0,6 Bethesda-Einheiten.

Die Untersuchung auf das mögliche Vorhandensein eines Inhibitors erfolgt nach der modifizierten Bethesdamethode im Referenzlabor (Prof. Dr. Budde, Hamburg). Außer der Testung gegen humanen FVIII bzw. IX erfolgt ebenfalls eine Austestung gegen rekombinanten und porcinen FVIII sowie ein qualitativer Inhibitornachweis mit Hilfe einer Agarose-Gel-Technik.

Die Erfassung des Patienten und seiner Erkrankung erfolgt nach Einverständniserklärung zur Studienteilnahme seitens des Patienten in verschlüsselter Form auf einem Dokumentationsbogen (Aufnahmebogen A) beim jeweiligen Behandler.



Zur Inhibitoruntersuchung werden 1,3-3 ml ungekühltes Zitratblut zusammen mit dem Dokumentationsbogen an das Referenzlabor verschickt. Vom Referenzlabor wird der Bogen nach Eintrag der Laborwerte als Durchschlag der zentralen Dokumentationsstelle (Herr PD Dr. Kreuz, Frankfurt) zugesandt. Zur Dokumentation der weiteren Behandlungsdaten einschließlich der Inhibitornachweise dienen im weiteren Studienverlauf die Studienbögen B und C, die ebenfalls mit der ungekühlten Zitratvollblutprobe an das Referenzlabor verschickt werden.

### **2.2.1 Therapeutika und Therapieregime**

Therapeutisch werden Gerinnungskonzentrate verschiedener Hersteller in üblicher, an klinischem Erfolg und Laborkontrollwerten orientierter Dosierung angewandt. Es wird davon ausgegangen, daß die Substitutionsbehandlung als Bedarfsbehandlung oder, wenn nötig, als blutungsverhütende Dauertherapie durchgeführt wird. Es sollte angestrebt werden, das Gerinnungspräparat nicht zu wechseln, um eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Präparate zu ermöglichen. Ein Präparatewechsel aus therapeutischen Gründen ist jedoch jederzeit möglich.

### **2.2.2 Genetische Faktoren**

Mehrere Studien konnten zeigen, daß der Mutationstyp als ein erheblich prädisponierender Faktor bei der Entwicklung von Inhibitoren eingestuft wird (Oldenburg et al., 1997; Schwaab et al., 1995). Die Untersuchung der Mutation ist daher zum Vergleich der Studienergebnisse mit anderen Studien und zum Vergleich von Subgruppen (rekombinante und plasmatische Präparate) innerhalb der Studie notwendig.

Zur Mutationsanalyse ist die Entnahme von 2-10 ml EDTA-Blut notwendig. Die Analyse bei Hämophilie A-Patienten sollte im Biozentrum, Institut der Humangenetik der Universität Würzburg unter Leitung von Herrn Dr. Schröder/ Dr. Oldenburg durchgeführt werden und bei HB-Patienten im Institut für Humangenetik der Universität Greifswald, Prof. Dr. F. Herrmann.

### 2.2.3 Studienausschluß- und Studienabbruch-Kriterien

Patienten mit nicht eindeutiger Diagnose Hämophilie A bzw. B (z.B. bei gleichzeitigem von Willebrand-Syndrom) sollten von der Studie ausgeschlossen werden. Ebenso sollten Patienten mit unklarer Anamnese bzgl. früherer therapeutischer Maßnahmen ausgeschlossen werden.

Studienabbruch kann möglich sein, wenn eindeutige wissenschaftliche Erkenntnisse während des Studienzeitraumes vorgelegt werden, die eine Fortsetzung der Studie nicht mehr rechtfertigen. Ebenso könnte es möglich sein, bestimmte Gerinnungspräparate nicht mehr verwenden zu können.

Über Studienausschluß bzw. Studienabbruch sollte die Studienkommission mit einfacher Mehrheit entscheiden.

## 2.3 Statistische Methoden und verwendete Software

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Lehrbuch von P. Zöfel: „Statistik in der Praxis“, 2. Auflage, UTB/ Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1988.

### Berechnung des Mittelwertes

Der Mittelwert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} = 1/n * \sum x_i$$

Dabei sind n die Anzahl der Werte und x der Meßwert.

### Berechnung des Medians (Zentralwert)

Der empirische Median teilt die Stichprobenwerte in zwei Hälften: Die eine Hälfte der Daten ist höchstens so groß wie der Median, die andere Hälfte ist mindestens so groß. Um diese Kenngröße x zu ermitteln, werden die Zahlenwerte aus einer bestimmten Reihenfolge so umgeordnet, daß eine Datentabelle entsteht, in der die Meßwerte „m“ der Größe nach geordnet sind.

Bei ungeradzahliger Anzahl wird der in der Mitte stehende Wert als charakteristisch angesehen (Median). Stehen in der Tabelle eine gerade Anzahl von Meßwerten, so wird der Mittelwert der beiden benachbarten mittleren Werte herangezogen (Pseudomedian). Der Median ist ein besseres Maß für den häufigsten Wert als der Mittelwert. Dies gilt in allen Fällen, besonders aber bei schiefen oder mehrgipfeligen Verteilungen.

#### Der exakte Test nach Fisher (Fisher's Exact-Test)

Es seien

	<i>Positives Ergebnis</i>	<i>Negatives Ergebnis</i>
<i>Gruppe A</i>	a	b
<i>Gruppe B</i>	c	d

die gegebenen Häufigkeiten der Vierfeldertafel.

Berechnung des Ausdrucks:

$$f = (a+b+c+d) / (a+b)$$

Für die gegebene und alle  $m$  unwahrscheinlicheren Verteilungen mit gleichen Randsummen werden die Ausdrücke

$$W_j = (a_j + c_j / a_j) * (b_j + d_j / b_j)$$

mit  $j = 0, \dots, m$  berechnet.

Dabei sind  $a_0, b_0, c_0, d_0$  mit  $a, b, c, d$  gleichzusetzen, während mit den höherwertigen Indizes die unwahrscheinlicheren Verteilungen gemeint sind.

Berechnung der gesuchten Wahrscheinlichkeit zu

$$p = 1/f * \sum_{j=0}^m w_j$$

Dabei entspricht  $p < 0,05$  einer Signifikanz auf der 5%-Stufe,  $p < 0,01$  einer Signifikanz auf der 1%- Stufe usw.

#### Verwendete Software

Die Berechnung, Auswertung und Darstellung erfolgte mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel 97, Bias 7.06 (2001) und Canvas.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Reagenzien, Apparate und Verbrauchsmaterial

##### Chemikalien und Reagenzien

Tris-Glycin-Gel 4-20%	ICN Cat. No.82-1889
Clean Gel SDS	ETC
Molekulargewichtsmarker Precision Plus Standards	Bio Rad Cat.No. 162
Plus 2 Pre-stained Standard	Invitrogen
L-35 S-Methionin, 37 MBq/1 mCi	A. Pharmacia
RNAse Ribonuclease Inhibitor	Promega
Protein A-Sepharose 4 fast flow	A. Pharmacia
Lumasafe	Perkin Life Sciences
Natrium-dodecyl-sulfat (SDS)	Bio Rad
Tris gepufferte Kochsalzlösung (10* TBS)	Bio Rad
SDS-Buffer-Strips	A. Pharmacia
DMSO (Dimethyl sulfoxide) 500 ml	Bio Rad
Tween 20	Bio Rad

##### Technische Apparate

Power Supply Model 1000/ 500	Bio Rad
Power Supply für Blotkammer	A. Pharmacia
Gel Loading Tips, Protein Elec Tips,	Bio Rad
Western blot amplification modul, Cat.No. 170-8230	Bio Rad
MultiImager	Bio Rad
Kühlgerät Multi Temp 3	Amersham
Hoefer Speisegerät EPS 2A 200	Amersham
Hoefer Blot Kammer, Model TE 62	Amersham
Mini-Protean 3 Elektrophoresegerät	Bio Rad
Geltrockner	Bio Rad
Hybridisierungsbags	Roche

Hypercassette	A. Pharmacia
Vortexgerät	Labinco
Mikrozentrifuge	Eppendorf
Szintillationsgerät (Counter)	Pakard
Hitze-Block	Stuart Scientific
PH-Meter	Schott
Wasserbad 37/ 95°C	JULABO
Plastikschalen für Immunblotfärbungen	Fischer
Multipette	Eppendorf
Gefrierschrank – 80°C	Colora/Heraeus

### 3.1.1 Verbrauchsmaterial

Nitrocellulosemembran, Hybond ECL	A. Pharmacia
Trans Blot Papier 15*20 cm	Bio Rad
Eppendorf Cups (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf
Reagenzröhrchen (Plastik)	Greiner
Spitzen für Pipetten	Eppendorf
ART Filter Tips	Promega
Hypercassette	A. Pharmacia
Kodak X-ray Film C.60	Agfa
Plastikflaschen (Milli-20 PE)	Lumcic
Filterpapier Nova Bbt	Amersham
	Biosciences

### 3.1.2 Verwendete Testkits

Signal pIg-tail Expressionssystem	R & D Ingenius
TNT Retikulozytenlysat	Promega kit
Plus One Kit	A. Pharmacia
Opti-4CN-Substrat Kit	Bio Rad

### 3.1.3 Verwendete biologische Präparate

#### *FVIII-Produkte*

Haemoctin® SDH	Biotest/ Dreieich
Beriate®	Aventis/ Marburg
Immunate®	Baxter/ Wien
Haemate®	Aventis/ Marburg
Profilate®	Grifols/ Langen
Kogenate®	Bayer/ Leverkusen
Recombinat®	Baxter/ Wien
Refacto®	Wyeth/ Münster
Octanate®	Octaplasma/ Wien

#### Verwendete Chargennummern:

Octanate® : 040622120 + 027608120 + 038616120

Octanate®: 228577120 + 226573120 + 234033120

Immunate®: 09H1200A + 09H3400L + 09H2000 I

Haemoctin®: 163732+ 163802 + 163752 + 163121 + 163201

Haemate®: 21166411A + 15966411A + 11266411A

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

#### NET-Gel- Puffer:

Igepal CA-630	Sigma
Gelatine	Bio Rad
Tris-Base	Roche
Natriumchlorid	Vel
EDTA	Vel
BSA (Albumin, Bovine Serum)	Calbiochem

Probenpuffer

2-Mercaptoethanol 98%	Janssen
Bromphenolblau	Merck
Tris Base	Vel
SDS	Acros organics
Glycerol 87 %	Merck

SDS-Laufpuffer

10 * Tris-Glycin Laufpuffer, (Tris 0,25 M; Glycin 1,9 M; SDS 1%)	ICN Cat.No. 821846
---	--------------------

Probenpuffer

-2* SDS Probenpuffer, (Tris 0,125 M, Sucrose 10%, Bromphenolblau 0,02%, SDS 2%)	ICN No. 821696
-2* SDS Probenpuffer mit 2-Mercaptoethanol (+ 2 Mercaptoethanol 5%)	ICN Cat.No. 821695
Molekulargewichtsmarker Precision Plus Standards	Bio Rad Cat.No. 162-0373

Blockierpuffer (1. + 2.):

1.) 10mal konzentrierte PBS Stammlösung, pH 7,8

0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wasserfrei 14,2 g und

1,4 M NaCl 81,8 g

werden mit 800 ml Aqua dest. gelöst, der PH-Wert wird auf 7,8 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

2.) 5 g Non Fat Dry Milk ( Bio Rad Cat.No. 170-6404) werden in 200 ml Aqua dest. gelöst (0,5% ig).

Nach Zugabe von 100 ml 10 \* konz. PBS-Lösung und 1 ml Tween 20 wird 30 min gerührt. Man füllt mit Aqua dest. ad 1000 ml auf.

PBST 0,1%

200 ml 10 \* konz. PBS-Stammlösung werden mit 1800 ml Aqua dest. und 2 ml Tween 20 gemischt.

Blotting Puffer nach Ingerslev

1) 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wasserfrei 70,98 g/l (warm lösen)

2) 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ : 39 g/ 500 ml

Zu 700 ml Lösung von 1.) gibt man ca. 140 ml Lösung 2.), bis der pH-Wert von 7,4 erreicht ist. Danach wird 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und 0,04% SDS zugefügt.

Zu 800 ml pH 7,4 gibt man 7200 ml Aqua dest. und 3,2 g SDS.

Der pH-Wert wird nicht mehr korrigiert.

**3.1.5 Verwendete Antikörper**

1.) Sheep Anti Human Faktor VIIIIC, affinity purified IgG

Cedarlane CI 20035 AP

Biozol Diagnostika

2.) Rabbit Anti Sheep IgG (H+ L) HRP Conjugate,

Southern Biotechnology Cat.No. 6155-05

Biozol Diagnostika



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese (4-20%) und anschließende Silberfärbung

#### Prinzip:

Infolge der Beladung von Proteinen mit dem anionischen Detergenz Natrium-dodecylsulfat (SDS) entstehen SDS-Polypeptid-Mizellen, die nach Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Polyacrylamid-Gel zur Anode wandern. Die Wanderungstrecke steht dabei in einer linearen Beziehung zum logarithmierten Molekulargewicht des Proteines. Nach Auftrennung können die Proteine im Gel mit Silber gefärbt und deren Größe im Vergleich mit einem aufgetrennten Proteinstandard bestimmt werden.

#### Durchführung:

##### Versuch 1:

Je drei verschiedene Chargen der Präparate Octanate® (100 E/ml), Haemate® (33,3 E/ml) und Haemoctin® (100 E/ml) wurden untersucht. Die Auftrennung der Proteinbanden erfolgte in zwei 4-20%-igen Tris-Glycin-Gelen. Ein Gel davon diente der Darstellung der reduzierten Proteinbanden.

Die Proben wurden mit 0,9% NaCl auf folgende Konzentration E/ml FVIIIIC verdünnt: Octanate® 3,1 E/ml (1:16), Haemate® 0,8 E/ml (1:40) und Haemoctin® 3,1 E/ml (1:16).

Danach wurden je 50 µl Probe mit 50 µl zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer vermischt.

Für die Reduzierung wurde je 50 µl Mercaptoethanol-SDS-Probenpuffer verwendet.

Alle Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend abgekühlt.

Danach wurden alle Proben mit je 10 µl Jodacetamid versetzt und für 30 min inkubiert.

Der Standard wurde 1:25 mit 0,9% NaCl verdünnt und anschließend 1:1 mit SDS-Probenpuffer.

Je 11 µl Präparateproben und je 10 µl Standard wurden auf 2 Gele aufgetragen.

Die Laufzeit des Geles betrug 1 h bei konstant 150 Volt.

## Versuch 2

3 verschiedene Chargen der Präparate Octanate® (100 E/ml), Immunate® (100 E/ml) und 5 Chargen Haemoctin® (100 E/ml) wurden untersucht. Die Auftrennung der reduzierten und nicht-reduzierten Proteinbanden erfolgte in einem 7,5 %-igen Tris-Glycin-Gel (ETC).

Die Proben wurden mit Aqua dest. 1:12,5 vorverdünnt und dann 1:3 mit SDS-Probenpuffer, so daß eine Endkonzentration von 2 E/ml FVIIIIC erreicht wurde. Für die reduzierten Proben wurden noch 10 µl 1%ige DDT-Lösung zugesetzt. Alle Proben wurden 5 min bei 95°C erhitzt und dann in Eiswasser abgekühlt. Danach wurden alle Proben mit je 10 µl Jodacetamid versetzt.

Der Marker „Prestained Protein Standard, broad range“ wurde 1:20 mit Aqua dest. vorverdünnt und dann 1:3 mit SDS-Probenpuffer versetzt.

Nach ca. 10 min wurde von jeder Probe je 15 µl auf das Gel aufgetragen.

Die Laufzeit betrug 2 h 45 min bei 1500 V und 35 mA.

### **3.2.2 Silberfärbung der Gele**

Die Proteine wurden mit dem Plus One Kit silbergefärbt.

Mit diesem erfolgte im ersten Schritt eine Fixierung der Proteine durch 100 ml Ethanol und 25 ml Essigsäure, aufgefüllt auf 250 ml H<sub>2</sub>O.

Nach Sensibilisierung in einer Lösung mit 0,125% Glutardialdehyd, 0,2% Natriumthiosulphat und 0,5 M Natriumacetat folgte die Silberreaktion mit einer Silbernitratlösung (25 ml) und Formaldehyd (0,1 ml).

Die Entwicklung erfolgte in einer 0,06 M Natriumcarbonatlösung mit 0,0075% Formaldehyd (aufgefüllt auf 250 ml H<sub>2</sub>O).

Die Färbung wurde mit einer 0,04 M Na-EDTA-Lösung gestoppt.

Zuletzt wurde das Gel für 30 min in 150 ml Gel Trocknungslösung inkubiert und anschließend über Nacht in Cellophane getrocknet.

Die Auswertung der getrockneten Gele erfolgte optisch mit dem MultiImager.

### 3.2.3 Immunblot von FVIII-Produkten

#### Prinzip der Methode:

Die Proteine werden in einer 7,5%-igen SDS-Page wie beschrieben aufgetrennt und dann auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

Der Nachweis der FVIII-Moleküle erfolgt nach folgendem Schema:

- Detektion des FVIII- Zugabe von Anti-Faktor VIII-IgG (vom Schaf)
- Detektion des Schaf-IgG- Zugabe von Anti-Schaf-IgG HRP konjugiert
- Streptavidin-HRP-Detektion- Zugabe von Streptavidin-HRP
- Enzym-Substrat-Reaktion- Zugabe von Opti 4CN Substrat

Die Größe der FVIII-Moleküle wird im Vergleich mit einem ebenfalls aufgetrennten Proteinstandard bestimmt.

Die Intensität der Farbreaktion ist von der gebundenen Antikörper-Konzentration abhängig, die wiederum von der FVIII-Fragment-Konzentration abhängt.

Mit Hilfe des Scannens einzelner Banden und optischer Auswertung wird die Konzentration der entsprechenden FVIII-Fragmente verglichen.

#### Durchführung

Probenvorbereitung und Auftrennung erfolgten wie oben unter 3.2.1. beschrieben.

Das Gel wurde nach der Auftrennung zweimal für 10 min in Phosphat-Puffer nach Ingerslev ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,04%SDS) äquilibriert. Ein in Blotpuffer äquilibriertes zugeschnittenes Stück Nitrozellulosemembran wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt.

Zwischen 2 Filterpapieren fixiert, erfolgte der Elektroblot über 2 h in einer auf 15°C gekühlten Blotkammer bei einer Spannung von 20 V und einer Stromstärke von ca. 1,9 A. Nach Ende des Blot-Transfers wurden die Membranen in 0,1% PBSB befeuchtet und 2-mal je 5 min in PBS-Lösung gewaschen. Die Detektion der FVIII-Banden erfolgte in mehreren Schritten:

### Blockieren

Vor der Antikörperbindung müssen die auf der Membranoberfläche verbliebenen unspezifischen Bindungsstellen blockiert werden.

Dazu wurden die Membranen über Nacht im Kühlraum in Blockierpuffer geschüttelt.

Danach wurde die Membran 3mal je 10 min mit PBST 0,1% gewaschen.

### 1. Antikörper-Inkubation

Anti-Human Faktor VIIIc vom Schaf, CI 20035 AP, wurde 1:2000 verdünnt:

D.h. 20 µl AK wurden mit 40 ml Blockierpuffer gemischt und 1 h bei RT inkubiert.

Danach wurde die Membran je 4 mal 10 min mit PBST 0,1% gewaschen.

### 2. Antikörper-Inkubation

Anti-Schaf IgG (H+L) vom Kaninchen HRP konjugiert, wurde 1:2000 verdünnt.

(Wie bei der 1. AK-Inkubation beschrieben).

Danach wurde die Membran wie oben beschrieben gewaschen.

### Inkubation mit BAR

Für eine Membran wurden 20 ml konz. Amplification Diluent, 4\* konz. BAR (10ml) und 10 ml Aqua dest. gemischt und 10 min unter Schütteln inkubiert.

Danach wurden 20 ml DMSO mit 80 ml PBST 0,1% gemischt und die Membran wurde darin je 2 mal 10 min inkubiert.

Danach wurde die Membran in PBST 0,1% zweimal je 10 min gewaschen.

### Inkubation mit Streptavidin-HRP

Streptavidin HRP wurde mit Blotto 1:1000 verdünnt und jeweils 40 ml zu einer Membran in die Schale gegeben.

Nach 30 min wurde die Membran erneut 4mal je 10 min mit PBST 0,1% gewaschen.

### Farbentwicklung mit Opti 4CN Substrat

Zuletzt wurden die gebundenen Antikörper mit dem Opti 4CN-Substrat Kit (Bio Rad) mit einer Farbreaktion nachgewiesen.

### Auswertung

Die Immunblots wurden im MultiImager optisch aufgenommen und einzelne Banden gescannt. Die Berechnung des Anteils der schweren bzw. leichten Kette wurde als Mittelwert der einzelnen Banden berechnet.

### **3.2.4 Methode der Hemmkörperbestimmung (Bethesda-Assay)**

#### Prinzip:

Die Bestimmung der Hemmkörper wird nach der modifizierten Bethesda-Methode (Kasper et al., 1975) durchgeführt. Die Faktor VIII-Bestimmung erfolgt mit der Einstufenmethode. Diese Methode beruht auf der Messung und Korrektur der Gerinnungszeit eines FVIII-Mangelplasmas bzw. Hämophilie-Plasmas durch den FVIII, der zu diesem FVIII-Mangelplasma hinzugefügt wird.

Bei der Erstellung der Bezugskurve mit der Einstufenmethode sollte das Coagulation Reference Plasma verwendet werden.

Um die Stärke eines FVIII-Inhibitors zu bestimmen, werden folgende Lösungen gebraucht:

#### 1. Probe:

Die zu untersuchende Citratplasmprobe, unverdünnt oder verdünnt mit Imidazolpuffer, wird 1:2 (1 Teil + 1 Teil) mit dem Faktor VIII-Normalplasma (1 IE. Faktor VIII/ml) gemischt.

#### Normalplasma (Kontrollmischung):

Es wird zu gleichen Teilen (1 Teil + 1 Teil) mit dem Imidazolpuffer verdünnt und analog zur Probe weiterbehandelt. Die Kontrollmischung dient als Bezugswert zur Berechnung der %-FVIII-Restaktivität jeder Probe. Sie muß jedesmal mitbestimmt werden.

Faktor VIII-Inhibitorplasma:

Von dem Inhibitorplasma, dessen Bethesda-Einheiten bekannt sind, werden drei geometrische Verdünnungen als positive Kontrolle mitbestimmt.

Faktor VIII Inhibitor- freies Plasma:

Zur Beurteilung eines sehr schwachen FVIII-Inhibitors bzw. zu dessen Ausschluß soll das FVIII Inhibitor-freie Plasma als negative Kontrolle (ohne Inhibitor) unverdünnt und 1:2 verdünnt mitgetestet werden.

Die zu bestimmenden Plasmaproben können in drei Testgruppen eingeteilt werden, die sich in der Inhibitorstärke (von <1 BE/ml bis >10 BE/ml) unterscheiden.

Für jede dieser Gruppen ergeben sich andere Verdünnungen für den Testansatz.

Von der zu bestimmenden Plasmaprobe mit unbekanntem Faktor VIII-Inhibitorgehalt wird mit Imidazolpuffer eine Verdünnungsreihe erstellt.

Dann wurde je 1 Teil Probe (0,2 ml) mit 1 Teil Faktor VIII-Normalplasma (0,2 ml) gemischt.

Die Proben wurden genau 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend deren Faktor VIII-Gehalt bestimmt.

Die Faktor VIII-Restaktivität wird in Prozent angegeben und wird über folgende Gleichung ermittelt:

$$\% \text{ FVIII-Restaktivität} = (\text{FVIII-Gehalt der Probe} * 100) / (\text{FVIII-Gehalt der Kontrollmischung})$$

Eine Testprobe hat keinen Inhibitor, wenn der FVIII-Gehalt der Probe gleich dem der Kontrollmischung ist, d.h. deren % Faktor VIII-Restaktivität 100% beträgt (FVIII-Gehalt der Kontrollmischung wird als 100% angesetzt).

Eine Testprobe mit einer Restaktivität von 50% Faktor VIII enthält eine Bethesda-Einheit Faktor VIII-Inhibitor/ml. Eine Testprobe wird als positiv definiert, wenn der minimale Titer 0,6 Bethesda-Einheiten überschreitet!

Die Auswertung erfolgt mittels der linearen graphischen Darstellung, wobei logarithmisch die %-FVIII-Restaktivität und arithmetisch die Einheit FVIII-Inhibitor/ml aufgetragen werden. Auf dieser Geraden werden alle FVIII-Restaktivitäten zwischen 25% und 75% abgelesen. Die erhaltenen Einheiten FVIII-Inhibitor/ml müssen dann nur

noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die Bethesda-Einheiten der Probe per ml zu erhalten. Es kann auch die der graphischen Darstellung zugrundeliegende Gleichung verwendet werden:

$$\text{FVIII-Inhibitor (BE)} = [2 - \log(\text{Restaktivität FVIII})] / 0,30103$$

### 3.3 Epitopemapping (Belgien, Leuven)

#### Prinzip:

##### 1) Translation:

Der Test basiert auf der „in vitro“-Transkription/ Translation von FVIII-Genen, die unter der Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase Promotors stehen. Für die Klonierung der Gene wurde der Vektor Signal pIgplus (6341 bp) verwendet.

Die Restriktion erfolgte mit dem Restriktionsenzym Not 1.

Lineare DNA, die die Sequenz der Wahl enthält, wird zum Retikulozytenlysat hinzugefügt, das 35 S-Methionin enthält. Die m-RNA wird durch die Polymerase gebildet. Infolge Translation der m-RNA entstehen bestimmte Mengen an Polypeptiden, die von den Retikulozyten-Ribosomen gebildet werden.

Die Polypeptide werden mit dem radioaktiven Marker 35 S versehen.

##### 2) Immunpräzipitation:

Das Patientenplasma wird zum translatierten Polypeptid hinzugefügt. Falls spezifische Antikörper gegen das Polypeptid vorhanden sind, werden Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet, die präzipitiert werden können. Die Radioaktivität im Pellet kann dann gemessen werden. Die Patientenplasmen können weiterhin mittels Gelelektrophorese und Autoradiographie analysiert werden, um die Größe des Polypeptides zu ermitteln.

DNA verschiedener Länge und Zusammensetzung kann für den Test vorbereitet werden.

(Plasmapools von Menschen oder von Maus dienen als Negativkontrolle, während polyklonale Antikörper gegen jedes der Polypeptide von gesunden Individuen als Positivkontrolle dienen.)

### 3.3.1 Translation

Die FVIII-DNA wurde in das Signal pIg-Tail-Expressionsplasmid cat. MBK-006-5 (6341 bp) kloniert.

Für die Translation des zirkulären Plasmides wurde folgende 50 µl Reaktionsmischung für 1,5 Stunden bei 30°C inkubiert:

- 25 µl „Rabbit“-Retikulozytenlysat
- 2 µl Reaktionspuffer
- 1µl RNA-Polymerase
- 1 µl Aminosäure ohne Methionin
- 2 µl 35 S-Methionin (37 MBq/1 mCi)
- 1 µl RNase Ribonuclease Inhibitor
- 1 µg Vektor-DNA
- 18 µl H<sub>2</sub>O RNase frei

Die Translationsprodukte (35 S-Polypeptid) wurden nun durch SDS-Page (10%) voneinander getrennt.

Dafür wurden zunächst 5 µl der 50 µl Reaktionsmischung zu 20 µl SDS-Sample Puffer hinzugefügt. Die Mischung wurde bei 100°C für 3 min inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. 5 µl der denaturierten Mischung wurden auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde bei einem konstanten Strom von 15 mA innerhalb des Sammelgeles und 30 mA innerhalb des Trenngeles durchgeführt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die markierten Proteinbanden auf dem Gel durch Fluorographie sichtbar gemacht. Fluorographie verstärkt die Sensitivität der Erkennung von 35 S-markierten Proteinen erheblich.

Zu diesem Zweck wurde das Gel zunächst für 30 min in 20% Methanol, 20% Norvanol und 7% Essigsäure und danach für 30 min in „Amersham’s Amplify“ (Amplify fluoreszierendes Reagenz) getaucht. Dadurch werden die Proteine auf dem Gel fixiert.

Danach wurde das Gel unter Vakuum bei 80°C für 1,5 Stunden getrocknet und in trockenem Zustand auf einem Kodak Scientific Imaging Film (X-Omat blue XB-1) bei -80°C über Nacht exponiert.



### 3.3.2 Immunpräzipitation (Patientenproben)

#### 1. Vorbereitung der Protein A -Sephrose

600 µl Protein A-Sephrose pro Eppendorf-Cup wurden für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml NET-Gelpuffer resuspendiert. Die Mischung wurde 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und dieser Schritt (Überstand abnehmen, Pellet + NET-Gelpuffer, zentrifugieren) nochmals wiederholt.

Das Pellet wurde mit je 400 µl NET-Puffer pro E.Cup resuspendiert.

#### 2. Schritt:

500 µl NET-Gelpuffer pro E.Cup + 40 µl vorbereitete Protein A-Sephrose + 30 µl Patientenplasma wurden 1 h bei 4°C leicht geschüttelt.

#### 3. Waschen

Die Proben wurden 1 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet (Antigen-Antikörper-Komplex) mit 1 ml NET-Gelpuffer resuspendiert. Die Proben wurden 10 min bei 4°C geschüttelt und danach 1 min bei 12000 g zentrifugiert. Diese Vorgänge 1-3 wurden wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 300 µl NET-Gelpuffer resuspendiert.

Nun wurde zu jeder Probe je 3 µl vom Translationsprodukt hinzugefügt. Die Proben wurden für 2 h bei 4°C und leichtem Schütteln inkubiert.

Nun folgten vier Waschschrte mit NET- und Waschpuffer. Diese sahen so aus:

- Waschen: 20 min mit 1 ml NET-Puffer
- Waschen : 15 min mit 1 ml NET-Puffer
- Waschen: 15 min mit 1 ml Waschpuffer
- Waschen: 15 min mit 1 ml Waschpuffer

Bei den Waschphasen wurden ungebundene Fragmente vom Plasma entfernt.

Das Pellet der Proben wurde mit je 30 µl Probenpuffer vermischt und 3 min bei 100°C erhitzt. Die Proben wurden dann 1 min bei 12000 g zentrifugiert. Hierbei wurde der Antigen-Antikörper-Komplex von der Protein A-Sephrose getrennt.

Es wurde je 26  $\mu$ l Probe mit 4  $\mu$ l Probenpuffer vermischt und davon 15  $\mu$ l auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen.

Um die Radioaktivität zu messen, wurden je 2  $\mu$ l Immunpräzipitationsprodukt mit 5 ml Lumasafe vermischt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Eingeschlossene und behandelte Hämophilie A- und B-Patienten

Um die Inhibitorentwicklung bei vorher unbehandelten Hämophilie A- und B-Patienten (PUPs) zu bestimmen, wurde die GTH-Studie im Juni 1993 begonnen.

Bis Februar 2003 wurden 275 Patienten in die Studie eingeschlossen, und zwar 233 Hämophilie A- und 42 Hämophilie B-Patienten. Die Anzahl der Patienten wurde nach dem Schweregrad der Hämophilie bzw. der Restaktivität des betreffenden Faktors unterteilt:

Tabelle 2

Anzahl der eingeschlossenen Hämophilie-Patienten

Schweregrad	Hämophilie A	Hämophilie B
Schwer ( $\leq 1\%$ )	118 (50,6 %)	17 (40,5%)
Mäßig ( $>1-5\%$ )	58 (24,8%)	18 (42,8%)
Mild ( $>5\%$ )	57 (24,4%)	7 (16,6%)
<b>Insgesamt</b>	<b>233</b>	<b>42</b>

Es wurden bisher 161 Hämophilie A und 30 Hämophilie B-Patienten mit FVIII bzw. FIX-Präparaten behandelt:

Tabelle 3

Mit Faktorenpräparaten behandelte Patienten

Schweregrad	Hämophilie A	rFVIII- Präparat	pdFVIII- Präparat	Hämophilie B
Schwer ( $\leq 1\%$ )	94 (58,3%)	45	49	14
Mäßig ( $>1-5\%$ )	43 (26,7%)	28	15	13
Mild ( $>5\%$ )	24 (14,9%)	15	9	3
<b>Insgesamt</b>	<b>161</b>	<b>88</b>	<b>73</b>	<b>30</b>

88 Hämophilie A-Patienten wurden mit rekombinanten Faktor VIII-Präparaten (rFVIII) behandelt, davon 73 vom Typ full-size molecule (Kogenate®, Recombinate®) und 15 „B domain-deleted“ Präparate (Refacto®).

Die restlichen 73 Patienten wurden mit plasmatischen Präparaten (pdFVIII) behandelt, davon 47 mit von Willebrand-Faktor und 26 ohne von Willebrand-Faktor (Beriate®, Monoclate®).

Die Hämophilie B-Patienten wurden mit 28 plasmatischen Faktor IX-Präparaten und 2 rekombinanten Präparaten (Benefix®) behandelt.

#### 4.1.1 Alter zum Zeitpunkt der Erstexposition bei Hämophilie A und B

Das Alter zum Zeitpunkt der Erstexposition und die Anzahl der Expositionstage wurden bei Hämophilie A- und B-Patienten analysiert und verglichen:

Tabelle 4

##### Alter bei erster Exposition und Expositionstage der Patienten

	<b>Hämophilie A</b>	<b>Hämophilie A</b>	<b>Hämophilie B</b>	<b>Hämophilie B</b>
	Median	Spannweite	Median	Spannweite
Alter bei erster Exposition (Jahre)	0,9	0,1-24,9	1,3	0,1-13,4
Expositionstage insgesamt (ED)	51	1- >1000	40	2-2000
Beobachtungs- zeitraum (Jahre)	4,6	0,1-8,6	4,6	0,1-8,6

Die Hämophilie A-Patienten waren im Vergleich bei Erstbehandlung mit 0,9 Jahren etwas jünger als die Hämophilie B-Patienten.

Die Spannweite der Expositionstage reichte von 1 bis über 1000 Tage. Dies hängt damit zusammen, daß viele Patienten schon sehr lange unter Beobachtung stehen und behandelt werden, andere dagegen erst seit kurzem in die Studie eingeschlossen worden sind.

#### 4.1.2 Anzahl der Expositionstage bei Nicht-Inhibitorpatienten

Der Expositionsstatus der Nicht-Inhibitorpatienten bezogen auf pd- und rFVIII-Präparate wurde verglichen, da die Anzahl der Expositionstage (Expositionsstatus) ein weiteres Kriterium für das Risiko der Inhibitorentwicklung darstellen. Das Risiko der Inhibitorentwicklung ist nach ca. 200 Tagen als sehr niedrig anzusehen (Kreuz et al., 2002, Addiego et al., 1993, De Biasi et al., 1994).

Der Median der Expositionstage der Hämophilie A-behandelten Patienten betrug 51 Expositionstage und der Median der Hämophilie B-Patienten 40 Tage.

Tabelle 5

Anzahl der Expositionstage (ED) bei Nicht-Inhibitorpatienten , mit pd-FVIII (n=60) und rFVIII (n=67) bzw. FIX-Präparaten behandelt

<b>N Expositionstage (ED)</b>	<b>Hämophilie A- Patienten pdFVIII n= 60</b>	<b>Hämophilie A- Patienten rFVIII n=67</b>	<b>Hämophilie B- Patienten pdFIX n= 26</b>
1-10	15	16	5
11-20	7	5	2
21-200	22	27	10
>200	16	19	9
Median	51	62	40
Spannweite	1- >1000	1- >1000	2-2000

Nur wenig Patienten erreichten einen Expositionsstatus über 200 Tage, so daß die meisten Patienten noch ein Risiko für zukünftige Inhibitorentwicklung tragen.

## 4.2 Inhibitorentwicklung

### 4.2.1 Inhibitorentwicklung bei behandelten Hämophilie A- und B-Patienten

Von den 161 behandelten Hämophilie A-Patienten entwickelten 34 (21,1%) einen Inhibitor nach einem Median von 12 Expositionstagen (Spannweite 1-56). 15 Patienten

(44,1%) waren „High-Titer“-Inhibitorpatienten (HR) und 17 (50%) Patienten „Low-Titer“-Inhibitoren (LR). 2 Patienten (6%) entwickelten einen transienten Inhibitor.

Unter den schwer betroffenen Hämophilie A-Patienten mit einer RA  $\leq 1\%$  trat Inhibitorbildung bei 29 (30,9%) Patienten auf, während nur 4 Patienten (9,3%) mit einer RA  $>1-5\%$  einen Inhibitor entwickelten. Nur 2 (6,6%) von 30 behandelten Hämophilie B-Patienten entwickelten einen Inhibitor, hier existierten ein High- und ein Low-Responder mit einer Restaktivität von  $< 1\%$  und  $< 2\%$ .

#### 4.2.2 Inhibitorentwicklung in Abhängigkeit von FVIII-Präparaten

Die Inhibitorbildung wurde auch mit dem entsprechenden FVIII-Präparatetyp (pd/r) und dem Schweregrad korreliert .

Innerhalb der rekombinanten Präparategruppe wurden 21 Inhibitorpatienten von 73 ermittelt.

Wenn man die Restaktivität  $<1\%$  betrachtet, entwickelten innerhalb der rFVIII-Gruppe 17 von 45 Patienten einen Inhibitor und innerhalb der pdFVIII-Gruppe 12 von 49 Patienten. Ein Fisher-Test mit einem p von 0,12 ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der Inhibitoren mit schwerer Hämophilie A beim Vergleich beider Präparategruppen. Auch beim Vergleich der Patientenanzahl insgesamt ist keine Signifikanz zu erkennen.

Tabelle 6

#### Inhibitorinzidenz in Abhängigkeit vom Schweregrad und vom Präparatetyp

Schweregrad	Inhibitorpatienten/ Patienten insgesamt	Inhibitorpatienten/ Patienten insg. pdFVIII	Inhibitorpatienten/ Patienten insg. rFVIII
Schwer ( $\leq 1\%$ )	29/94 (30,8%)	12/49 (24,5%)	17/45 (37,7%)
Moderate ( $>1-5\%$ )	4/43 (9,3%)	0/15	4/28 (14,3%)
Mild ( $>5\%$ )	1/24 (4,2%)	1/9	keine
Insgesamt	34/161 (21,1%)	13/76 (17,1%)	21/73 (28,7%)

Die rekombinanten Präparate wurden für einen zusätzlichen Vergleich weiter unterteilt in die rekombinanten „full-size“- und „B domain-deleted“-Präparate.

Auch die pdFVIII-Präparate wurden unterteilt in solche ohne von Willebrand-Faktor und entsprechende mit von Willebrand- Faktor.

Tabelle 7

Vergleich der Inhibitorinzidenzen bezogen auf spezifische Präparategruppen

<b>Präparat</b>	<b>Inzidenz insg.</b>	<b>Inzidenz bei RA <math>\geq</math> 1%</b>	<b>Inzidenz bei RA &lt; 1-5%</b>
r-full-size	14/73 (19,2%)	11/31 (35,5 %)	3/25 (12%)
r-B-domain	7/15 (47%)	6/11 (55%)	1/3
pd ohne VWF	7/26 (26,9%)	6/21 (29%)	0
pd mit VWF	6/47 (12,7%)	6/21 (29%)	0

Der Fisher-Test zeigt beim Vergleich der full-size und der B-domain deleted- Präparate bezogen auf die „Inzidenz insgesamt“ ein signifikantes p von 0,03! Zu beachten ist aber dabei, daß nur sehr wenige Patienten mit B-domain deleted-Präparaten behandelt wurden.

Dieser signifikante Unterschied ist nicht zu erkennen beim Vergleich der Inzidenzen bei Patienten mit der Restaktivität  $\leq$  1%.

Bei einem Vergleich der „Inzidenz insgesamt“ zwischen „B-domain“- und „pd + VWF“-Präparaten wird mit dem Fisher-Test ein signifikantes p von 0,01 ermittelt! Hierbei ist aber auch die sehr kleine Patientenzahl bei den B-domain-Präparaten zu berücksichtigen.

Die nächste Abbildung zeigt die Verteilung der High- und Low-Responder in Abhängigkeit vom Schweregrad und Präparatetyp.

Tabelle 8

Anzahl der High (HR)- und Low-Responder (LR) in Abhängigkeit vom Präparatetyp

RA	LR-Inhibitoren/ Patienten insg. pdFVIII	LR-Inhibitoren/ Patienten insg. rFVIII	HR-Inhibitoren/ Patienten insg. pdFVIII	HR-Inhibitoren/ Patienten insg. rFVIII
RA ≤ 1%	7/49 (14,3%)	7/45 (15,5%)	5/49 (10,2%)	8/45 (17,7%)
RA < 1-5%	1/15	2/28	0/15	2/28 (7,1%)
FVIII < 5%	8/64 (12,5%)	9/73 (12,3%)	5/64 (7,8%)	10/73 (13,6%)

Es ist zu erkennen, daß die Verteilung der High- und Low-Responder bei beiden Präparategruppen ähnlich ist und kein signifikanter Unterschied besteht

#### 4.2.3 Alter der Erstexposition bei Inhibitor- und Nicht-Inhibitorpatienten

Das Alter bei Erstexposition bzw. Erstbehandlung bei Hämophilie A wurde nach verschiedenen Kriterien untersucht, da möglicherweise das Alter der Erstbehandlung die Inhibitorbildung beeinflußt bzw. sie fördert (Lorenzo et al., 2001; Van der Bom et al., 2003).

Zunächst wurde das Alter der Erstbehandlung für 32 Inhibitorpatienten (RA < 2%) insgesamt im Median ermittelt und dann mit dem Alter der 63 Nicht-Inhibitorpatienten und der High-/Low-Responder mit einer RA < 2% verglichen.

Tabelle 9

Vergleich des Alters bei erster Exposition: Inhibitor- und Nicht-Inhibitorpatienten

Patienten	N Jahre, Median	Spannweite
Nicht-Inhibitorpatienten RA < 2%, Alter bei 1. ED	0,9	0,1-25
Inhibitorpatienten RA < 2% Insg. , Alter bei 1. ED	0,9	0,1-7
Alter bei Inhibitorentwicklung	0,9	0,2-10,8
High-Responder (> 5 BU), Alter bei 1.ED	0,8	0,1-2,8
Low-Responder (0,6-5 BU) und Transiente, Alter bei 1.ED	1,0	0,1-10,8



Es ist zu erkennen, daß die High-Responder mit 0,8 Jahren im Median etwas früher behandelt wurden als die Low-Responder.

Das Alter bei Erstexposition der Inhibitorpatienten mit einer Restaktivität < 2% wurde zudem mit dem Alter von 63 Nicht-Inhibitorpatienten mit einer RA < 2% verglichen und in verschiedene Altersgruppen unterteilt:

Tabelle 10

Altersabhängigkeit bei erster ED : Inhibitor- und Nicht-Inhibitorpatienten

Alter	Inhibitorpatienten/ Nicht-Inhibitor- patienten insg., RA < 2%	Nicht-Inhibitor- Patienten RA > 1-5%	High-Responder (> 5 BU)	Low-Responder und Transiente (0,6-5 BU)
≤ 0,5 Jahre	7/28 (25%)	2/20 (10%)	5/14 (35,7%)	2/18 (11%)
> 0,5- 1 Jahre	16/45 (35,5%)	5/20 (25%)	6/14 (42,8%)	10/18 (55,5%)
> 1-1,5 Jahre	5/10 (50%)	3/20 (15%)	2/14 (14,3%)	3/18 (16,6%)
> 1,5 Jahre	4/11 (36,3%)	10/20 (50%)	1/14 (7,1%)	3/18 (16,6%)

Es ist zu erkennen, daß die meisten Inhibitorpatienten im Alter zwischen 0,5 und 1 Jahr die erste FVIII-Exposition bekamen. 45 Nicht-Inhibitorpatienten gehören auch zu dieser Gruppe, so daß hinsichtlich des Alters bei Erstbehandlung kein signifikanter Unterschied bei beiden Gruppen zu ermitteln ist. Auch innerhalb der Gruppe der High- und Low-Responder sind keine signifikanten Unterschiede zu sehen.

Die Hälfte der Patienten mit moderater Hämophilie wurden erst über 1,5 Jahre behandelt. Der Median des Alters dieser Gruppe betrug 1,7 und die Spannweite 0,1-11,8 Jahre.

#### **4.3 Dosierungen des Faktor VIII in der Initialphase der Behandlung bei Patienten mit schwerer Hämophilie A (RA <2%)**

Ein möglicher Einfluß des Therapieregimes und der Dosierung der FVIII-Präparate auf die Inhibitorbildung wird diskutiert.

Um die Dosierung und das Therapieregime zu korrelieren, wurde die in den ersten 20 Expositionstagen der Behandlung (Initialphase) bzw. bis zur Inhibitorentwicklung

erhaltene Tagesdosis Faktor IE/kg Körpergewicht jedes einzelnen Hämophiliepatienten (RA < 2%) berechnet.

Die Tagesdosierungen eines jeden Patienten wurden addiert und dann der entsprechende Mittelwert gebildet, um zwischen Inhibitor- und Nicht-Inhibitorpatienten einen aussagekräftigen Vergleich zu erhalten.

#### 4.3.1 FVIII-Dosierung bei High-Respondern

Die folgende Tabelle 11 zeigt die mittlere Dosis jedes einzelnen High-Responders bis zur Inhibitorentwicklung.

Tabelle 11

FVIII-Dosierung bei Inhibitorpatienten, High Responder > 5BU

<b>Anzahl der Tage bis Hemmkörperentwicklung</b>	<b>Mittlere Dosis/ Tag FVIII/kg Körpergewicht</b>	<b>Therapieregime</b>
5	60	Bedarf
10	55,5	Bedarf
13	142,4	Bedarf/ kont. Infusion
56	23,8	Bedarf
16	41,6	Bedarf
14	43,4	Bedarf
5	58,8	Bedarf
4	47,1	Bedarf
12	31,3	Prophylaxe
19	21,7	Bedarf/ Prophylaxe
11	58,8	Bedarf
8	55,5	Bedarf
17	17,8	Bedarf
1	64	Bedarf
<b>Median</b>	<b>51,3</b>	
<b>Mittelwert</b>	<b>51,5</b>	
<b>Spannweite</b>	<b>17,8-142,4</b>	

Der Patient mit der Dosis 21,7 IE/kg KG pro Tag bekam eine Bedarfstherapie. Es folgte eine Operation, worauf sich der Hemmkörper unter Prophylaxe entwickelte. Der Patient mit der Dosis 142,4 IE/kg KG pro Tag bekam eine Bedarfstherapie im Rahmen eines schweren Blutungsereignisses und eine kontinuierliche Infusion.

#### 4.3.2 FVIII-Dosierung bei Low-Respondern (0,6 - 5 BU)

Tabelle 12

FVIII-Dosierung bei Inhibitorpatienten, Low-Responder und *transiente Inhibitoren*

<b>Anzahl der Tage bis Hemmkörperentwicklung</b>	<b>Mittlere Dosis pro Tag Faktor VIII/kg Körpergewicht</b>	<b>Therapieform</b>
25	42,1	Bedarf
1	56,2	Bedarf
75	42,2	Bedarf/ kont. Infusion
5	55,5	Bedarf
14	41,66	Bedarf
1	20,83	Bedarf
40	71,4	Bedarf
7	22,7	Bedarf
5	25	Bedarf
48	25	Bedarf
25	29,5	Prophylaxe
9	40	Bedarf
34	52,5	Bedarf/ kont. Infusion
18	58,5	Bedarf
18	100	Bedarf
2	38,8	Bedarf
12	27,3	Bedarf
2	50	Bedarf
24	48,4	Bedarf
12	112,5	Bedarf
<b>Median</b>	<b>42,2</b>	
<b>Mittelwert</b>	<b>48</b>	
<b>Spannweite</b>	<b>20,8-112,5</b>	

Der Patient mit der Dosierung 29,5 IE/kg KG pro Tag bekam zunächst eine Bedarfstherapie, der Hemmkörper entwickelte sich aber unter Prophylaxe.

Der Patient mit der Dosierung 100 IE/kg KG pro Tag bekam in den ersten 20 Tagen Refacto® und war ein Low-Responder. Erst nach ca. 2 Jahren entwickelte er einen hochtitrigen Inhibitor (er wurde ein High-Responder) und wurde auf Haemate® umgestellt.

Die beiden Patienten mit den transienten Inhibitoren (in der Tabelle *kursiv*) bekamen eine Bedarfstherapie, und die Dosierungen betragen 27,3 und 50 IE/kg Körpergewicht. Bei den High-Respondern beträgt der Median der mittleren Dosierungen 51,3 IE/kg KG und der Mittelwert 51,5 IE/kg KG. Die Spannweite der Dosierungen beträgt 17,8-142,4 IE/kg KG.

Bei den Low-Respondern und Transienten Inhibitoren beträgt der Median 42,2 und der Mittelwert 48 IE/kg KG. Die Spannweite reicht von 20,8-112,5 IE/kg KG.

Es ist somit eine etwas höhere Initialdosierung bei den High-Respondern festzustellen.

In der folgenden Tabelle werden die Dosierungseinheiten in einzelne Gruppen aufgeteilt und zusammengefasst. Es fällt auf, daß die meisten Patienten, sowohl High- und Low-Responder, bis zum 20. Expositionstag eine mittlere Dosierung zwischen 40-60 IE/kg KG erhalten haben!

Tabelle 13

Zusammenfassung der mittleren Tagesdosierungen FVIII bei High- und Low-Respondern bis Hemmkörperentwicklung bzw. bis zum 20. Expositionstag

Mittlere Dosis IE FVIII/kg KG	High-Responder	Low-Responder + <i>Transiente (2)</i>	HR + LR insg.
10-20	1 (7%)	0	1 (3%)
> 20-40	3 (21,4 %)	7 ( 38,8%)/ 8 (40%)	11 (32,3%)
<b>&gt; 40-60</b>	<b>8 (57, 1%)</b>	<b>8 (44,4 %)/9 (45%)</b>	<b>17 (50 %)</b>
> 60-80	1 (7 %)	1 (5,5%)	2 (6 %)
> 80-100	0	1 (5,5%)	1 (3%)
> 100	1 (7%)	1 (5,5%)	2 (6%)
<b>Insgesamt</b>	14	18 bzw. 20	34

In der folgenden Tabelle 14 werden die mittleren Dosierungen der Inhibitorpatienten mit den Nicht-Inhibitorpatienten verglichen. Die Nicht-Inhibitorpatienten werden unter 4.3.3 ausführlich beschrieben und ausgewertet.

Die Grenze für die Unterteilung der Dosierung wurde bei 40 IE/kg KG gezogen, denn im Fall einer Bedarfsbehandlung kann man von kleinen Blutungsereignissen ausgehen. Zudem ist die Empfehlung Prophylaxe mit einer Dosierung von 20-40 IE/kg KG jede 2 Tage oder 3-mal pro Woche.

Tabelle 14

Vergleich der mittleren Dosis FVIII bis Hemmkörperentwicklung oder bis zum 20. Expositionstag bei Inhibitor- und Nicht-Inhibitorpatienten (RA<2%)

Art des Hemmkörperpatienten	Mittlere Dosis < 40 IE/kg KG	Mittlere Dosis >40 IE/kg KG
High-Responder	4/14 (28,5%)	10/14 (71,4 %)
Low-Responder und Transiente	8/20 (40%)	12/20 (60%)
HR + LR insgesamt	12/34 (35,3%)	22/34 (64,7%)
Nicht-Inhibitorpatienten	32/53 (60,4%)	21/53 (39,6%)

Es ist zu erkennen, daß der Anteil der über 40 IE/kg Substituierten bei der High-Responder-Gruppe mit 71,4% etwas höher ist als bei den Low-Respondern mit 60%.

Der Anteil der „HR + LR. insgesamt“-Gruppe, die > 40 IE/kg KG dosiert wurden (64,7%), ist mit einem signifikanten p-Wert von 0,014 deutlich höher als die unter 40 IE/kg behandelte Gruppe (35,3%).

Zudem fällt auf, daß die Mehrzahl der Nicht-Inhibitorpatienten (60,4%) im Gegensatz zu den Inhibitorpatienten (35,3%) unter 40 IE/kg KG dosiert wurde. Hochsignifikant (p= 0,02) ist der Vergleich der > 40 IE/kg KG dosierten Nicht-Inhibitorpatienten (39,6%) mit der Gruppe der „HR+ LR insg.“ (64,7%). Es erhielten also mehr Inhibitorpatienten eine Dosierung > 40 IE/kg KG als die Nicht-Inhibitorpatienten!

(Bei einem statistischen Vergleich (Fisher-p-test) der High-Responder und der Nicht-Inhibitorpatienten, die >40 IE/kg KG behandelt wurden, zeigt sich ein deutlich signifikanter Wert mit einem p von 0,033. Bei einem statistischen Vergleich der >40 IE/kg behandelten Low-Responder mit den Nicht-Inhibitorpatienten zeigt sich kein signifikanter Unterschied.)

### 4.3.3 Dosierung bei Nicht-Inhibitorpatienten (RA < 2%)

#### Hämophilie-A-Patienten

Es wurden 53 behandelte Hämophilie A Patienten mit einer Restaktivität <2% hinsichtlich der Dosierung von Faktor VIII betrachtet.

Die folgende Tabelle zeigt die Frequenz der verschiedenen auf das Körpergewicht bezogenen mittleren Dosierungen innerhalb der ersten 20 Expositionstage. Entsprechend zugeordnet sind die Therapieformen Bedarf oder Prophylaxe oder die Kombination von beiden.

Tabelle 15

#### FVIII- Dosierungen bei Nicht-Inhibitorpatienten

<b>Mittlere Dosierung Faktor VIII (IE/kg Körpergewicht)</b>	<b>N Patienten</b>	<b>Anzahl der Patienten Bedarf</b>	<b>Anzahl der Patienten Bed./ Prophylaxe</b>	<b>Anzahl der Patienten Prophylaxe</b>
10-20	3 (5,6%)	3	0	0
> 20-40	29 (54,7%)	21	5	3
> 40-60	13 (24,5%)	6	6	1
> 60-80	4 (7,5%)	2	1	1
> 80-100	3 (5,6%)	2	1	0
> 100	1 (1,8%)	1	0	0

Der Median der mittleren Dosierungen bei schweren Hämophilie A-Patienten beträgt 38,5 IE/kg KG. Die Mehrheit dieser Patienten bekam eine FVIII-Dosierung zwischen

20-40 IE/kg KG. Die Spannweite der Dosierungen reicht von 16,6-147 IE/kg Körpergewicht.

In der Initialphase, also in den ersten 20 betrachteten Expositionstagen, findet zunächst meist immer eine Bedarfsbehandlung statt. Nach 1-2 Monaten wird die Therapie in einigen Fällen auf Prophylaxe umgestellt.

### **Hämophilie B**

Bei der Hämophilie B wurden 17 Patienten mit einer Restaktivität <2% hinsichtlich der Dosierung betrachtet.

Tabelle 16

#### **FIX-Dosierung bei Hämophilie B-Patienten**

<b>Mittlere Dosierung Faktor IX (E/kg KG)</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>	<b>Anzahl der Patienten Bedarf</b>	<b>Anzahl der Patienten Bedarf/ Prophylaxe</b>	<b>Anzahl der Patienten Prophylaxe</b>
10-20	keine	keine	keine	keine
>20-40	5	2	2	1
>40-60	4	2	1	1
>60-80	5	2	1	2
>80-100	3	1	2	keine

Der Median der Dosierungen betrug 57,3 IE/kg Körpergewicht. Die Spannweite reichte von 30–100 IE/kg KG.

Die beiden Hämophilie B-Inhibitorpatienten bekamen eine recht hohe Dosierung von 70,5 und 61,1 IE/kg KG. Eine Interpretation hierzu ist nicht möglich, da sehr wenig Hämophilie B-Patienten bzgl. der Dosis untersucht wurden.

## 4.4 Mutationen

### 4.4.1 Mutationen bei Inhibitorpatienten

Für 21 Hämophilie A-Inhibitorpatienten mit einer RA<2% wurden folgende Mutationen festgestellt:

Tabelle 17

Mutationen bei Inhibitorpatienten, RA<2%

<b>Mutationstyp</b>	<b>High-Responder, n Patienten</b>	<b>Low-Responder, n Patienten</b>	<b>Transiente, n Patienten</b>
Intron 22-Inversion	8	4	1
Stopmutation	1	0	0
Große Deletion	1	0	0
Missense	0	2	0
Kleine Deletion	2	1	0
Mutation Exon 24	0	0	1

Ein Low-Responder mit einer Restaktivität von 6% zeigte auch eine Missensemutation. Erwähnenswert ist, daß der Patient mit der großen Deletion den höchsten Hemmkörpertiter mit einem humanen BU-Wert bis 712 entwickelte. Die meisten Inhibitorpatienten zeigten also die Hochrisikomutationen Intron 22-Inversion.

### 4.4.2 Mutationstypen aller Hämophilie A-Patienten

Die folgende Tabelle 18 zeigt die Mutationstypen der Gesamt- und Inhibitorpatienten in Abhängigkeit vom Schweregrad bzw. der Restaktivität. Insgesamt waren die Mutationen von 91 Patienten bekannt.



Tabelle 18

Mutationstyp-Profil der gesamten bisher untersuchten Patienten mit Mutationen in Abhängigkeit vom Schweregrad

Mutationstyp	N Patienten von Mutation betroffen/ Mutationspatienten insg.; RA < 1%	N Patienten von Mutation betroffen/ Mutationspatienten insg.; RA > 1-5%	Patienten insgesamt
Intron 22-Inversion	<b>42/62</b> (67,7%)	6/29 (20,6%)	48/91 (52,7%)
Stopmutation	6/62 (9,6%)	1/29 (3,4%)	7/91 (7,7%)
Große Deletion	2/62 (3,2%)	0	2/91 (2,1%)
Kleine Deletion	5/62 (8%)	3/29 (10,3%)	8/91 (8,8%)
Missense	4/62 (6,5%)	<b>19/29</b> (65,5%)	23/91 (25,3%)
Insertion	2/62 (3,2%)	0	2/91 (2,1%)
Intron 1-Inversion	1/62 (1,6%)	0	1/91 (1%)

Tabelle 19

Mutationstyp-Profil der Inhibitorpatienten im Vergleich zu Patienten insgesamt

Mutationstyp	Inhibitorpatienten/ N Patienten mit Mutation RA <1%	Inhibitorpatienten/ N Patienten mit Mutation RA >1-5%
Intron 22-Inversion	13/42 (30,9%)	1/6 (16,6%)
Stopmutation	1/6 (16,6%)	0
Große Deletion	1/2 (50%)	0
Kleine Deletion	2/5 (40%)	1/3 (33%)
Missense	1/4 (25%)	2/19 (10,5%)
Insertion	0	0
Intron 1-Inversion	1/1	0

Von insgesamt 91 bekannten Mutationen wiesen 48 Patienten eine Intron 22-Inversion auf bzw. 42 der Patienten mit schwerer Hämophilie. 19 der Patienten mit milder/moderater Hämophilie zeigten eine Missensemutation und 4 Patienten mit schwerer Hämophilie.

Die Intron 22-Inversion kommt nach einem Signifikanztest unter allen Mutationen mit Abstand am häufigsten vor.

#### 4.4.3 Vergleich der Mutationstypen mit anderen Studien

Um unsere Ergebnisse zu diskutieren, wurden die Mutationstypen mit vier anderen Studien verglichen. Dabei berücksichtigte die Studie Oldenburg 2 alle Patienten mit einer RA>1% (die Patientenzahl betrug 898); die Studie [Oldenburg 3](#) differenzierte auch zwischen [Inhibitor](#)- und Nicht-Inhibitorpatienten.

Tabelle 20

##### Mutationstypen bei unterschiedlichen Studien, Inh= Inhibitoren

Mutationstyp	Becker et al. 1996 RA < 2%, n=147	Goodeve et al. 2000 RA < 2%, n=55 Recombinante-Studie	Oldenburg 2, Patienten insg. n= 898	Oldenburg 3 Inhibitor- patienten n= 28	Oldenburg 3 Patienten ohne Inh. n= 67
Intron 22-Inversion	55 (37,4%)	49%	302 (33,5%)	18 (64,3%)	34 (50,7%)
Stopmutation	20 (13,6%)	-	-	-	-
Große Deletion	8 (5,4%)	4%	25 (2,7%)	2 (7,1%)	1 (1,5%)
Kleine Deletion	14 (9,5%)	20%	63 (7,02%)	1 (3,6%)	4 (6%)
Missense	27 (18,4%)	14%	323 (36,01%)	1 (3,6%)	18 (26,9%)
Insertion	2 (1,4 %)	-	22 (2,45%)	-	-
Intron 1-Inversion	-	-	-	-	-
Nonsense	-	4%	79 (8,81%)	6 (21,4%)	7 (10,4%)
Splice site	-	2%	22 (2,5%)	-	3 (4,5%)

Bei einem Vergleich der Studien fällt auf, daß die Anteile der Mutationen gut mit unseren übereinstimmen. Unterschiede existieren hinsichtlich der Intron 22-Inversion und der Nonsensemutation. In unserer Studie existieren bei der schweren Hämophilie A über 67% Intron-22-Inversionen (s.Tab.18), bei Becker 1996 nur 37,4%. Oldenburg erreichte immerhin einen Anteil von 50,7%, der mit unserem von 52,7% (Patienten mit  $RA \geq 1\%$ ) gut vergleichbar ist. Auch der Anteil der Missensemutationen (26,9%) stimmt hier gut mit unseren Ergebnissen (25,3%) überein

Becker konnte zeigen, daß zwei Drittel der Patienten Hochrisiko-Mutationen (Inversion, große Deletion, Stopmutation) tragen und ein Drittel Niedrigrisiko-Mutationen. Auch in unserer Studie ist dies der Fall: 50 Patienten mit schwerer Hämophilie ( $RA < 1\%$ ) sind von den Hochrisiko-Mutationen betroffen und 12 Patienten von den Niedrigrisiko-Mutationen.

Bei einem Vergleich ist auch zu beachten, daß Becker nur die schwer betroffenen, Oldenburg 2 schwere + moderat/mild betroffene Patienten und Oldenburg 3 die Inhibitorpatienten mit den Nicht-Inhibitorpatienten (schwere + moderat/milde) verglich. Goodeve analysierte nur 55 Patienten, und die Studie wurde nur mit einem einzigen Präparat durchgeführt. Deshalb fällt hier ein Vergleich schwer.

Ein wesentlicher Unterschied besteht darin, daß Nonsense- und Splice site-Mutationen bei HA-Patienten in unserer Studie nicht identifiziert wurden.

Jedoch ist zu berücksichtigen, daß wir nicht von allen 233 eingeschlossenen Patienten die Mutationstypen erhalten konnten, sondern nur von 91 Patienten.

#### 4.4.4 Verteilung der Mutationen, bezogen auf Präparate

Die nächste Tabelle 20 zeigt die Verteilung der Hoch- und Niedrigrisiko-Mutationstypen bei Patienten, die mit rekombinanten und plasma-derived-Präparategruppen behandelt wurden.

Tabelle 21

#### Verteilung der Mutationstypen in Abhängigkeit der verschiedenen Präparate

Mutationstyp	B-del. rFVIII Präparat	Full-size rFVIII Präparat	pdFVIII mit VWF Präparat	pdFVIII ohne VWF Präparat
Intron 22-Inversion	8	16	10	8
Stopmutation	0	1	4	1
Große Deletion	0	1	0	0
Kleine Deletion	1	6	1	1
Missense	0	11	4	4
Insertion	0	1	0	0
Intron 1-Inversion	0	1	0	0

Bei einem Vergleich der Mutationstyp-Profile der pd- und rFVIII-Präparategruppe ist kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der genetischen Prädisposition und Mutation zu erkennen.

Falls die angegebene Patientenanzahl nicht mit der von Tab.19 übereinstimmt, liegt es daran, daß bei einigen Patienten zwar die Restaktivität bekannt ist, aber sie wurden noch nicht behandelt (somit können sie keinem Präparat zugeordnet werden).

#### 4.4.5 Mutationstyp und Alter bei erster Exposition

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Mutationstyp und Alter bei Erstbehandlung festzustellen, wurden die Patienten in Gruppen unterteilt und das Alter analysiert.

Tabelle 22

Mutationstyp bei HA und Alter bei erster Exposition

Alter bei erster Exposition	n Patienten mit Intron 22-Inversion	n Patienten mit kleiner Deletion	n Patienten mit Missensemutation	n Patienten mit Stopmutation
< 0,5 Jahre	5	0	2	1
> 0,5- 1 Jahre	27	4	5	3
> 1-1,5 Jahre	5	2	2	1
> 1,5 Jahre	5	3	10	1
<b>Spannweite</b>	<b>(0,1-4,5 Jahre)</b>	<b>(0,8-3,8 J.)</b>	<b>(0,5-24,7 J.)</b>	<b>(0,3-5,4 J.)</b>
<b>Median</b>	<b>0,9</b>	<b>1,1</b>	<b>1,9</b>	<b>0,8</b>

Bei einem Vergleich des Alters ist zu erkennen, daß die Patienten mit der Hochrisiko-Intron 22-Mutation in jüngerem Alter behandelt wurden als z.B. die Patienten mit einer Missensemutation. Bei der Missensemutation bekamen im Verhältnis sehr viel mehr Patienten ihre erste Substitution in späterem Alter.

Der Fisher-Signifikanztest zeigt beim Vergleich der Gruppe 0,5-1 Jahre (Intron 22-Inversion im Vergleich zur Missensemutation) einen signifikanten Wert von  $p=0,006$ . Ebenso ist es bei einem Vergleich der Gruppe dieser Mutationen über 1,5 Jahre. Hier liegt der p-Wert bei 0,001.

Der Zusammenhang „Schwere Hämophilie- Intron 22-Inversion- Erstexposition zwischen 0,5 und 1 Jahr“ und „Milde/Moderate Hämophilie- häufig Missense Mutation- Erstexposition > 1,5 Jahre“ ist hier eindeutig festzustellen.

Vergleicht man die Initialdosierung bei Patienten mit Intron 22-Inversionen und Missensemutationen, so liegt der Median der Dosierung bei der Intron 22-Inversion bei 39,5 IE/kg KG (Spannweite 18,5- 100 IE/kg KG) und bei der Missensemutation bei 32,3 IE/kg KG (Spannweite 20- 66,6 IE/kg KG).

#### 4.4.6 Mutationstyp und Therapieregime

Tabelle 23

##### Mutationstyp und Therapieregime

<b>Mutationstyp</b>	<b>Anzahl der Patienten mit Bedarf</b>	<b>Anzahl der Patienten mit B/ Prophylaxe</b>	<b>Anzahl der Patienten mit Prophylaxe</b>
Intron 22-Inversion	22	14	6
Kleine Deletion	6	2	1
Missense	16	0	3
Stopmutation	4	0	1
Insertion	0	1	0
Große Deletion	0	1	0
Intron 1-Inversion	0	1	0

Die meisten Patienten (22) mit der Intron 22-Inversion bekamen eine Bedarfstherapie oder eine Kombination aus Bedarf und Prophylaxe.

#### 4.4.7 Mutationen bei Hämophilie B-Patienten

Bei den 26 untersuchten Hämophilie B-Patienten wurden folgende Mutationen festgestellt:

Tabelle 24

##### Mutationstypen bei Hämophilie B

FIX-Mutation, Substitution	Mutationstyp	Rest- aktivität %	Mittlere Dosis FIX/kg KG	Alter 1. ED
1) T 6449 C	Missense	1%	nb	nb
2) G>A	Missense	2%	nb	nb
a) 312626 G>A, Gly 381 Arg	Missense	1%	100	0,9
b) 31119 G> A, Arg 333 Gln	Missense	1,3%	35,7	1,8
c) 30864 G>A, Arg 248 Gln	Missense	5 %	36,7	0,1
d) 17761 C>A, Arg 116 Arg	Splice site	4 %	50,0	11,6
e) 17761G>A, Val 17 Ile	Missense und Splice site	2,2%	60	1,3
f) 30864 G>A, Arg 248 Gln	Missense	8,3%	nb	nb
<b>g) Deletion Exon b-h *</b>	<b>Große Gendeletion &gt; 30 bp</b>	<2%	70,5	0,7
h) 30073 G>T, Gly 207 Val	Missense	<1%	100	0,8
i) Del 20417 C, Ala 146 Del C	Kl. Deletion mit Frameshift (< 30 bp)	< 1%	62,5	1,25
j) 6375 G>A, Arg 1 Lys	Missense	2%	nb	nb
k) 31281 A>C, Glu 387 Ala	Missense	2%	58,8	1
l) 9 C> G	Promotormutation	3,7%	46,8	3,5
m) 31118 C> T, Arg 333 stop	Nonsense	8%	41,6	0,8
n) Del 64 20-25, Del GAGAGA	Kl. Deletion (<30 bp)	1%	nb	nb
o) 31008 C>T, Thr 296 Met	Missense	2%	30	9
p) 9C>G	Promotormutation	3%	23,8	7,6
q) 20518 C>T, Arg 180 Trp	Missense	2%	38,4	1,4
<b>r) 6460 C&gt;T, Arg 29 stop *</b>	<b>Nonsense</b>	<1%	61,1	1
s) 31280G>A, Glu 387 Lys	Missense	<1%	35,3	3,5
u) 6653A>G	Intronmutation	0,4%	27,7	3
v) 6460 C>T, Arg 29 Stop	Nonsense	<1%	54,5	1,2
w) 10437 G>A, Cys 62 Tyr	Missense	<1%	nb	nb
x) 10443 A>G, D 64 G	Missense	1%	nb	nb
y) Arg (CGG)- 4 Trp (TGG)	Missense	<1%	nb	nb

Es ist zu erkennen, daß 61,5% aller auftretenden Mutationen vom Typ Missense sind. Bei Patienten mit der Bezeichnung „nb“ sind die Dosierungen nicht bekannt, da diese erst in die Studie aufgenommen und noch nicht behandelt wurden.

Die Patienten mit der blauen\* bezeichneten Nonsense- und großen Gendeletion sind die beiden Inhibitorpatienten. Diese beiden Mutationen haben laut Literatur auch das höchste Risiko für Inhibitorbildung bei der Hämophilie B (Ljung 1995).

Der Median des Alters der 1.ED bei den Missensemutationen liegt bei 1,3 Jahren (Spannweite 0,1-9). Der Median der Dosierung bei dieser Mutation liegt bei 48,6 IE/kg KG (Spannweite 30-100 IE FIX/kg KG).



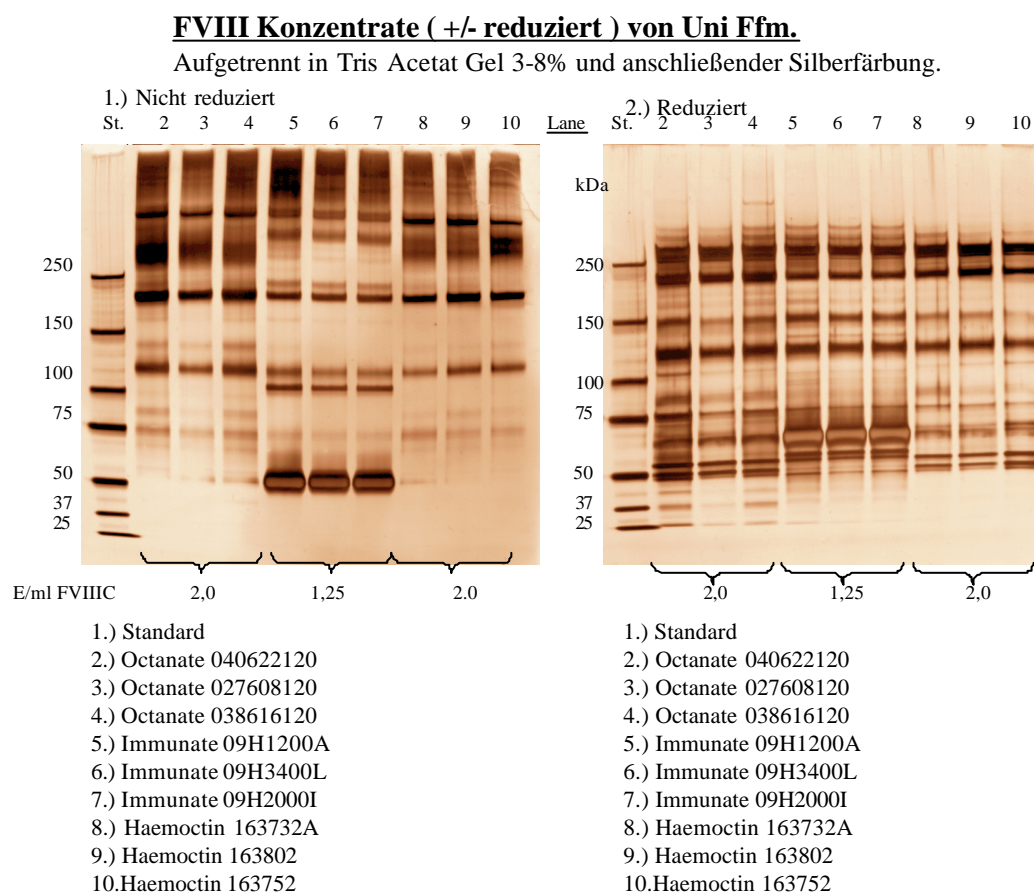
#### 4.5 SDS-Page und Immunblot von r- und pdFVIII-Präparaten

Die verschiedenen FVIII-Präparate wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und dann auf Nitrozellulose geblottet, um die Konzentrationsverteilung von Heterodimeren der schweren und leichten Ketten bestimmen zu können. Für eine halbquantitative Beurteilung der SDS-Page wurden die Gele mit einem Densitometer ausgewertet. Die Detektion der FVIII-Ketten bzw. Fragmente erfolgte durch polyklonale FVIII-Antikörper.

Mit der SDS-Page werden alle mit Silber anfärbbaren Proteine der Produkte nachgewiesen. Mit dieser Methode ist besonders das VWF-Protein (Multimer mit einem MG ab ca. 250 kDa bis 1 Million Da) nachweisbar.

#### Vergleich verschiedener FVIII-Präparate nach SDS-Page-Auftrennung und Immunblot mit polyklonalen Antikörpern

##### Abb. 5, SDS-Page: FVIII-Konzentrate

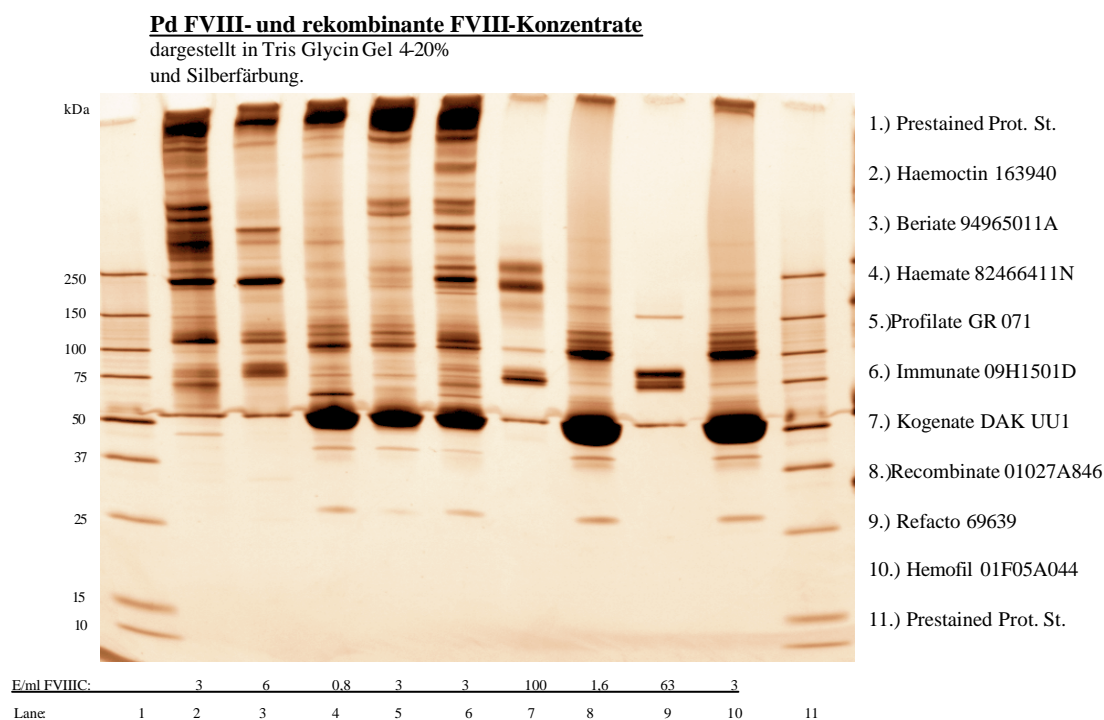


Drei pdFVIII-Präparate wurden hier dargestellt. Haemoctin® und Octanate® weisen ein vergleichbares Muster der Proteinbanden im Bereich von ca. 50 kDa bis nahezu 1000 kDa auf. Immunate® enthält große Anteile an Albumin (ca. 69 kDa).

Die Doppelbande der leichten Kette des FVIII-Proteines ist zwischen 70 und 80 kDa zu erkennen. Bei 180–220 kDa ist die Bande der schweren Kette zu sehen. Unter 50 kDa liegen Abbauprodukte, und ab 250 kDa ist der VWF zu erkennen. Zwischen 70 und 230 kDa liegen die Heterodimere des Proteines.

Es sind jeweils Chargenunterschiede im Verteilungsmuster der Proteine zu erkennen, die speziell für Octanate® Unterschiede der Chargen aufweisen.

Abb.6, SDS-Page: pd- und r-FVIII-Produkte



Hier sind sowohl rFVIII als auch pdFVIII-Produkte dargestellt. Es sind Unterschiede zwischen den Präparaten zu erkennen. Refacto® weist im wesentlichen drei Proteinbanden auf, das Molekulargewicht stimmt gut mit denen der FVIII-Ketten überein. Die leichte Kette ist als Doppelbande im Bereich von ca. 80 kDa und die schwere Kette im Bereich von ca. 180 kDa zu sehen.

Bedeutsam ist, daß Refacto® außer diesen Proteinbanden nahezu keine anderen Begleitproteine aufweist.

Das neue Kogenate®/Bayer DAK UU1 (ohne Albumin) ist für diese Darstellung in ca. 100-facher FVIII-Dosis gegenüber den pdFVIII-Produkten aufgetragen worden, um diese Proteinbanden sichtbar werden zu lassen, wie auch bei Refacto®.

Der Vergleich der Proteine bei den pd- und rFVIII-Produkten zeigt deutliche Unterschiede in der Konzentration der Proteinbanden!

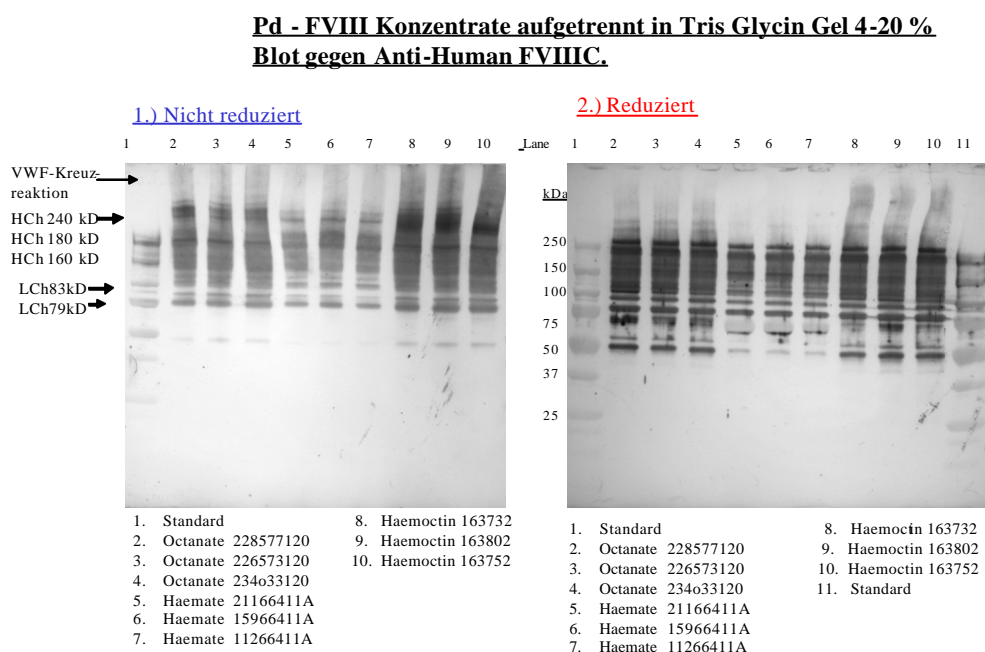
Kogenate® weist neben der leichten Kette der FVIII-Doppelbande auch die schweren Ketten im Bereich von ca. 180 kDa auf, die auch bei Refacto® nachgewiesen wurde.

Kogenate® enthält zusätzlich gegenüber Refacto® Proteinbanden im Bereich von ca. 250 kDa.

Recombinante® weist erhebliche Proteinmengen an Albumin im Bereich von ca. 70 kDa auf.

Die drei rFVIII-Produkte weisen keine Proteinbanden im Bereich von >250 kDa auf, ein Indiz dafür, daß diese Produkte kein VWF enthalten!

Abb. 7, Western blot:



Hier sind unter Verwendung der polyklonalen Antikörper vom Schaf nur die FVIII-Heterodimere und keine anderen Begleitproteine dargestellt.

Ein Vergleich der Position der FVIII-Heterodimere der drei pdFVIII-Produkte zeigt im wesentlichen eine Übereinstimmung bei allen drei pdFVIII-Produkten. Eine halb-quantitative Beurteilung des Western blots ist durch die densitometrische Auswertung möglich.

Die prozentuale Verteilung der nachgewiesenen FVIII-Heterodimere der drei Produkte unterscheidet sich deutlich in höherem Molekulargewichtsbereich. Diese Unterschiede beruhen wahrscheinlich auf der verschiedenen molaren Verteilung der VWF- und FVIII-Heterodimerkonzentration in den Produkten.

Eine quantitative Bestimmung der an den VWF gebundenen FVIII-Heterodimere ist mit der vorliegenden Technik nicht möglich. Techniken, die dies ermöglichen, sind zur Zeit noch nicht in der Literatur beschrieben.

#### **4.6 Densitogramm der SDS-Page und des Immunblots**

Die Auswertung der SDS-Page und FVIII-Western blots mit dem Densitometer wurden auf die Haemoclin SDH-Proteinbanden bezogen, da eine Darstellung von Plasma in Vergleich zu FVIII-Konzentraten mit dieser Technik nicht möglich ist. Dieser Vergleich zeigt Unterschiede der FVIII-Produkte in ihrer Protein- und FVIII-Heterodimerzusammensetzung, die aufgrund der Unterschiede ihrer spezifischen Aktivität zu erwarten war, sowie der Albuminzugabe zu den rFVIII-Produkten.

Das Ziel bestand in der Vergleichsprüfung der FVIII-Chargenhomogenität von drei Herstellern in bezug auf die Proteinzusammensetzung und FVIII-Heterodimerzusammensetzung. Denn größere Chargenunterschiede könnten evtl. zu einer stärkeren Immunogenität des FVIII führen.

Hier wurden sehr geringe Chargenunterschiede nachgewiesen.

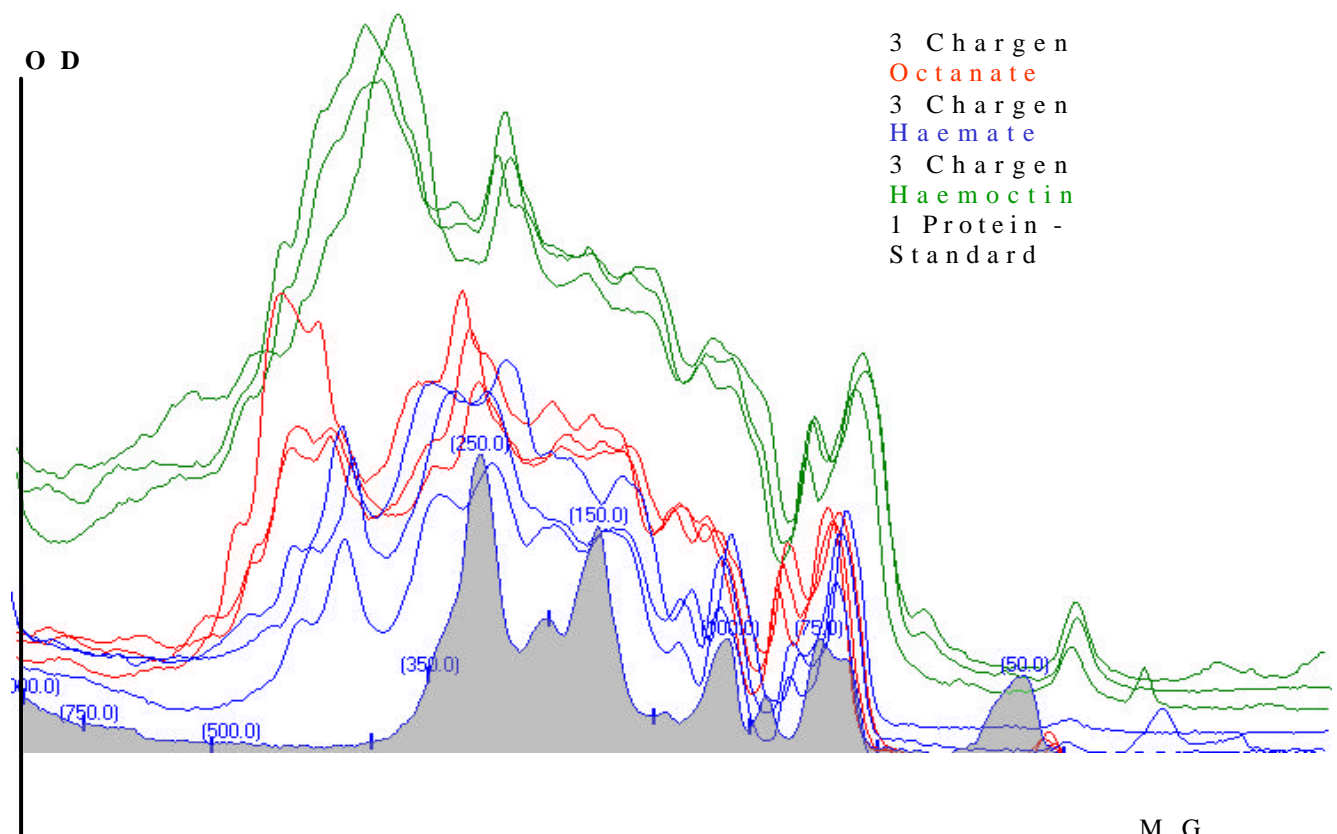
Das Densitogramm der Spuren der Proteinbanden zeigt die Intensität der Banden mit Hilfe des MultiImagers.

Die x-Achse zeigt die Laufstrecke der Proteine (MG), die y-Achse zeigt die optische Dichte der Banden (OD). Die graue Fläche zeigt den Proteinstandard. Die Zahlenangaben entsprechen den kDa der Proteinbanden.

Die Banden wurden eingescannt, entsprechend der in der Literatur beschriebenen Verteilung quantifiziert und im Verhältnis zum Haemoctin (100%) prozentual bewertet.

Abb. a: Densitogramm des Immunblots

**Pd - FVIII Handelsprodukte:**  
**Densitometer Scan der Blots.**



Tab. der Abb. a : Quantifizierung der FVIII-Heterodimere- Vergleich der Produkte

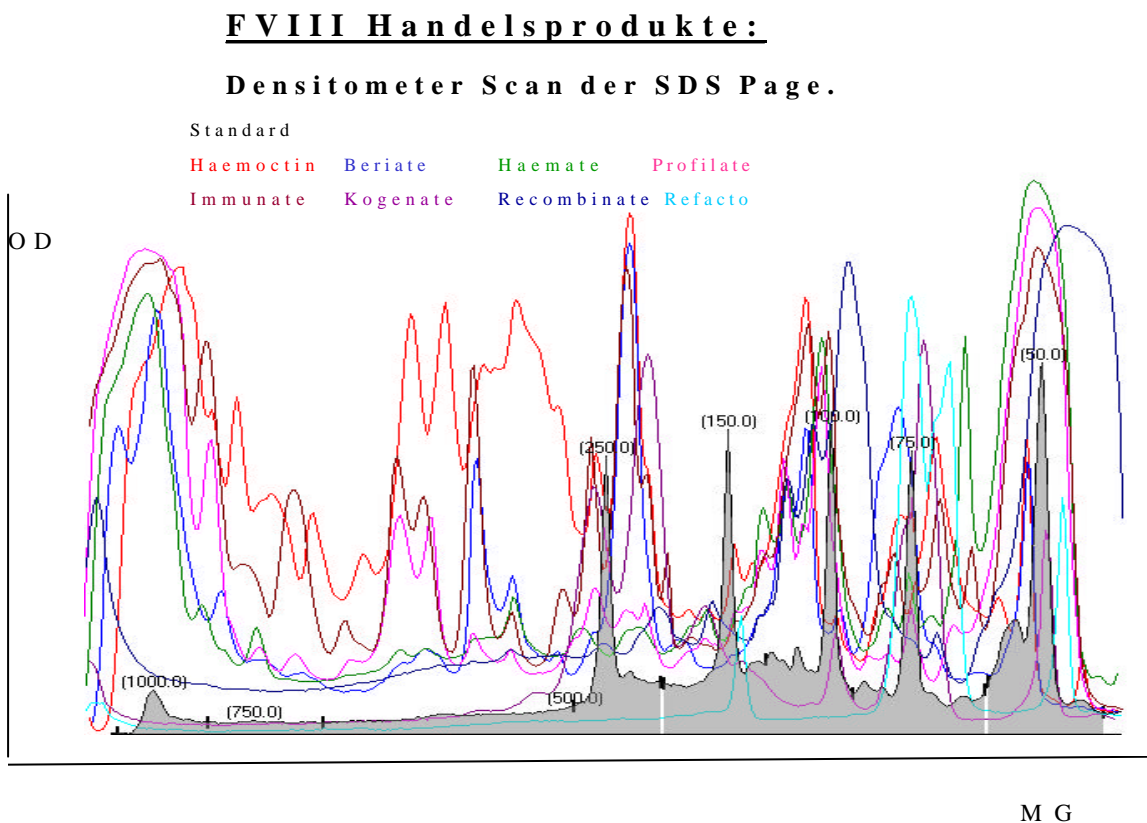
Produkt	Charge	kDa	958	621	383	290	232	190	124	76	62
Octanate®	1	%	4,3	6,6	27,1	9,4	17,1	17,8	9,1	7,7	0,9
Octanate®	2	%	4,3	7,0	22,4	9,1	16,1	19,0	11,4	9,4	1,3
Octanate®	3	%	5,0	9,0	19,7	10,6	15,7	16,9	11,9	9,5	1,8
Octanate® Mittelwert		%	4,5	7,5	23,1	9,7	16,3	17,9	10,8	8,9	1,4
Haemate®	1	%	5,1	7,4	15,1	15,5	16,4	21,8	9,6	8,0	1,3
Haemate®	2	%	4,7	8,3	16,9	20,9	13,5	17,3	9,2	8,2	1,1
Haemate®	3	%	5,1	6,7	14,7	16,7	16,4	21,7	9,9	7,3	1,4
Haemate® Mittelwert		%	4,9	7,5	15,6	17,7	15,4	20,3	9,6	7,8	1,3
Haemoctin®	1	%	4,3	8,0	17,0	20,8	12,8	16,1	10,3	8,5	2,2
Haemoctin®	2	%	4,1	7,8	15,5	20,4	14,6	16,9	9,3	9,1	2,3
Haemoctin®	3	%	5,2	9,5	13,0	20,6	12,5	18,0	10,5	8,6	2,2
Haemoctin® Mittelwert		%	4,5	8,4	15,2	20,6	13,3	17,0	10,0	8,7	2,2

Tab. 2 der Abb.a : Berechnung der FVIII-Heterodimere in %, bezogen auf Haemoctin®

Produkt	Charge	kDa	958	621	383	290	232	190	124	76	62
Haemoctin® Mittelwert		%	4,5	8,4	15,2	20,6	13,3	17,0	10,0	8,7	2,2
	Die Berechnung der Proteinpeaks wurde jeweils auf die 100 % ige Haemoctin Bande bezogen.										
		%	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Octanate® Mittelwert		%	99,4	89,9	152,2	47,0	122,5	105,4	107,7	101,6	61,3
Haemate® Mittelwert		%	108,6	88,5	102,6	86,0	116,0	119,3	95,2	89,5	57,7

Der Vergleich bei Abbildung a) (Scan der blots) zeigt für die prozentuale Verteilung der Laufgeschwindigkeit der FVIII-Heterodimere in den drei FVIII-Prüfprodukten eine sehr geringe Abweichung hinsichtlich der Chargen dieser Hersteller für Haemoctin®, Haemate® und Octanate®. Obwohl die hier überprüften FVIII-Produkte nur eine geringe Abweichung der FVIII-Heterodimerverteilung zwischen einzelnen Chargen und sogar drei verschiedenen Herstellern aufweisen, unterscheiden sich diese Produkte in ihrer FVIII-Bindung an die VWF-Multimere.

Abb. b: Densitogramm der SDS-PAGE



Tab. der Abb. b: Quantifizierung der FVIII-Heterodimere der FVIII-Produkte

Produkt	kDa	1400	880	370	220	148	100	78	50
Haemoctin®	%	15,0	12,5	32,1	11,3	6,3	8,5	10,1	4,3
Die Berechnung der Proteinpeaks wurde jeweils auf die 100 % ige Haemoctin Bande bezogen.									
	%	100	100	100	100	100	100	100	100
Beriate®		156	53	50	132	94	143	150	137
Haemate®		167	15	21	34	112	165	101	735
Profilate®		221	28	39	50	108	120	41	565
Immunate®		171	62	47	91	89	130	73	409
Kogenate®		14	2	17	343	247	60	249	182
Recombinat®		40	1	16	50	106	303	57	1060
Refacto®		18	3	12	32	126	45	618	367

Der Vergleich bei Abbildung b) (Scan der SDS-Page) zeigt, daß die Verteilung der FVIII-Heterodimere für jedes der FVIII-Produkte offensichtlich produktspezifisch ist, da die Abweichung der Konzentrationen der einzelnen FVIII-Heterodimere erheblich ist! Profil und Quantifizierung zeigen für die Banden der leichten (70-80 kDa) und auch schweren Ketten erhebliche Schwankungen bei Vergleich der r- mit den pdFVIII-Produkten.



#### 4.7 Epitopemapping (Belgien, Leuven)

Insgesamt wurden 59 Hämophilie A-Patienten (RA <2%) auf das Auftreten von neutralisierenden und nicht-neutralisierenden Antikörpern gegen die leichte und schwere Kette des FVIII-Proteines untersucht.

Davon wurden 33 Patienten mit rekombinanten Präparaten und 26 Patienten mit Plasma-derived Präparaten behandelt. 20 (33,9%) der 59 Patienten waren Inhibitorpatienten.

Insgesamt 44 (74,5%) Patienten entwickelten Antikörper gegen die schwere und/oder leichte Kette des Proteines, während 15 (25,4%) Patienten keinerlei Antikörper entwickelten.

Von diesen 15 Patienten wurden 12 mit rekombinanten und 3 mit Plasma-derived-Präparaten behandelt.

8 von diesen 15 Patienten entwickelten auch keine Inhibitoren!

Von insgesamt 38 Patienten waren die Mutationstypen bekannt. Bei 27 Patienten existierte eine Intron 22-Inversion; bei den anderen Patienten existierten kleine und große Deletion, Stop-/Missensemutation, eine Intron 1-Inversion und eine Insertion.

Eine Untersuchung der Epitopspezifität der Patienten konzentrierte sich auf die schwere Kette des FVIII-Proteines.

Die folgende Tabelle stellt die Anzahl der Inhibitorpatienten und der Anti-FVIII-Antikörper-Patienten in Abhängigkeit vom Präparat dar.

Von jeweils einem Patienten wurden stets 1-6 Proben (d.h. verschiedene Blutentnahmedaten bzw. unterschiedlicher Expositionsstatus) auf Antikörper getestet. Wenn der Patient nur zu einem Zeitpunkt Antikörper entwickelte (in vielen Fällen entwickelte er zu 2 oder 3 verschiedenen Zeiten Antikörper), wurde er als „positiv-reagierend“ bewertet.

Eine Analyse von inhibitorischen und nicht-inhibitorischen Antikörpern wurde auch in drei anderen Studien durchgeführt (Scandella et al. 2001, Klinge et al. 2001, Vianello et al., 1997).

Sie alle verwendeten „full-length“-FVIII für die Analysen.

Tabelle 25

Anzahl der Anti-Faktor VIII (LC + HC) Antikörper- und Inhibitorpatienten in Abhängigkeit vom Präparatetyp bei Hämophilie A (P=Patienten, BU=Bethesda-Einheit)

FVIII-Produkte	N P.	N BU-positive P.	Anzahl Antikörper-positive P. (HC u./o. LC)	Anzahl der nicht-BU-positive P.	Anzahl LC-positive P.	Anzahl HC positive P.	Anzahl P. LC und HC zur selben Zeit
Kogenate®	17	5	9	7	1	8	8
Rekombinate®	8	4	8	4	2	8	8
Refacto®	8	2	3	4	1	3	3
<b>rFVIII</b>	<b>33</b>	<b>11 (33,3%)</b>	<b>20</b>	<b>15 (45,5%)</b>	<b>4 (12,1%)</b>	<b>19 (57,5%)</b>	<b>19 (57,5%)</b>
Beriate®	11	4	10	6	3	8	9
Haemate®	5	3	5	2	1	5	5
Immunate®	3	1	3	2	3	1	3
Haemoctin®	4	0	3	3	1	3	3
Profilate®	1	0	1	1	0	1	1
Hemofil®	1	0	1	1	0	1	1
Monoclata®	1	1	1	0	0	1	1
<b>pdFVIII</b>	<b>26</b>	<b>9 (34,6%)</b>	<b>24</b>	<b>15 (57,6%)</b>	<b>8 (30,7%)</b>	<b>20 (76,9%)</b>	<b>23 (88,5%)</b>
<b>pd + rFVIII Insg.</b>	<b>59</b>	<b>20 (33,8%)</b>	<b>44 (74,5%)</b>	<b>30 (50,8%)</b>	<b>12 (20,3%)</b>	<b>39 (66%)</b>	<b>42 (71%)</b>

Es fällt auf, daß die Antikörperinzidenzen bei der schweren Kette mit 57,5% und 76,9% sehr hoch sind. Bei einem statistischen Vergleich (Fisher-Test) der Antikörperinzidenzen von schwerer und leichter Kette des Proteines (HC + LC) beider Präparategruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied !

Die Antikörper dieser Studienpatienten wurden also vorwiegend gegen die schwere Kette gebildet.

#### 4.7.1 Mutationstyp, Präparat und Antikörperinzidenz bei Hämophilie A

Von 38 Patienten der Antikörperuntersuchungen waren die Mutationstypen bekannt. Es wurde untersucht, bei welchem Mutationstyp vorrangig Antikörper auftraten und ob sie (eher) gegen die schwere oder die leichte Kette des FVIII-Proteines gerichtet waren.

27 aller untersuchten Patienten mit bekannten Mutationen zeigten eine Intron 22-Inversion.

Tabelle 26

#### Antikörper-/Inhibitorinzidenz bei rekombinanten FVIII-Präparaten in Abhängigkeit vom Mutationstyp

Mutationstyp	Anzahl der Patienten insgesamt N	AK-Schwere Kette	AK-Leichte Kette	Bethesda-Unit- positiv
	<b>rFVIII</b>	n P. HC	n P. LC	n P. BU
Intron 22-Inversion	17/ 38 (44,7%)	10/17 (58,8%)	1/17 (5,8%)	5/ 17 (29,4%)
Stopmutation	1/38 (2,6%)	1	0	1
Große Deletion	1/ 38 (2,6%)	1	1	1
Missense	2/ 38 (5,3%)	2	1	0
Kleine Deletion	1/ 38 (2,6%)	0	0	0
Insertion	1/ 38 (2,6%)	1	0	0
Intron 1-Inversion	1/ 38 (2,6%)	1	0	0

Bei der Zahlenreihe ist anzumerken, daß z.B. der Patient mit der großen Deletion sowohl Antikörper gegen die leichte und schwere Kette besitzt und gleichzeitig BU-positiv ist.

Der Inhibitor-Titer bei der großen Deletion ist mit 712 BU sehr hoch!

Werden die rekombinanten FVIII- Präparate weiter aufgeteilt in full-size und B domain-deleted-Präparate, ergeben sich für die Patienten mit Intron-22-Inversionen folgende Fälle:

Tabelle 27

Intron 22 Inversion-Patienten, Präparate und Antikörperinzidenz

<b>Präparat</b>	<b>N Patienten</b>	<b>HC-positiv</b>	<b>LC-positiv</b>	<b>BU-positiv</b>
Refacto	1	nein	nein	nein
Refacto	2	Ja +	nein	nein
Refacto	1	nein	nein	Ja +
B domain	8	Ja +	nein	nein
B domain	1	Ja+	Ja+	nein
B domain	1	nein	nein	Ja+
B domain	1	Ja+	nein	Ja+
B domain	2	nein	nein	nein

Tabelle 28

Antikörper-/Inhibitorinzidenz bei Plasma-derived Präparaten in Abhängigkeit vom Mutationstyp

Mutationstyp	N Patienten	AK-Schwere Kette HC	AK Leichte Kette LC	BU Inhibitoren
	pdFVIII	N P.	N P.	N P.
Intron 22-Inversion	10/38 (23,6%)	8/10 (80%)	3/10 (30%)	5/10(50%)
Stopmutation	1/38 ( 2,6%)	1	1	0
Kleine Deletion	2/38 (5,3%)	0	1	1
Missense	1/38 (2,6%)	1	0	0

Addiert man die Patienten der pd- und rFVIII-Präparate, die eine Intron 22-Inversion aufweisen, so zeigen 68,4% der Patienten eine Intron 22-Inversion.

Addiert man bei dieser Mutation die Inzidenzen der Gesamtpräparate (pd + r) von HC, LC und BU, so erhält man eine Antikörperinzidenz von 74% für HC und 14,8% für LC. Die Inhibitor-BU-Inzidenz liegt bei 37 %.

Unterteilt man die PD-Präparate in VWF-haltige und nicht VWF-haltige, ergeben sich für die Intron 22-Inversion folgende Fälle:

Tabelle 29

Intron 22-Inversion, Präparat und Antikörperinzidenz

<b>Präparat</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>HC-positiv</b>	<b>LC-positiv</b>	<b>BU-positiv</b>
pd + VWF	3	Ja +	nein	nein
pd+ VWF	1	Ja+	Ja+	Ja+
pd + VWF	1	nein	Ja+	Ja+
pd ohne WF	4	Ja+	nein	Ja (2 Patienten)
pd ohne WF	1	nein	Ja+	nein

**4.7.2 Anzahl getesteter Proben und Präparate**

Um eine Aussage über die Antikörperinzidenz bzgl. der verschiedenen Präparate treffen zu können, wurden die Proben für jedes Präparat addiert und in HC- und LC-positive Proben unterteilt.

Tabelle 30

Anzahl der Proben und Antikörperentwicklung bei verschiedenen Präparaten

<b>Präparat</b>	<b>Anzahl getesteter Proben</b>	<b>N HC-positive Proben</b>	<b>N LC-positive Proben</b>	<b>BU-positive Proben</b>
Kogenate®	56	10 (17,8%)	1 (1,8%)	5
Recombinat®	31	14 (45%)	5 (16%)	6
Refact®	25	5 (20%)	0	1
Beriate®	39	16 (41%)	5 (12,8%)	1
Haemoctin®	11	4 (36,3%)	1 (9%)	0
Haemate®	18	10 (55,5%)	0	1
Hemofil®	5	1	0	0
Monoclata®	3	3	0	1
Profilate®	4	1	0	0
Immunate®	10	4 (40%)	1	1

### 4.7.3 Mutationen, Probenanzahl und Antikörperinzidenz

Um einen Zusammenhang zwischen Mutationen und Antikörperinzidenz bzgl. HC oder LC herzustellen, wurden die der Mutation zugehörigen Proben addiert. Auch hier fällt auf, daß die HC-positiven Proben jeweils dominieren (außer bei der Stopmutation und der großen Deletion).

Tabelle 31

#### Mutationen, Probenanzahl und Antikörperinzidenz

<b>Mutation</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>	<b>Anzahl getesteter Proben</b>	<b>Anzahl HC-positiver Proben</b>	<b>Anzahl LC-neg. Proben</b>
Intron 22-Inversion	27	81	25	4
Große Deletion	1	4	3	3
Stopmutation	2	11	5	10
Missense	3	11	6	2
Kleine Deletion	3	8	3	0
Insertion	1	4	2	0
Intron 1-Inversion	1	5	3	0

### 4.7.4 Auswertung

Um eine Aussage treffen zu können, ob mehr LC-oder HC-Antikörper bei jedem Präparat entstanden und um zwischen der Immunogenität zwischen pd- und rFVIII-Präparaten zu unterscheiden, wurde der Fisher-Test (einseitig und zweiseitig) angewendet.

#### Intron-22-Inversion:

Es wurde untersucht, bei welcher Präparategruppe bei diesen Patienten mehr LC/HC-Antikörper existierten. Ein Vergleich von LC-Antikörpern der r/pdFVIII-Präparate sieht z.B. so aus:

<b>Intron 22-Inversion</b>	<b>LC-positiv N Patienten</b>	<b>LC-negativ N Patienten</b>	<b>insgesamt</b>
rFVIII	1	16	17
pdFVIII	3	7	10
Insgesamt	4	23	27

Eine Berechnung nach dem Fisher-Test ergibt ein zweiseitiges p von 0,12; das Ergebnis ist also nicht signifikant.

Ein Vergleich der HC-Antikörper-reagierenden Patienten bei der Intron 22-Inversion ergibt auch keinen signifikanten Wert ( $p=0,4$ ).

Von 27 Patienten mit Intron 22-Inversionen entwickelten 21 (77,7%) Anti-Faktor VIII-Antikörper. 3 von ihnen waren auch BU-positiv (zum selben Zeitpunkt). Interessant ist ein Vergleich mit einer Studie von Vianello et al. (1997), der zeigen konnte, daß 81% (13/16) der Patienten mit Intron 22-Inversionen Anti-FVIII-Antikörper entwickelten und 25% BU-positiv waren. Diese Studie zeigte, daß Patienten mit Intron 22-Inversionen ein hohes Risiko hinsichtlich der Antikörperbildung aufweisen. Hierin zeigt sich eine große Ähnlichkeit zu den Ergebnissen unserer Studie.

Hervorzuheben ist, daß der Patient mit der großen Deletion gleichzeitig sehr hohe Antikörper- und BU-Werte aufweist.

#### Vergleich von r- und pdFVIII-Präparaten

Bei der Frage, ob mehr Patienten LC-Antikörper bei pd-oder rFVIII-Präparaten entwickelten, zeigt der Fisher Test ein p von 0,06. Ein Trend ist hier zu sehen (bei rFVIII werden mehr LC-Antikörper gebildet), jedoch keine Signifikanz.

Ein Vergleich der Anzahl der Patienten mit LC-Antikörpern gegen HC-Antikörper innerhalb der Präparategruppe zeigt einen signifikanten Unterschied. HC-Antikörper werden bei jeder Präparategruppe häufiger gebildet.

Jedoch sieht dieser Vergleich anders aus, wenn man die Anzahl getesteter Proben jedes einzelnen Präparates (siehe Tabelle) betrachtet. Dieses Verfahren ergibt genauere Ergebnisse.

Für die Präparate Haemoctin®, Hemofil®, Monoclote®, Profilate® und Immunate® konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der HC und LC-Antikörper festgestellt werden. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, daß für diese genannten Präparate nur sehr wenig Proben zur Verfügung standen (3-5).

Eine Signifikanz für den Vergleich HC vs. LC-Antikörper ergab sich bei Kogenate®, Recombinate®, Refacto®, Beriate® und Haemate®. Bei diesen Präparaten wurden mehr HC-Antikörper gebildet!

Vergleicht man die Präparate untereinander hinsichtlich ihrer Immunogenität, so zeigt sich nur eine Signifikanz von Kogenate® gegen Monoclate®. Unter Verwendung von Kogenate® wurden mehr HC-Antikörper gebildet als bei Monoclate. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, daß für Monoclate® nur drei Proben zur Testung zur Verfügung standen.

Addiert man jeweils die Probenanzahl der r- und pdFVIII-Präparate und betrachtet sie als zwei Gruppen (pd: 39 HC/90, r: 33 HC/112), so werden signifikant mehr HC-Antikörper gegen die pd-Präparate gebildet ( $p=0,02$  einseitig und  $p=0,05$  zweiseitig). Hierbei muss betont werden, daß viel mehr einzelne pd- als rFVIII-Präparate existieren. Ein Vergleich der LC-Antikörper zeigte keine Signifikanz.

#### Vergleich von inhibitorischen und nicht-inhibitorischen Antikörpern

Von elf Patienten mit Bethesda-Einheiten existierten drei, die keine Antikörper (detektierbar mit dem Immunpräzipitationstest) bildeten. Auch bei Klinge et al. (2001) und Vianello et al. (1997) trat dieser besondere Fall ein, daß zu einem BU-positiven Test (bei zwei bis drei Patienten) keine Antikörper (mit IP-Test) nachweisbar waren!

Bei den meisten Fällen traten Antikörper auf, aber der Bethesda-Test war negativ oder die Patienten waren erst zu einem späteren Zeitpunkt (zu dem keine zu testenden Proben vorhanden waren) BU-positiv.

Dies hat zwei Gründe. Zum einen wurden viele BU-Tests zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt. Von diesem späteren Zeitpunkt wurde kein IP-Test durchgeführt bzw. waren keine Plasmen vorhanden. Zum anderen könnte die Immunantwort gegenüber FVIII sehr schnell verlaufen: Bei 2 Patienten (mit 0,8 und 9,7 BU) wurden mit dem IP-Test Antikörper entdeckt, bevor der BU-Test positiv wurde. Diese Unterschiede in der Verteilung der inhibitorischen zu nicht-inhibitorischen Antikörper konnte auch Klinge (2001) zeigen.

15 Patienten entwickelten keine Antikörper, und 8 von diesen waren auch BU-negativ. Bei Klinge zeigten 10 von 40 untersuchten Patienten keine Antikörper.

Das entscheidende neue Ergebnis des IP-Testes unserer Studie zeigt, daß signifikant mehr Antikörper gegen die HC-Kette des FVIII-Proteines gebildet wurden!



Dies steht im Gegensatz zu einigen anderen Theorien, die besagen, daß mehr Antikörper gegen die LC-Kette gebildet werden (Oldenburg et al. 2002, Scandella et al., 2001).

Bei den Studien von Scandella war der Antikörpertiter gegen die leichte Kette am höchsten, bei unseren Ergebnissen jedoch war der AK-Titer gegen die schwere Kette am höchsten.

#### 4.8 Epitopspezifität

Es wurden insgesamt 30 Patienten hinsichtlich der Epitopspezifität der schweren Kette HC untersucht. Die Antikörperreaktion der Patienten richtete sich gegen die Epitope A1a1 (1-389) und A2 (379-758) der schweren Kette.

Von 30 untersuchten Patienten für die A2-Domäne zeigten 13 (43,3%) eine positive Reaktion gegen A2.

Von 27 untersuchten Patienten für die A1a1-Domäne zeigten 4 (14,8%) eine positive Reaktion.

Tabelle 32

Antikörperreaktionen der Patienten gegen die Epitope A1a1 und A2 der schweren Kette

Präparat	N Patienten A1a1- positiv	N Patienten A1a1-negativ	N Patienten A2 -positiv	N Patienten A2 -negativ
Kogenate®	0	6	3	2
Recombinat®	0	5	2	4
Refacto®	0	2	0	3
Beriate®	2	4	3	4
Haemate®	2	1	2	2
Monoclata®	0	1	1	0
Immunate®	0	2	2 unbekannt	0
Haemoctin®	0	2	0	2

Eine Auswertung fällt hier schwer, da nicht alle Plasmaproben der Patienten getestet wurden. Auch eine Testung der Proben gegen die Domänen der leichten Kette LC wurde nur unvollständig durchgeführt. Die Antikörperreaktionen der Patienten richteten sich gegen die Epitope C2 (2170-2332) und a3A3C1 (1637-2170) der leichten Kette.

## 5 Diskussion

Der Stand des Wissens zur Inhibitorbildung während der Substitutionstherapie bei Hämophilie A-Patienten beruht vor allem auf den klinischen, häufig retrospektiv durchgeführten Studien, die nach dem Auftreten von Inhibitoren einen Zusammenhang mit den verursachenden Faktoren herstellen und die Spezifität der Antwort charakterisieren konnten. Diese Studien muß man zurückhaltend bewerten, da viele Variablen, vor allem die genetische Disposition der Patienten, die Immunreaktion beeinflussen können.

Das bestehende Risiko, Inhibitoren zu entwickeln und die damit verbundene lebensbedrohliche Situation zeigt die Notwendigkeit, die Immunreaktion gegen FVIII näher und an einem standardisierten System zu erforschen (Park et al., 2000).

### 5.1 Immunpräzipitations- und Bethesda-Assay

Um die Entwicklung der gesamten Antikörper gegen FVIII im Detail zu untersuchen, wurde der IP-Test angewendet, der wesentlich sensitiver ist als der Bethesda-Assay.

Es wurden 204 Plasmaproben von 59 Patienten mit schwerer Hämophilie A untersucht. Eine Immunantwort (IP-Test) gegenüber FVIII wurde als positiv angesehen, wenn der %-Wert der radioaktiven Messung über 60 lag.

Die Ergebnisse zeigen, daß 77% der Patienten mit der Mutation Intron 22-Inversion Antikörper gegen FVIII (meist gegen die schwere Kette) bildeten. Dies verdeutlicht, daß die Inversion ein hoher Risikofaktor ist. Es sollten noch mehr Mutationstypen der Patienten bestimmt werden, damit sich eine noch größere Patientengruppe bildet, die dann eine bessere statistische Aussagekraft hat. Vor allem sollte auch ein Vergleich mit den Nicht-Inversions-Patienten gezogen werden. Dies ist momentan schwierig, da nur 11 Patienten andere Mutationen aufweisen.

Bei den Auswertungen (s. Ergebnisse) wird deutlich, daß die meisten Antikörper gegen die schwere Kette des Proteines gebildet wurden. Es sollte versucht werden, diese Immunantwort erklären bzw. deuten zu können.

Infolge der unerwarteten Diskrepanz zwischen einem negativen IP-Test (hier in 3 Fällen) und einem positiven BU-Test kann vermutet werden, daß der IP-Test nicht alle Anti-FVIII-Antikörper detektieren kann.

Es existieren auch viele Fälle, in denen der Bethesda-Test negativ ist, jedoch hohe Antikörperwerte des IP-Testes vorliegen. Dies zeigt, daß bei diesen Patienten die Konzentration der nicht-inhibitorischen Antikörper vermutlich wesentlich höher bzw. stärker ist als die der inhibitorischen Antikörper (Gilles et al., 1993).

## **5.2 Mutationen als Risikofaktor bei der Hämophilie A**

67,7% der Patienten unserer Studie mit schwerer Hämophilie wiesen eine Intron 22-Inversion auf (und 52,7% der gesamten Patienten) und 65,5% der moderaten/milden Phänotypen eine Missensemutation. Zum Vergleich:

Bei schwerer HA werden 40-50% aller Mutationen durch die Intron 22-Inversion verursacht (Lakich et al., 1993).

Die Missensemutationen repräsentieren den häufigsten Typ, sie kommen bei bis zu 15% der schweren Hämophilen (Becker et al., 1996) und bei fast allen moderat/mild betroffenen Patienten vor (Kemball-Cook et al., 1998, Oldenburg et al., 2000).

Ein kleiner Anteil trägt kleine Deletionen/ Insertionen (10%) und große Deletionen (3-5%) (Becker et al., 1996). Erst kürzlich wurde die Intron 1-Inversion (die auch bei einem Patienten unserer Studie existiert) bei 2-5% der schwer betroffenen Patienten als Ursache erkannt (Bagnall et al., 2002).

Es konnte ein Zusammenhang zwischen Gendefekten, die einen schweren Phänotyp hervorrufen („0-Mutationen“, d.h. große Deletionen, Intron 22-Inversionen oder Punktmutationen, die Stopcodons hervorrufen) und einer hohen Inhibitorinzidenzrate gefunden werden (Schwaab et al., 1995; Tuddenham et al., 1998). Bei diesen Mutationen kann kein endogenes FVIII gebildet werden (sie heißen deshalb auch „0-Mutationen“).

Der infundierte FVIII wird somit vom Immunsystem als Fremdprotein erkannt; und es können Inhibitoren gebildet werden (Hay 1999). Es ist sehr wahrscheinlich, daß eine Verbindung zwischen Genotyp und Inhibitorentwicklung in Zusammenhang mit der

Anwesenheit einer bestimmten Menge von zirkulierendem FVIII steht (Fijnvandraat et al., 2003).

In unserer Studie existierten 61,9% (13/21) Inhibitorpatienten mit Intron-22-Inversionen und 9,5% Inhibitorpatienten mit Missensemutationen. Diese Zahlen sind gut vergleichbar mit Oldenburg 3. In unserer Studie waren 2,1 % Patienten von der großen Deletion betroffen und 8,8% von der kleinen Deletion; ähnliche Zahlen fand auch Oldenburg 3.

Von 42 Patienten mit Inversionen entwickelten 13 einen Inhibitor, also 30,9%. Ein Vergleich mit anderen Studien wird weiter unten beschrieben.

2 Patienten unserer Studie trugen große Gendeletionen. 1 Patient davon entwickelte keinen Inhibitor. Es konnte gezeigt werden, daß Patienten mit einer großen Gendeletion, die mehr als eine Domäne des Proteines betrifft, ein Risiko von ca. 75% tragen. Wenn die Mutation jedoch nur eine einzige Domäne betrifft, ist das Risiko 3-mal niedriger (Oldenburg et al., 2000). Dieser eine Patient unserer Studie war wahrscheinlich von der „single-domain-deletion“ betroffen, der somit keinen Inhibitor bildete.

Bei weniger schweren Defekten wie Missensemutationen werden geringe Mengen des nichtfunktionalen Proteines gebildet, welches Immuntoleranz induzieren kann (Oldenburg et al., 1998).

Die Annahme, daß bei Missense- und kleinen Deletionen wenig FVIII-Antigen im Blut vorhanden ist, wird von Mc Millan et al. (1988) und Hoyer et al. (1981) unterstützt. Sie konnten zeigen, daß geringe Mengen von FVIII-Antigen (0,01-0,09 U/ml) bei 30% der Nicht-Inhibitorpatienten mit schwerer Hämophilie vorhanden sind. Dieser Wert ist ähnlich zu der Prozentzahl der Patienten mit Missensemutationen, und zwar 26,9%.

Patienten mit einer Missensemutation, die eine milde/moderate Krankheit hervorruft, haben ein kleines Risiko der Inhibitorentwicklung. 3-13% solcher Patienten entwickeln Inhibitoren (Ehrenforth et al., 1992; Addiego et al., 1993). Die Inhibitorbildung bei milder/moderater Form wird weiter unten beschrieben.

Diese Mutation kann in 4 Subtypen unterteilt werden und kann überall auf verschiedenen Domänen des Genes, außer Exon 14, verteilt sein.

Für Patienten mit Missensemutationen auf den C1- und C2-Domänen ist das Risiko der Inhibitorbildung dreimal höher als bei Mutationen auf anderen Regionen (Hay et al., 1998, Jacquemin et al., 2000; Pratt et al., 1999).

Die Gruppe der kleinen Deletionen /Insertionen gehört auch zur Niedrigrisikogruppe, obwohl sie ein Frameshift mit einem Stopcodon hervorrufen.

Young et al. (1997) konnte zeigen, daß eine endogene Wiederherstellung des Leserasters durch Polymerasefehler während der RNA-Transkription erfolgt.

Eine geringe Menge von endogenem Protein ist das Ergebnis, das gegen die Inhibitorbildung schützt.

Auf welche Art die Missensemutationen die FVIII-Aktivität im Plasma reduzieren, ist unbekannt.

#### Intron 22- Inversion:

Die Intron 22-Inversion ist die häufigste Mutation bei schwerer Hämophilie A, vor allem in der Gruppe der Inhibitorpatienten, bei denen bis zu 60% oder mehr davon betroffen sein können (Oldenburg et al., 2000).

Bei einer Studie von Tizzano et al. (1994) wiesen 39% der schwer betroffenen Patienten diese Mutation auf, und 59% waren Inhibitorpatienten mit dieser Inversion. Bei einer Studie von Schwaab et al. (1995) war dieses Verhältnis 44% zu 66% Inhibitorpatienten. Die Mutation wurde 1993 von Lakich identifiziert und der Mechanismus von ihm beschrieben. Die Inversion ist auf eine homologe Rekombination zwischen einer 9 kb Region des Introns 22 und einer von zwei fast identischen Kopien am Telomerende zurückzuführen und führt zum Wechsel des Exons 1 zu 22 zum Telomerende.

Unter acht verschiedenen Studien mit schwer betroffenen A-Patienten variierten die Inhibitorinzidenzen dieser Mutation (Inhibitorpatienten mit dieser Mutation bezogen auf die Inhibitorpatientenanzahl insg) von 29% (Poon et al.,1995) bis zu 66% (Schwaab et al.,1995).

Unsere Inhibitorinzidenzrate unter den schwer betroffenen Patienten mit dieser Mutation betrug 30,9%. Dies ist vergleichbar mit der Studie von Schwaab (1995), der eine Inzidenzrate von 34,4% zeigte.

Die „Hotspots“ der FVIII-Mutationen sind:

- a) die Intron 22-Inversion
- b) 2 Serien von Adeninnukleotiden auf Exon 14
- c) CpG-Dinukleotide, welche Punktmutationen hervorrufen.

Das FVIII-Gen weist 70 CpG -Nukleotide auf.

Spontane Desaminierung des 5' methylierten Cytosins führt zum TpG-Dinukleotid. Es konnte gezeigt werden, daß CG zu TG oder CA-Mutationen 10-20 mal häufiger vorkommen als CG-Mutationen, die zu einem anderen Dinukleotid führen. (Youssonfian et al., 1988).

Einer der wichtigsten Frage hinsichtlich der Pathogenese der Inhibitorbildung ist:

Warum entwickeln nicht alle Patienten mit einer „O-Mutation“ einen Inhibitor? Die Intron 22-Inversion ist ein gutes Beispiel dafür. Eine Theorie besagt, daß ein wenig mütterliches FVIII im Uterus der Mutter für das fetale Immunsystem schützend wirkt, und dieses könnte Immuntoleranz zu exogenem FVIII induzieren.

Auch das individuelle Immunsystem eines jeden Patienten, die Situation der ersten Faktorgabe und die Art des Präparates kann das Risiko vergrößern oder verringern.

Es wird vermutet, daß eine Immunantwort bei allen Patienten mit O-Mutationen auftritt, jedoch bei 2/3 der Patienten infolge unbekannter Mechanismen „down“-reguliert wird (Oldenburg u. Tuddenham 2002, Oldenburg 2002).

### **5.3 Mutationen als Risikofaktor bei der Hämophilie B**

Die Hämophilie B wird durch eine große Anzahl von verschiedenen Mutationen auf dem FIX-Gen verursacht.

In unserer Studie wiesen über 61% der HB-Patienten Missensemutationen (Substitution von einer Aminosäure durch eine andere) auf. Andere vereinzelte Mutationen waren Intron-, Splice site- und Promotormutationen. Die beiden Inhibitorpatienten waren von der großen Deletion und der Nonsensemutation betroffen.

Seit Einführung der Polymerasekettenreaktion wurden die FIX-Gene von mehr als 1500 HB-Patienten hinsichtlich der Mutationen analysiert (Lillicrap 1998).

Es existiert eine weltweite Mutationsdatenbank ([www.ums.ac.uk/molgen/haemBdatabase](http://www.ums.ac.uk/molgen/haemBdatabase)), die 1990 zusammengestellt wurde und die Anzahl der Mutationstypen jährlich aktualisiert. Sie wird in Nucleic Acids Research publiziert (Giannelli et al., 1997).

Die Verteilung der Mutationen variiert nur leicht von Studie zu Studie. Allen Untersuchungen ist gemeinsam, daß über 60% der Patienten des schweren bis milden

Phänotyps von Missensemutationen betroffen sind (Wulff et al., 1999, 2001). Dies ist auch bei unserer Studie der Fall.

Die folgende Tabelle soll dies veranschaulichen.

Tabelle 33

Vergleich der HB-Mutationen bei verschiedenen Studien

<u>Mutationstyp</u>	<u>Lillicrap 1998</u>	<u>Greifswald-Studie</u> <u>(Wulff 2001-02)</u>	<u>Studie Frankfurt</u> <u>2003</u>
Missense	67%	66,8%	61,5%
Nonsense	13%	14,9%	8,3%
Promotor	3%	2,4%	8,3%
Splice site	6%	4,5%	4,1%
Frameshift	5%	5,9%	4,1%
Große Deletion	3%	4,2%	4,1%
Insertion	-	0,3%	-
Chromosomale Rearrangements	-	0,3%	-

Die Studie aus Greifswald hat einen hohen Aussagewert, da insgesamt 289 Patienten untersucht wurden. 257 Punktmutationen wurden hier entdeckt.

Bei einer neueren Studie von Mukherjee et al. (2003) verursachten Missensemutationen 59% der schweren und moderaten Hämophilie B, und diese waren fast immer Spontanmutationen.

Wie eine Studie aus Schweden (Ljung 1995) zeigte, entwickelte unter 41 Familien kein einziger Patient mit einer Missensemutation einen Inhibitor. Auch bei der HB scheinen die Patienten mit dieser Mutation wenig endogenes, wenn auch nicht-funktionelles FIX-Protein zu synthetisieren. Dieses reicht aus, um Immuntoleranz zu induzieren (Ljung 1995; Oldenburg et al., 1998).

Jedoch ist das Risiko, einen Inhibitor zu bilden, bei Patienten mit den sogenannten 0-Mutationen wie Deletionen und Nonsense sehr hoch (Ljung 1995) (wie im Kap.5.2. beschrieben wird). Dies wird auch durch unsere Ergebnisse bestätigt.

Patienten mit den 0-Mutationen können auch bei der HB kein endogenes Protein bilden und sind somit, wie bei der Hämophilie A, am meisten gefährdet.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, bestehen viele der Mutationen aus C zu T oder G zu A-Transitionen bzw. Transversionen (CG zu TG oder CA - dies ist davon abhängig, auf welchem Strang der DNA das 5-Methylcytosin mutiert ist). CpG-Dinukleotide werden auch in der Literatur als „hotspots“ der Hämophilie-B-Mutationen bezeichnet (Koeberl et al., 1989; Green et al., 1989; Ketterling et al., 1994).

Spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin des CG-Basenpaares führt zu den beschriebenen Transitionen. Mehr als 30% (Koeberl et al., 1990) aller Nukleotidsubstitutionen gehören zum Typ dieser Transitionen.

Mit zunehmender Größe der Datenbank wurde klar, daß viele der Mutationen auf GC-Stellen (speziell solche, die milde Phänotypen hervorrufen) auf einen „founder“-Effekt zurückzuführen sind (Thompson et al., 1990, Morgan et al., 1995).

Einige Studien geben Hinweise, daß ein signifikanter Anteil der milden HB (20-30%) auf eine kleine Anzahl der founder-Mutationen zurückzuführen ist (Sommer et al., 1996, Morgan 1995).

Zwei Typen der FIX-Mutationen werden mit Inhibitorbildung assoziiert, und zwar Punktmutationen, welche frameshifts und Stop-Codons verursachen (High 1995) und große Gendelektionen und Rearrangements (Warrier et al., 1997).

Die Mutationen können die FIX-Funktion in verschiedener Weise beeinflussen. Sie haben eine Auswirkung auf die Transkription, die m-RNA-Bildung, die Translation oder die Struktur des FIX (Wulff et al., 2001).

Die Promotormutation könnte einen Einfluß auf die Transkription des Faktor IX haben. Punktmutationen auf der Promotorposition -23 bis 13 könnten zur Hämophilie Typ Leiden führen. Diese Form ist charakterisiert durch eine schwere Form in der Kindheit, welche sich in der Pubertät verbessert.

Bei den Splice site-Mutationen konnte nachgewiesen werden, daß sie in allen Fällen zur schweren Krankheit führen- mit einer Reduktion der FIX-Aktivität mit einem ähnlich reduzierten FIX-Antigen-level (Wulff 2001).



#### 5.4 Niedrige Inhibitorinzidenzrate bei Hämophilie B

Von 30 behandelten Hämophile B-Patienten entwickelten nur 2 Inhibitoren (6%).

Bei der Hämophilie A zeigten in unserer Studie 21% aller behandelten Patienten Inhibitoren.

Auch alle anderen Studien zeigen eine sehr niedrige Inzidenzrate bei der HB.

Die meisten Studien geben für die Hämophilie B eine Inhibitorinzidenz von 1-3% an (Briet 1991, Sultan et al., 1992) und für Hämophilie A 15-30% (Hoyer 1995, Lusher et al., 1993).

Wie läßt sich für diesen großen Unterschied eine Erklärung finden?

Der entscheidendste Faktor scheinen die unterschiedlichen Mutationstyp-Profile bei der Hämophile A und B zu sein. Der Anteil der 0-Mutationen beträgt weniger als 20% bei der Hämophile B (Giannelli et al., 1998), ist aber größer als 70% für die Hämophilie A (Becker et al., 1996).

Große Gendeletionen betreffen 1-3% aller HB-Patienten, aber sie repräsentieren zwischen 30-50% der Mutationen bei Inhibitorpatienten. Die Größe der Gendeletionen variiert von einigen Nukleotiden über mehr als 35 kb oder betrifft das komplette FIX-Gen (High 1995).

In Studien von Ljung (1995) wurde das Risiko, einen Inhibitor zu bilden, bei Gendeletionspatienten mit über 33% angegeben. Ein 20%-iges Risiko haben Patienten mit Stop-Codons, frameshift-oder splice-site Mutationen. Ein 3%-Risiko wird angegeben, wenn die Mutation unbekannt ist und ein 0-Risiko für Patienten mit einzelnen Aminosäuresubstitutionen wie Missensemutationen (Green et al., 1991).

Da über 60% der HB-Patienten Missensemutationen aufweisen, ist das Inhibitor-Risiko bei der HB also geringer.

Ein anderer möglicher Faktor ist, daß es weniger Patienten mit schwerer HB gibt. Nur 30-37% aller Patienten haben eine schwere Hämophilie B (Katz et al., 1996; Warrier et al., 2000). Somit ist das Risiko, einen Inhibitor zu bilden, allgemein geringer als bei HA.

Das FIX-Protein an sich weist zudem bestimmte Charakteristika auf. Die Aminosäuresequenzen unter den Vitamin K-abhängigen Proteinen sind konserviert, darunter gehört auch das FIX-Protein. Auch wenn das FIX-Protein bei schweren Hämophilen nicht vorhanden ist, könnte die Anwesenheit von anderen Vitamin K-

abhängigen Proteinen wie Faktor II, VII und X zu einer gewissen Toleranz auf infundierten Faktor IX führen (High 1995; Warrier et al., 1997).

Außerdem existiert bei HB-Patienten eine viel höhere Nicht-Plasma-Konzentration von FIX (5 µg/ml gegen 100 ng/ml bei FVIII), so daß Patienten auch bei nicht erkennbarer FIX-Plasma-Konzentration möglicherweise geringe Mengen des Proteins synthetisieren, die ausreichend für eine Induktion der Immuntoleranz sind (High 1995).

Zudem ist das FIX-Protein ungefähr 5-mal kleiner als das FVIII-Protein und hat somit weniger Epitope, gegen die Antikörper gebildet werden können. Jedoch gibt es bislang über die Epitope des FIX-Proteins keine aussagekräftige Information (Warrier 2000).

Die FIX-Antikörper sind IgG4-Antikörper und aktivieren nicht das Komplementsystem. Sie haben eine gleiche Affinität zu schwerer und leichter Kette des Proteins (High 1995).

Ein relativ neu beobachtetes Phänomen bei HB ist das Auftreten von Anaphylaxe bei gleichzeitiger Inhibitorbildung. In einer Studie von Thorland et al. (1999) wurde gezeigt, daß Patienten mit einer kompletten Gendeletion ein 26%-iges Risiko haben, mit einer Anaphylaxe bei Inhibitorbildung zu reagieren. Jedoch ist unklar, warum einige Patienten mit Anaphylaxe reagieren und andere nicht. Möglicherweise beeinflussen der Typ des Präparates, die Dosierung und der Mutationstyp die allergische Reaktion.

## **5.5 Inhibitoren bei milder und moderater Hämophilie A**

In unserer Studie entwickelten 4 von 67 (6%) Hämophilen mit mildem/moderatem Phänotyp einen Inhibitor. Wie auch in der Literatur beschrieben, stellen diese Inhibitoren eine ungewöhnliche Komplikation bei milden Hämophilen dar und erscheinen mit einer Inzidenz von nur 3-13% der Patienten (Hay et al. 1998, Ehrenforth et al., 1992), im Gegensatz zur schweren Hämophilie A.

Ein Faktor scheint auch hier die Familienanamnese zu sein, denn 41% der Patienten, die Familienangehörige mit milder Hämophilie und Inhibitorbildung hatten, zeigen eine Prädisposition für die Inhibitorbildung (Hay et al., 1998).

Der wichtigste Faktor ist aber auch hier der Typ der Mutation. Die Mutationen, welche milde/moderate Hämophilie A hervorrufen, sind auf dem ganzen Faktor VIII-Gen verteilt (Tuddenham et al., 1994). Jedoch scheinen die Mutationen, die für die Inhibitorbildung verantwortlich sind, auf der A2- und C2-Domäne lokalisiert zu sein. Diese Mutationen sind die Arg 593-Cys und die Trp 2229-Cys-Mutationen (Thompson et al., 1997; Fijnvandraat et al., 1997), speziell bei milder Hämophilie A. Diese Mutationen wurden in 9 von 16 Patienten mit milder Hämophilie und Inhibitoren gefunden. Patienten mit diesen Mutationstypen haben ein größeres Inhibitor-Risiko von bis zu 40% (Hay et al., 1998).

Es wird angenommen, daß diese Mutationen zu einer Konformationsänderung in der Struktur des FVIII-Moleküles führen. Somit unterscheidet sich das FVIII-Protein des Patienten in seiner antigenen Struktur vom „Wildtyp“, und damit wird infundierter FVIII als fremd bzw. nicht-selbst erkannt. Die Toleranz gegenüber infundiertem FVIII existiert nicht mehr. Dies führt zur Inhibitorbildung (Schwaab et al. 1995, Thompson et al. 1997, Fijnvandraat et al. 1997).

Diese werden bei milder Hämophilie A meist als transient beschrieben, sie sind bei 60% der Patienten nach einem Median von 9 Monaten nicht mehr existent. Jedoch bestehen sie bei über 40% der Patienten über mehrere Monate oder Jahre (Santagostino et al., 1995, Hay et al., 1998).

Inhibitoren bei milder/moderater Hämophilie neutralisieren („cross-reagieren“) normalerweise endogenen und exogenen Faktor VIII, so daß der basale FVIII-C-level auf  $< 0,01$  IU/ ml reduziert wird. Dies verursacht eine spontane Blutung (Santagostino 1995, Hay 1998, Tuddenham et al. 1994). Viele Patienten entwickeln die klassische Blutungsfrequenz der schweren Hämophilie, aber zwei Drittel bekommen Blutungen der erworbenen Hämophilie. Auch lebensbedrohliche Blutungen wie Gastrointestinal- und Urogenitalblutungen wurden beobachtet.

Der Inhibitor tritt normalerweise nach einer sehr intensiven, periodischen Behandlung auf, z.B. vor einer Operation oder bei Trauma.

Die Inhibitoren bei milder Hämophilie treten in späterem Lebensalter (Median 33 Jahre, Spannweite 7-71) auf als die der schweren Hämophilie (Kesteven et al., 1984). Dies ist auch bei unseren Studienpatienten mit milder Hämophilie der Fall.

Das spätere Auftreten der Inhibitoren verdeutlicht auch die Unregelmäßigkeit, mit der die Patienten die FVIII-Infusionen bekommen.

## 5.6 Einfluß der FVIII-Dosierung auf die Inhibitorbildung

Bei unserer Studie zeigte sich bzgl. der Dosierung ein signifikanter Unterschied zwischen High-Respondern und Nicht-Inhibitorpatienten.

Auffallend ist, daß die meisten Nicht-Inhibitorpatienten (60%) in den ersten 20 Expositionstagen < 40 IE/kg KG dosiert wurden, während es bei den High-Respondern nur 40% waren und die meisten mit höheren Dosierungen > 40 IE/kg KG substituiert wurden.

Bisher gibt es keine eindeutigen Studien über das möglicherweise größere Inhibitor-Risiko bzw. High Responder-Risiko bei höherer Dosierung des FVIII.

Eine höhere Dosierung ist im Rahmen einer „aggressiven“ Behandlung im Blutungsfall erforderlich.

Jedoch sind sich die verschiedenen Studien darüber einig, daß die Dosierung und die Frequenz der Substitutionen einen Einfluß auf die Inhibitorbildung haben könnten (Scharrer et al., 1999; Penner et al., 2001; Dimichele et al., 2002).

Das Ergebnis hinsichtlich der Dosierung bei unserer Studie sollte kritisch betrachtet werden.

Zum einen ist die Anzahl der High-Responder sehr gering, im Gegensatz zu der viel höheren Anzahl der Nicht-Inhibitorpatienten.

Hinzu kommt, daß Patienten mit sehr schwerer Blutung und stärkerer Blutungsfrequenz eine höhere Dosierung benötigen. Außerdem gibt es Hinweise, daß auch der Präparatetyp und die spezifische Aktivität des Präparates eine Rolle spielen (Penner 2001).

Zu erwähnen ist auch, daß bei unserer Studie nur zwei Patienten, die unter Prophylaxe behandelt wurden, Inhibitoren entwickelten. Die meisten aller Inhibitoren traten unter der Bedarfsbehandlung auf.

Dosierungen von 100 oder über 100 IE/kg KG innerhalb der ersten 20 Tage sind normalerweise recht ungewöhnlich (wenn noch kein Inhibitor existiert), außer im Falle von besonderen Ereignissen. Zu diesen Ereignissen zählen eine sehr schwere Blutung oder bei Bedarf vor/ nach einer Operation.

## 5.7 Einfluß des Alters auf die Inhibitorbildung

Die meisten Inhibitoren gegen FVIII treten in der Kindheit auf. Deshalb wird angenommen, daß das Alter, bei welchem die Behandlung erstmals stattfindet, einen potentiellen Risikofaktor darstellt (Penner et al., 1999, Scharrer et al., 1999).

Bei unserer Studie wurden 42,8 % der High-Responder und 55,5% der Low-Responder zwischen 0,5 und 1 Jahr erstmals behandelt. Nur 1 High- und 3 Low-Responder (7,1% und 16,6%) wurden im Alter  $> 1,5$  Jahre behandelt, d.h. es existieren weniger Inhibitorpatienten, die in späterem Alter die erste Substitutionsbehandlung bekamen. Zudem ist der Median des Alters bei erster ED bei High-Respondern mit 0,8 Jahren kleiner als der Median der Erst-ED der Low-Responder mit 1,0 Jahren.

Es gibt nur sehr wenige Studien, die etwas über den Risikofaktor Alter aussagen.

In zwei neueren Studien von Lorenzo et al. (2001) und van der Bom et al. (2003) wurde der Einfluß des Alters bei Erstbehandlung analysiert.

In der Studie von Lorenzo wurden 62 schwere Hämophilie A-Patienten (RA $< 2\%$ ) zweier spanischer Hämophiliecenter eingeschlossen. 15 dieser 62 Patienten entwickelten klinisch signifikante Inhibitoren. Nach 3 Jahren Beobachtungszeit war die Inhibitorinzidenz 41% bei Patienten, die  $< 6$  Monate ihre erste Behandlung bekamen. 29% der Inhibitoren zeigten sich bei Patienten, die zwischen 6 und 12 Monaten das erste Mal behandelt wurden und 12% bei Patienten, die älter als 1 Jahr alt waren.

Zwei kooperierende Studien aus Frankreich bestätigen die Theorie, daß eine höhere Inzidenz an Inhibitoren auftritt, wenn die Patienten in sehr jungem Alter erstmalig behandelt werden:

Rothschild (1998) und Guerois (1995) zeigten, daß 11 von 32 und 5 von 31 schweren Hämophiliepatienten, unter 1 Jahr behandelt, Inhibitoren bildeten. Dagegen steht die Zahl von 3/18 und 0/25 bei Patienten, erstmals behandelt über einem Jahr.

Auch die neueste Studie aus Holland von Van der Bom et al. (2003) bestätigt die Theorie. Hier entwickelten 12/81 schweren Hämophiliepatienten persistierende Inhibitoren. Der Median des Alters, bei welchem die Patienten die erste Infusion bekamen, lag bei 0,9 Jahren. Bei 100 Expositionstagen war die Inzidenz 34% bei Patienten  $< 6$  Monate behandelt und 20% bei Patienten bis 1 Jahr erstmalig behandelt. Keine der über 1,5 Jahre alten Patienten entwickelte Inhibitoren.

Sehr interessant ist auch die Tatsache, daß Patienten, die in jüngerem Alter behandelt wurden, schon nach einer geringeren Anzahl von FVIII-Infusionen Inhibitoren entwickelten (Van der Bom 2003). Nach nur 14 Infusionen entwickelte sich der Inhibitor bei Kindern < 6 Monate, verglichen mit 40 Infusionen bei Kindern zwischen 1 und 1,5 Jahren.

Jedoch darf man aus diesen Tatsachen nicht schließen, daß das Alter in einer direkten Weise das Risiko der Inhibitorbildung beeinflusst. Andere Faktoren wie z.B. die Schwere der Blutung spielen auch eine Rolle. Patienten, die eine sehr schwere Blutung haben, benötigen die Infusionen in sehr frühem Alter. Die Blutungsfrequenz wiederum hängt ab vom Nicht-Vorhandensein des endogenen Faktor VIII, was auf die spezielle FVIII-Mutation zurückzuführen ist.

Die Ursachen des höheren Inhibitor-Risikos bei früherer Behandlung sind nicht bekannt. Jedoch werden u.a. inflammatorische Prozesse in der frühen Kindheit als Faktoren diskutiert, die die Immunantwort auf ein fremdes Antigen verändern könnten (Oldenburg et al., 2000).

Eine Möglichkeit der Behandlung wäre (um das Risiko zu minimieren), die Kinder in den ersten 6-12 Lebensmonaten mit rekombinant aktiviertem Faktor VII zu behandeln (Lorenzo et al., 2001).

## **5.8 Die produktbezogene Inhibitorinzidenz bei Hämophilie A-Patienten:**

### **Vergleich von r- und pdFVIII-Präparaten**

Bei unserer Studie war kein signifikanter Unterschied bzgl. der Inhibitorinzidenzen von rekombinanten und plasma-derived Präparaten zu erkennen. Die Inhibitorinzidenz für pdFVIII-Präparate bei schwerer Hämophilie betrug 24,5% und für rFVIII-Präparate 37,7%.

Eine Verbindung zwischen Inhibitorinzidenz und verwendeten FVIII-Produkten wird lange diskutiert (Vermylen et al., 1993; Kasper et al., 1996). Besonderes Interesse wurde dabei auf die Unterscheidung von rFVIII und pdFVIII gelegt. Die klinischen prospektiv durchgeführten Studien führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

Die Verwendung verschiedener Untersuchungsparameter erschwerte die Vergleichbarkeit der ermittelten Inzidenzen. Erst seitdem die Studien an PUPs und nur

mit einem Präparat unter einer gewissen Standardisierung durchgeführt werden, ist ein Vergleich möglich. Die gefundenen Inzidenzen sind in der Tabelle dargestellt.

Eine einheitliche Studie zu den pdFVIII-Präparaten an PUPs existiert nur für Monoclata® und Hemofil M® (Lusher et al., 1991; Addiego et al., 1992).

Neuere prospektive an PUPs durchgeführte Studien zeigen einen Vergleich und beinhalten Patientencharakteristika wie Schweregrad, Alter, Dosis und den Zeitpunkt der Inhibitorbestimmung (Addiego 1992, Ljung 1992, de Biasi 1994, Lusher 1997, Gruppo 1998, Lusher 1990, Muntean 1997, Rothschild 1998).

Tabelle 34

Vergleich der Inhibitorinzidenzen bei verschiedenen Studien: Präparatevergleich

<b>Studie</b>	<b>Rothschild et al. 1998</b>	<b>Gruppo et al. 1998</b>	<b>Ehrenforth et al. 1992</b>	<b>de Biasi et al. 1994</b>
Produkt	Recombinat®, Kogenate®	Recombinat®	versch. pd-Präparate	versch. pd-Präparate
Anzahl der Patienten RA<2%	52	72	27	48
Inhibitorinzidenz	28,8%	30,5%	52%	22%
HR (%)	5 (9,6%)	7 (9,7%)	12 (44,4%)	9 (18,8%)
LR (%)	10 (18,9%)	15 (20,8%)	2 (7,4%)	2 (4,2%)

Dies sind jeweils nur 2 Beispiele für durchgeführte prospektive Studien; die gesamten Vergleiche aller Studien können unter Scharrer et al. (1999) nachgelesen werden. Die Inhibitorinzidenzen bei pdFVIII -Präparaten haben eine Spannweite von 21-52%, die vergleichbar sind mit denen der rekombinanten Präparate, die von 20,7%-30,5% reichen. In einer Studie von Lusher et al. (1999) wurde die Inzidenz für Kogenate® mit 21%, Recombinat® mit 32% und Refacto® mit 30% angegeben (Courter et al., 2001).

Die Studien unterschieden sich vor allem in der Gesamtanzahl der Patienten und vom Präparatetyp her.

Bei einem Vergleich der Inzidenzen der High Responder (>10 BU) mit schwerer Hämophilie konnten auch keine Unterschiede zwischen pd- und r-Präparaten festgestellt werden. Die High Responder-Inzidenzen reichten von 13% und 23% bei rFVIII-

Präparaten und 20-44% bei pdFVIII-Präparaten unter neueren prospektiven Studien (Scharrer et al., 1999).

Die HR-Inzidenzen in unserer Studie betragen 7,8% für pdFVIII-Präparate und 13,6% für rFVIII-Präparate.

Bei einer neuen prospektiven Studie (Kreuz et al., 2002) wurden 72 Hämophilie A-Patienten hinsichtlich der Inhibitorinzidenz betrachtet. Die Inzidenzen waren 46% für pd-Präparate und 36% für rFVIII-Präparate, somit war auch hier kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Die Verteilung der High-Responder (RA < 1%) betrug 37% für pdFVIII-Präparate und 36% für rFVIII-Präparate.

Jedoch betrug der Median der Expositionstage der rFVIII-Gruppe nur 49 Tage, so daß hier das Risiko der künftigen Inhibitorentwicklung gegeben ist.

Bisher konnte keine Studie einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Inhibitorinzidenzen von pd- und rFVIII-Präparaten nachweisen. Daher wird allgemein angenommen, daß hochgereinigte Faktor VIII-Konzentrate, speziell rekombinante Präparate, nicht stärker immunogen als andere Präparate sind.

Eine einzige Ausnahme stellt eine erst kürzlich retrospektiv durchgeführte Studie aus Frankreich dar (Rothschild 2003). 149 schwer erkrankte Hämophilie A „PUPs“ wurden zwischen 1986 und 2002 mit pd-FVIII (LFBtm) und rFVIII-Präparaten (Kogenate®, Recombinate®) behandelt. 27 von 86 rekombinant behandelten Patienten und 7 von 63 mit pd-FVIII behandelten Patienten entwickelten Inhibitoren, so daß bei dieser Studie eine signifikant niedrigere Inhibitorinzidenzrate für pdFVIII-Präparate vorliegt.

## **5.9 Vergleich der Epidemiologie der Inhibitorentwicklung mit anderen Studien**

In unserer Studie betrug der Anteil der schwer erkrankten Hämophilie A-Patienten 50,6% und der Anteil der milden/moderaten Erkrankten 24,8% und 24,4%.

30,8 % der schweren Hämophilen entwickelten Inhibitoren und 9,3% der moderaten sowie 4,2% der milden Hämophilen. Inhibitoren entstehen somit häufiger bei der schweren Form, verglichen mit der moderaten/leichten Form. Dies ist nicht überraschend, denn diese Patienten weisen niedrige Konzentrationen von



zirkulierendem (nicht-funktional) endogenem FVIII auf, während bei den schwer betroffenen Patienten kein zirkulierender FVIII entdeckt werden kann (Hoyer 1994).

Frühere Inhibitor-Studien berücksichtigten vorwiegend die Inhibitorprävalenz. Die Prävalenz gibt lediglich die aktuelle Anzahl der Hemmkörperpatienten zu einem bestimmten Zeitpunkt an, während die Inzidenz die Anzahl aller neuen Inhibitorpatienten in einem bestimmten Zeitraum berücksichtigt.

Neuere prospektive PUP-Studien sind miteinander weitgehend vergleichbar: Unabhängig vom Schweregrad der Hämophilie konnte in 7 prospektiven Studien eine Inhibitorinzidenz zwischen 18,4% und 28% beobachtet werden. Die Inhibitorentwicklung war auch hier vom Schweregrad und vom Alter der Patienten abhängig. Patienten mit schwerer Krankheit zeigten eine höhere Inzidenz (21-52%) als jene mit moderater Krankheit (5,3-12,5%) (Kreuz et al.,1995).

Vergleichbar mit unseren Ergebnissen ist eine seit 1989 durchgeführte Studie von Lusher et al. (1993). Von insgesamt 101 Patienten hatten 62,3 % eine schwere Hämophilie und 16,8 % eine moderate sowie 20,8% eine milde Krankheit.

Jedoch gibt es auch Unterschiede bezüglich dieser Verteilung. Bei einer von Addiego et al. (1993) durchgeführten Studie waren alle 89 eingeschlossenen Patienten von der schweren Form betroffen, der Studienzeitraum betrug 10 Jahre. Bei dieser Studie betrug die Inhibitorinzidenz 28%, ist also vergleichbar mit unserem Ergebnis. Bei Lusher (1993) betrug die Inhibitorinzidenz für schwere Hämophilie 27% und für moderate 11,8%.

Die folgende Tabelle zeigt die Unterschiede der Verteilungen der High/Low-Responder, die Anzahl der Tage bis zur Inhibitorentwicklung und das Alter bei erster Exposition im Median.

Tabelle 35

Inhibitorinzidenz und High-/Low Responder bei verschiedenen Studien

Studie	Inhibitor- patienten	Inzidenz RA<1%	HR	LR	EDs bis Inhibitor- entwicklung	Alter bei erster ED (Jahre)- Median
Ehrenforth 1992	15/63	52%	6	1	11	0,9
Addieggo 1993	25/89	28%	20	5	11	Nicht bekannt
Lusher 1993	19/99	27,2%	12*	4	9	0,8
Ljung 1992	17/81	21%	6*	5	Nicht bekannt	Nicht bekannt
Bray 1992	19/72	26,4%	7	12	10	0,6
De Biasi 1994	13/64	22,9%	11	2	36	Nicht bekannt

Die mit der Markierung \* bezeichneten HR-Patienten erreichten mehr als 10 BU.

Im Gegensatz zu unserer Studie, bei der fast eine Gleichverteilung von High- und Low-Respondern zu erkennen war, existierten bei den oben genannten Studien mehr High-Responder (außer Bray et al., 1992).

Wie auch bei unserer Studie, traten die meisten Inhibitoren bei fast allen Studien nach nur 9-11 Tagen im Median auf.

Die Spannweite betrug 2-195 Tage.

Bei de Biasi traten die Inhibitoren sehr viel später auf, nämlich erst nach 36 Tagen.

Die divergierenden Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch einige der nicht einheitlichen Studienbedingungen erklären:

- Unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte zur Entdeckung eines- auch klinisch nicht relevanten- Inhibitors
- Unterschiedlich untersuchte Altersgruppen von Hämophilen
- Unterschiedliche Berücksichtigung des Schweregrades der Hämophilie
- Verschiedene sensitive Laboruntersuchungsmethoden, speziell für Inhibortestung (z.B. Oxford- vs Bethesda-Methode) ohne Genzwertangaben im unteren Inhibitorbereich
- Evtl. unterschiedliches Therapieregime, z.B. früh nach Hämophilie-Diagnose einsetzende Dauersubstitutionsbehandlung mit dem Ergebnis einer Immuntoleranz, speziell bei niedrig-titrigen Inhibitoren und/oder „Low-Respondern“.

Das Alter bei erster Exposition wurde nur bei einigen Studien untersucht. Die Spannweite des Alters bei erster Exposition betrug 0,1-4 Jahre. Die Studie von Ehrenforth zeigte das gleiche Alter bei erster Exposition wie bei unserer Studie.

Das Alter bei Inhibitorentwicklung lag im Median zwischen 0,8 und 3,3 Jahren (Spannweite 0,5-12,9 Jahre) und liegt bei diesen Studien somit höher als bei unserer Studie. Unsere Studie zeigt, daß das Alter der Inhibitorentwicklung fast identisch mit dem Alter der Erstexposition ist.

Dies ist damit zu erklären, daß die meisten Patienten von Anfang an ohne Unterbrechung eine Bedarfsbehandlung bekamen und die Spannweite der EDs bis zur Inhibitorentwicklung „nur“ bis 56 Tage und nicht bis 195 Tage reichte.

### **5.10 Therapieregime bei schwerer Hämophilie A: Bedarf und Prophylaxe**

Die meisten der Patienten bekamen eine Bedarfstherapie („on-demand“), wie unter dem Kapitel "Dosierung" schon beschrieben. Eine Bedarfstherapie wird im Blutungsfall und vor/nach Operationen angewendet.

Da die meisten der Patienten eine Bedarfstherapie erhielten oder eine Kombination von Bedarf/Prophylaxe (nach einigen Wochen erfolgte Umstellung von Bedarf auf Prophylaxe), kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die Art der Behandlung einen Einfluß auf die Inhibitorbildung hat. Jedoch entwickelte sich der Inhibitor in den meisten Fällen unter Bedarf.

Das Ziel der Prophylaxe ist, die Blutungshäufigkeit der schweren Hämophilie der Blutungsfrequenz der moderaten Hämophilie anzupassen.

Van den Berg et al. (2003) zeigte einen Vergleich der Langzeitwirkungen von Bedarf, Niedrigdosis- und Hochdosisprophylaxe bei Patienten aus Frankreich und Holland.

Die Prophylaxe erzielte bessere orthopädische und radiologische Ergebnisse als die Bedarfstherapie. Es stellte sich heraus, daß Patienten, die sehr früh Prophylaxe bekamen, später weniger Blutungen hatten und weniger von Arthropathie betroffen waren als andere. Auch Smith et al. (1996) und Aledort et al. (1994) zeigten dies in ihren Studien.

Während bei der Bedarfsbehandlung der Faktorverbrauch mit zunehmendem Alter steigt, sinkt er bei der Prophylaxe mit zunehmendem Alter.

### 5.11 Behandlung von Patienten mit Inhibitoren und Immuntoleranz

Die Art der Behandlung ist vorwiegend vom Inhibitortiter abhängig. Bei Patienten mit „low responding“-Inhibitoren ( $< 5$  BU/ml), kann der Inhibitor mit entsprechendem Faktor gesättigt und Hämostase erreicht werden. Dies kann auch bei „high responding“-Inhibitoren möglich sein, wenn der Inhibitor noch nicht lange Zeit existiert und nicht sehr hoch-titrig ist.

Bei Patienten mit sehr hohem Inhibitortiter kommen rekombinanter FVIIa, nicht-aktivierte und aktivierte Prothrombinkomplexe oder porcines Faktor VIII in Frage (Astermark 2003).

Das Bonn-Protokoll (Hochdosistherapie) wird angewendet, um eine lebenslange Immuntoleranz gegenüber substituierten Faktor VIII zu erzielen (Brackmann 1977 + 1996; Oldenburg et al., 1999).

Die genauen Dosierungen und Behandlungsphasen bei Kindern und Erwachsenen können unter Brackmann & Wallny (1996) nachgelesen werden.

Erfolgreiche Inhibitorelimination wird definiert, wenn 1) keine erkennbaren FVIII-Inhibitoren in 3 Bethesda-assays zu erkennen sind und 2) normale FVIII-recovery und Halbwertszeit besteht und 3) kein Wiederauftreten des Inhibitors bei Folgetherapie erfolgt.

Bei der Immuntoleranz werden häufig neutralisierende Anti-idiotypische Antikörper gegen den Inhibitor gebildet (Gilles et al., 1996).

Anti-idiotypische Neutralisierung von Anti-FVIII Autoantikörpern wurde auch bei gesunden Individuen entdeckt (Gilles et al., 1994).

## 5.12 Zusätzliche mögliche beeinflussende Faktoren der Inhibitorentwicklung

Kenntnis über die Rolle der Gene, die bei der Inhibitorentwicklung involviert sind, ist nur für die Hämophilie A bekannt. Scharrer (1999) zeigte eine Analyse von 3 USA-Studien (Kogenate (Lusher 1997), Recombinate (Gruppo 1998) und eine retrospektive Studie (Addiego 1994)), die klare Hinweise geben, daß die Rasse einen Einfluß hat. Unter afrikanischen Amerikanern mit schwerer Hämophilie zeigte sich eine Inhibitorinzidenz von 51,9% gegenüber den Kaukasiern mit 25,8%-30%.

Gill et al. (1999) verglich die Inhibitorinzidenz von hämophilen Geschwistern mit entfernteren kranken Verwandten und fand eine höhere Inzidenz für Geschwister (50%) als für hämophile Verwandte (9%).

Diese zwei beobachteten Unterschiede deuten darauf hin, daß die Inhibitorinzidenz auch auf genetische Variationen des Immunsystemes zurückzuführen ist (Oldenburg et al., 2002).

MHC-Klassen und Cytokine sind an der Immunantwort beteiligt, die zur Inhibitorbildung führt. Der Einfluß der MHC-Klasse-Gene wurde in mehreren Studien untersucht (Aly et al., 1990, Lippert et al., 1990, Mayr et al., 1984, Oldenburg et al., 1997).

Die Frequenz der HLA-Allele variiert wahrscheinlich geographisch und ist von der Rasse abhängig (Hay et al., 1999).

Die MHC-Klasse 2-Gene DQ, DR und DP sind von Interesse, denn ihre Funktion besteht darin, dem Immunsystem extrazelluläre Gene- wie substituierten FVIII- zu präsentieren.

In einer neuen Studie wurde bei Patienten mit Intron 22-Inversionen der Einfluß des MHC Klasse 1 und 2-Genotypes auf die Inhibitorbildung untersucht (Oldenburg et al., 1997).

Die Ergebnisse zeigten, daß die Allele A3, B7, C7, DQA0102, DQB0602 und DR15 als Risikoallele bezeichnet werden können, denn sie erschienen viel häufiger bei Inhibitorpatienten als bei Nicht-Inhibitorpatienten. Im Gegensatz dazu konnten die Allele C2, DQA0103, DQB0603 und DR13 als schützend bezeichnet werden, denn sie erschienen weitaus weniger häufig bei Inhibitoren als bei Nicht-Inhibitorpatienten.

Hay et al.(1997) identifizierte dieselben MHC-Klasse 2-Allele bei Patienten mit Intron 22-Inversionen. Dies unterstützt die Theorie, daß die MHC-Allele ein gewisses Risiko darstellen. Jedoch zeigte keine der beiden Studien signifikante Ergebnisse!

### **5.12.1 Die Mechanismen, die eine erhöhte Immunogenität in FVIII-Präparaten hervorrufen können**

Eine Aktivierung des Immunsystems sollte gegen körperfremdes Protein oder Epitop prinzipiell immer erfolgen. Das Inhibitor-Risiko ist somit vom genetischen Defekt bzw. der FVIII- Restaktivität abhängig (Schwaab et al., 1995).

Eine Erkenntnis, zu welchem Zeitpunkt eine Freisetzung des FVIII und eine T-Zellaktivierung nach der Substitution eines Patienten erfolgt, gibt es noch nicht. Dies ist eventuell direkt nach der intravenösen Injektion möglich oder vor der Assoziation an den im Plasma zirkulierenden VWF bei VWF-reduzierten bzw. VWF-freien Produkten. Auch nach der proteolytischen Inaktivierung und vor der Endozytose der inaktivierten FVIII-Fragmente könnte die T-Zell-Antwort aktiviert werden. Die im Gerinnungssystem wichtigen Proteine wie Albumin, VWF, Phospholipide und FIXa beeinflussen die dreidimensionale Struktur, Stabilität und damit möglicherweise die Immunogenität. Diese beeinflussenden Faktoren können durch das Präparat, das Aufreinigungsverfahren und das Virusinaktivierungsverfahren prinzipiell verändert sein. Diese beiden Verfahren könnten die Struktur des Proteines verändern, so daß eine Inhibitorentwicklung bei „Niedrig-Risiko“-Erwachsenen mit schwerer Hämophilie hervorgerufen werden könnte (Rosendaal et al., 1993 + 1997, Peerlinck et al., 1993).

#### Die verwendeten Präparate

Die Immunogenität des FVIII kann sich durch bestimmte Aufreinigungs- oder Virusinaktivierungsverfahren verstärken. Beispiele dafür sind Spaltung durch proteolytische Enzyme und Dissoziation von VWF, was auf Chromatographie oder Ionenaustauscher zurückzuführen sein kann. Unterschiede in der Immunogenität des FVIII kann infolge verschiedener Herstellungsschritte und auch zwischen Chargen desselben Produktes auftreten (Yee und Lee, 2002).

Das Erhitzen des Moleküles kann zu neuen Antigen determinanten führen. Erhitzen könnte die dreidimensionale Struktur verändern oder Zuckerreste durch Bildung einer Schiffchen Base hinzugefügt werden.

Glykosylierung des Moleküles ist ein anderer Parameter in bezug auf die Immunogenität. Das Ausmaß der Glykosylierung bei rekombinanten Produkten, welches vom verwendeten Expressionssystem abhängig ist, unterscheidet sich.

Während *in vitro* Studien besagten, daß r- und pd-Produkte in ihrer Funktion und Struktur gleich seien, muss man dennoch beachten, daß r-Produkte nicht von menschlichen Zellen abstammen. Man ist sich darüber einig, daß kleine Veränderungen bei der posttranslationalen Modifikation und/oder Tertiärstruktur die Präparate stärker immunogen wirken lassen könnten als pd-Präparate (Yee, Lee 2002).

Ein Zusammenhang zwischen Präparat und erhöhtem Inhibitor-Risiko konnte nach einem unerwartet häufigen Auftreten von Inhibitoren in Belgien, Holland und Deutschland gezeigt werden (Rosendaal et al., 1993, Peerlinck et al., 1993). In den entsprechenden Chargen konnte eine Aktivierung eines 40 kDa-Fragmentes nachgewiesen werden, die erst nach einem zusätzlich eingeführten Virusinaktivierungsschritt die Immunogenität verstärkte (Josic et al., 1997). Die Inhibitoren, die gegen diese Präparate gebildet wurden, hatten nur C2-Epitopspezifität (Laub et al., 1997).

Die Charakteristika der Inhibitoren, die bei bei vorher schon behandelten Patienten als Antwort auf ein besonderes Präparat auftreten, unterscheiden sich sehr von den klassischen Inhibitoren der PUPs. Sie sind vom Typ 2, treten bei älteren Personen auf und meist erst nach über 100 Expositionstagen. Die meisten dieser Antikörper sind gegen die C2-Domäne der leichten Kette gerichtet (Peerlinck et al. 1997). Die Blutungen sind nicht von schwerer Form, sondern eher Gewebe/Hautblutungen.

Hinsichtlich der Reinheit der FVIII-Konzentrate existieren Studien von Präparaten mit und ohne VWF. Präparate mit VWF zeigten in diesen Studien eine niedrigere Inhibitorinzidenzrate (Peerlinck 1993, Schimpf et al., 1995, Yee et al., 1997) verglichen mit Studien, bei denen pd-Präparate keinen VWF enthielten oder gegenüber den r-FVIII-Studien. Die Erklärung hierfür sollte sein, daß intermediate reine Produkte VWF-Multimere enthalten, die Epitope der leichten Kette blockieren (Yee et al., 1997).

Viele der *in vitro* und *in vivo*-Studien postulieren, daß der VWF die Reaktivität der FVIII-Inhibitoren mit FVIII beeinflusst. Berntorp et al. (1996) zeigte, daß Konzentrate mit hohem VWF-Gehalt getestete Inhibitoren neutralisierten. Zudem erzielten sie höhere FVIII-recovery als hochgereinigte Konzentrate, die keinen oder nur wenig VWF enthielten. Einige kürzliche Studien konnten auch zeigen, daß an VWF gebundener FVIII weniger zugänglich für die Leichte-Kette-spezifische Antikörper ist

(Suzuki et al., 1996; Gensana et al., 2001; Kallas et al., 2001) und der VWF somit protektiv wirkt.

### **5.13 Immunologische Aspekte der Inhibitorbildung**

Eine Toleranz gegenüber FVIII schließt mehrere mögliche Mechanismen ein:

Zerstörung der Zellen, Suppression durch regulatorische Zellen oder durch anti-idiotypische Wechselwirkungen.

T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf Proteinantigene, und mehrere Beobachtungen zeigen, daß die Inhibitorbildung T-Zell-abhängig ist. Eine Analyse mit mononuklearen peripheren Blutzellen zeigte, daß FVIII-reaktive T-Zellen im Blut von HA-Patienten mit einem Inhibitor vorhanden waren (Singer et al., 1996).

Überraschenderweise wurde FVIII-abhängige Proliferation von T-Zellen auch bei Patienten ohne Inhibitor und auch bei gesunden Patienten gefunden. Die Immunantworten in diesen beiden Gruppen waren jedoch signifikant niedriger als bei der Inhibitor-positiven Gruppe (Fijnvandraat et al., 2003).

Die FVIII-Antikörperbildung ist ein T-Zell-abhängiger Prozeß, der T-Zell-B-Zell und T-Zell-Antigen-präsentierende Zellwechselwirkungen erfordert (Saenko et al., 2002).

Daher wird das Blockieren der T-Zell-Aktivierung (bzw. Blockieren der T-Zell-B-Zell-Wechselwirkung) als Potential einer Therapie für die Inhibitorpatienten angesehen.

Die T-Zell-Aktivierung benötigt zwei Signale:

Das erste ist eine Antigen-spezifische Wechselwirkung zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem Peptid-(Epitop)-MHC-Komplex auf Antigen-präsentierenden Zellen (s. Abb. 10 unten).

Das zweite Signal („Co-Stimulierung“ genannt) beinhaltet Zellen der B7-Familie, wie B7.1, B7.2, und LIST und ihre Liganden (CD 28/CTLA-4/Icos) sowie CD 40-CD 154-Moleküle der TNFR-Familie. Das Erkennen der B 7- und CD 40-Moleküle durch CD 28 und CD 154 z.B. führt zur T-Zell-Aktivierung für die Antikörperbildung.



Vieles der Erkenntnis über die T-Zellen stammt aus Studien mit Mäusen. Es konnte gezeigt werden, daß bei Hämophilie A-Mäusen eine Gabe von anti-CD 154 und FVIII die anti-Faktor VIII-Antikörperbildung verzögert (Rossi et al., 2001).

Der Mechanismus der anti-idiotypischen Antikörper sieht anders aus:

Idiotypen sind Antigen determinanten, die auf variablen Regionen der Antikörper oder auf Regionen des Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors vorhanden sind. Jeder Idiotyp besteht aus Determinanten (Idiotypen), die einzigartig auf dem Antikörpermolekül oder T-Zell-Rezeptor sind. Sie können immunogen wirken und eine Antikörperbildung bewirken, die anti-idiotypische Antikörper genannt werden (Jerne et al., 1974). Eine antigene Stimulation bewirkt eine Idiotypenbildung und anti-idiotypische Antikörper. Die Fähigkeit dieser Antikörper, an anti-FVIII-Antikörper zu binden u. die inhibitorische Aktivität von FVIII-Allo-Antikörpern neutralisieren zu können, wurde nachgewiesen (Gilles et al., 1994 + 1996).

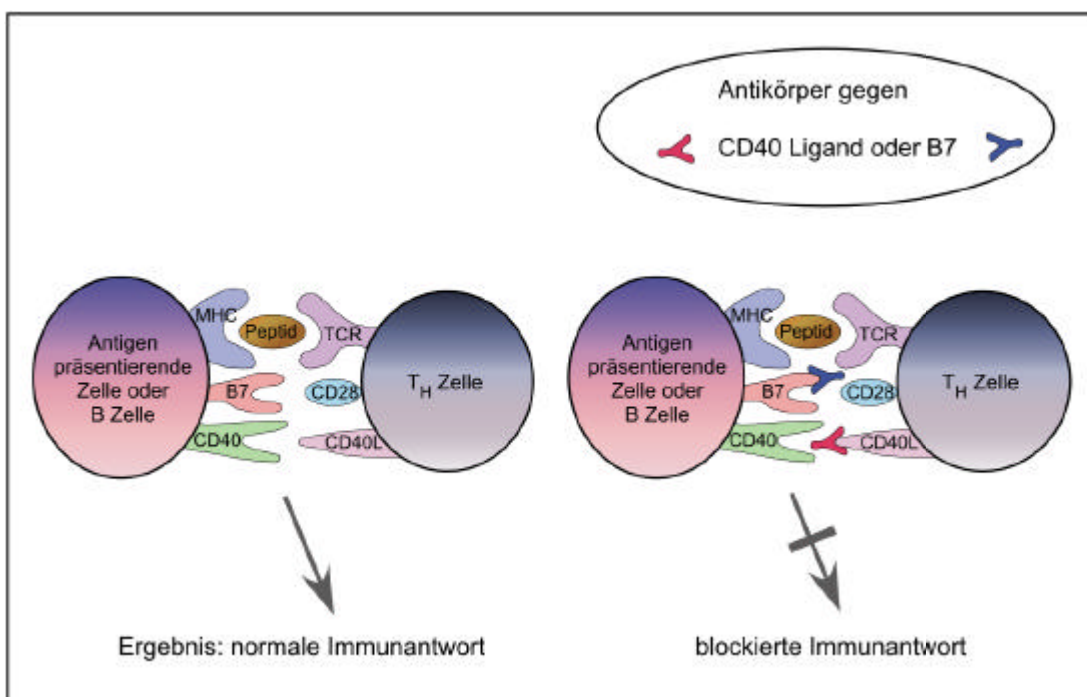


Abb.10 : Prinzip der „Co-Stimulierung“ und die Immunantwort (nach Saenko 2002)

#### **5.14 Ausblick für die Erforschung der Immunantwort gegen Faktor VIII**

Der Nachweis einer Inhibitorbildung bei ersten Gentherapiestudien verdeutlicht die Notwendigkeit, die variierende Immunantwort von Patienten bei der Therapie der Hämophilie A weiter zu erforschen.

Nachdem ein Einfluß des VWF auf die Immunreaktion nachweisbar war, erscheint auch die Untersuchung von anderen möglichen die Immunogenität beeinflussenden Faktoren, wie z.B. Glykosylierung und Sulfatierung des FVIII und Stabilisierung mit Albumin möglich. Auch ein Vergleich der Immunogenität von mit neuen Verfahren hergestellten oder neu konstruierten rFVIII-Produkten erscheint sinnvoll, um eine Vorhersage für das Auftreten von Inhibitoren treffen zu können.

Weitere Studien mit Mäusen und anderen Tieren könnten möglicherweise herausfinden, ob es möglich ist, die Immunogenität des FVIII zu reduzieren, jedoch seine biologische Aktivität zu erhalten.

Erfolgreiche Immuntoleranz kann bei vielen Patienten mit der Immuntoleranztherapie erreicht werden. Eine detaillierte Kenntnis der Mechanismen, die die FVIII-Inhibitoren infolge ITT eliminieren, könnte zu wichtigen Hinweisen führen, um effiziente Behandlungsmöglichkeiten der ITT zu etablieren.

Vielleicht können in naher Zukunft die wirksamen Anti-idiotypischen Antikörper von Kulturen klonierter humaner Zellen isoliert werden, wie es momentan der Fall für die Produktion von humanen monoklonalen Anti-Faktor VIII-Antikörpern ist (Jacquemin et al., 1998).

## 6 Zusammenfassung

Die Hämophilie A und B, die häufigsten plasmatischen Gerinnungsstörungen, beruhen auf dem Defekt des Gerinnungsfaktors VIII bzw. IX. Eine Ausbildung von FVIII- bzw. FIX neutralisierenden Antikörpern (Inhibitoren) ist heute die bedeutendste und schwerwiegendste Nebenwirkung bei der Behandlung der Patienten mit FVIII/FIX-Präparaten. Ungefähr 25-30% der schwer erkrankten Hämophilie A-Patienten (FVIII-Aktivität < 1%) entwickeln Inhibitoren. Bei der Hämophilie B sind nur ca. 1-3% der Patienten von Inhibitoren betroffen.

Ziel der Arbeit war es, die Einflußfaktoren der Inhibitorentwicklung zu ermitteln und mit anderen Studien zu vergleichen.

Die für die Substitutionstherapie eingesetzten FVIII-Präparate werden entweder aus Spenderplasma gewonnen oder gentechnisch (rekombinant) hergestellt und durch verschiedene Verfahren virusinaktiviert.

Eine Charakterisierung der Präparate zeigte leichte, aber unerhebliche Unterschiede zwischen einzelnen Chargen desselben Präparates.

Unter Verwendung der FVIII-/FIX-Präparate wurde die Inhibitorwirkung qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Es wurde der Verlauf von Inhibitoren zum Schweregrad der Hämophilie, zur Art der verabreichten Präparate, zu der substituierten Menge- auch bezogen auf das Körpergewicht- und zur Substitutionsfrequenz korreliert.

Es konnte gezeigt werden, daß der Mutationstyp, die Dosierung und das Alter der Erstbehandlung die Inhibitorbildung beeinflussen können.

Die Intron 22-Inversion verursacht in den meisten Fällen eine schwere Hämophilie A, und dabei werden auch am häufigsten Inhibitoren gebildet. Bei der Hämophilie B verursachen ausschließlich die große Deletion und Nonsensemutationen die Inhibitorentwicklung.

Bei einem Vergleich der Inhibitorinzidenzen von r- und pdFVIII-Präparaten konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden, wie auch andere Studien zeigten.

Eine Ausnahme stellt eine erst kürzlich vorgetragene retrospektive Studie aus Frankreich dar (Rothschild 2003).

Durch Epitopemapping mit rekombinanten FVIII-Fragmenten konnten bestimmte Domänen des Proteines als „target“ der neutralisierenden und nicht-neutralisierenden

Antikörper identifiziert werden. Auf der schweren Kette des FVIII-Proteines waren die Antikörper gegen die A2- und die A1a1-Domänen gerichtet. Auf der leichten Kette waren die Antikörper gegen die C2-, a3A3- und C1-Domänen gerichtet.

Zudem konnte gezeigt werden, dass inhibitorische und nicht-inhibitorische Antikörper vorwiegend gegen die schwere Kette (HC) des FVIII-Proteines gerichtet waren. 77 % der untersuchten Patienten zeigten eine Intron 22-Inversion. Dies verdeutlicht, daß diese Mutation einen hohen Risikofaktor hinsichtlich Inhibitor- und Antikörperbildung darstellt.

## Summary

Haemophilia A and B is the most common plasmatic coagulation disorder caused by heterologous mutations spanning the entire FVIII and FIX-gene. The disease is characterized by the absence of, decrease in, or deficient function of plasma coagulation FVIII or FIX. The most important and serious side effect in the treatment of haemophilia patients is the formation of FVIII or FIX neutralizing antibodies (inhibitors). Nearly 25-30% of the patients with severe haemophilia A develop inhibitors. Haemophilia B patients are affected to a lesser extent.

Aim of this thesis was to study the factors influencing the development of inhibitors and to compare these results with published studies of other groups in the field.

Factor VIII-products used for the substitution therapy in the treatment of haemophilia patients are either manufactured from plasma of human blood donors or by recombinant technology and virus inactivated by different procedures.

The characterization of the FVIII-products showed slight, but insignificant differences between lots of the same product. By using the FVIII/FIX-products the development of inhibitors was shown qualitatively as well as quantitatively. The development and course of the inhibitors was correlated to the type and severity of haemophilia, to the type of products substituted, the amount of product given per kg body weight as well as frequency of substitution.

It was demonstrated that the mutation type, the dosage and the age at first treatment may have an influence on the inhibitor development. We confirmed once more the intron 22-inversion as the most common mutation type causing severe haemophilia A and as a high risk mutation for inhibitor formation.

In haemophilia B the large deletion and the nonsense mutation are exclusively associated with the development of inhibitors.

The comparison of haemophilia A patients treated with r- and pdFVIII-products showed no significant differences in inhibitor incidence rates. This observation can be confirmed by comparing data of prospective PUP-studies where patients have been treated with rFVIII- or pdFVIII-products. An exception is a recently presented retrospective study from France (Rothschild 2003).

By epitope mapping using recombinant FVIII-fragments specific domains of the FVIII-protein could be identified as "targets" of inhibitory and non-inhibitory antibodies. Those antibodies were directed against the A2- and the A1a1-domain of the heavy chain of the FVIII-molecule. Antibodies directed against the C2-, a3A3- and C1-domains were found on the light chain of factor VIII.

In summary, inhibitory and non-inhibitory antibodies were directed predominantly against the heavy chain of factor VIII, as we demonstrated. 77 % of the investigated patients had an intron 22-inversion. This demonstrates that this mutation type is a high risk factor in the development of inhibitory and non-inhibitory antibodies.

## 7 Literatur

Addiego JE, Kasper CK et al.: *Frequency of inhibitor development in haemophiliacs treated with low-purity factor VIII*. Lancet. 1993; 342: 462-464.

Addiego K, Kasper CK, Abildgaard C.: *Increased frequency of inhibitors in African American haemophilia A patients*. Nashville:Ash; Blood. 1994: 239

Addiego JE, Gomperts E, Liu S et al.: *Treatment of hemophilia A with a highly purified factor VIII concentrate prepared by anti-factor VIII C-immunoaffinity chromatography*. Thromb Haemost. 1992; 67: 19-27.

Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H.: *A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor VIII-deficient haemophiliacs*. J Int Med .1994; 236: 319-99.

Algiman M et al.: *Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals*. Proc Natl Acad Sci USA. 1992, 89 (9): 3795-9.

Aly AM, Aledort LM, Lee TD et al.: *Histocompatibility antigen patterns in haemophilic patients with factor VIII antibodies*. Br J Haematol. 1990; 76 (2): 238-41.

Andersson L, Brown JE: *Interaction of FVIII-VWF with phospholipid vesicles*. Biochem J. 1981; 100: 161-167

Antonarakis SE, Kazazian HH, Tuddenham EGD: *Molecular etiology of factor VIII deficiency in haemophilia A*. Hum Mut. 1995; 5: 1-22.

Antonarakis SE: *Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and haemophilia A*. Haemophilia .1998; 4 (Suppl.2): 1-11.

Arai M et al.: *Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies - antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipids*. J Clin Invest. 1989; 83: 1978-1983.

Astermark Jan: *Treatment of the bleeding inhibitor patient*. Seminars in Thrombosis and Haemostasis. 2003, Vol.29, No.1.:77-86.

Bagnall RD, Waseem N, Green PM. *Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A*. Blood .2002; 99: 168-174.

Becker J, Schwaab R, Möller-Taube A. et al.: *Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies*. Am J Hum Genet .1996; 58: 657-670.

Berntorp E, Ekman M, Gunnarsson M et al.: *Variation in factor VIII inhibitor reactivity with different commercial factor VIII preparations*. Haemophilia .1996; 2: 95-99.

Van den Berg HM, Fischer K, Van der Bom JG: *Comparing outcomes of different treatment regimes for severe haemophilia*. Haemophilia. 2003; 9: 27-31.

Van der Bom JG, Mauser-Bunschoten EP et al.: *Age at first treatment and immune tolerance to factor VIII in severe hemophilia*. Thromb Haemost. 2003; 89: 475-497.

de Biasi R, Rocino A, Papa ML: *Incidence of factor VIII inhibitor development in haemophilia A patients treated with less pure plasma derived concentrates*. Thromb Haemost .1994; 71: 544-47.

Biggs R, Bidwell E: *A method for the study of antihemophilic globulin inhibitors with reference to six cases*. Br J Haematol. 1959; 5: 379.

Brackmann HH, Oldenburg J, Schwaab R: *Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitors- twenty years Bonn protocol*. Vox Sang. 1996; 70 (Suppl.1): 30-35.



Bray GL, Gomperts ED, Courter S et al.: *A multicenter study of recombinant factor VIII (Recombinate): safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A*. Blood. 1994; 83 (9): 2428-35.

Briet E: *Factor IX inhibitors in haemophilia B patients: their incidence and prospects for development with high purity factor IX products*. Blood Coag Fibrin. 1991; 2: 47-50.

Briet E, Peters M: *The incidence of inhibitors in hemophilia A and the induction of immune tolerance*. Adv Exp Med Biol. 2001; 489: 89-97.

Budde U: Persönliche Mitteilung, 1991

Chance P, Dyer KA et al.: *Regional localization of the human factor IX gene by molecular hybridization*. Hum Genet. 1983; 65 (2); 207-208.

Courter SG, Bedrosian CL: *Clinical evaluation of B-domain deleted recombinant factor VIII in previously untreated patients*. Semin Hematol 2001; 38; Suppl.4: 52-59.

Di Scipio RG, Hermodson MA: *A comparison of human prothrombin, factor IX, factor X and protein S*. Biochemistry .1977; 16: 1528-1538.

Dimichele D: *Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas*. Haemophilia. 2002; 8: 280-287.

Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I et al.: *Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs*. Lancet. 1992; 339: 594-98.

Fay PJ, Koshibu K, Mastro M: *The A1 and A2 subunits of factor VIIIa synergistically stimulate factor IXa catalytic activity*. J Biol Chem. 1999; 274 (22); 15401-6.

Fijnvandraat K, Turenhout EA, van den Brink EN et al.: *The missense mutation Arg 593 – Cys is related to antibody formation in a patient with mild hemophilia A*. Blood. 1997; 89: 4371-77.

- Fijnvandraat K et al.: *Immunobiology of inhibitor development in hemophilia A*. Seminars in Thrombosis and Haemostasis. 2003, Vol 29, Nr.1: 61-68.
- Fisher K, Van der Bom J, Ljung R et al.: *Prophylactic treatment for severe haemophilia: comparison of an intermediate-dose to a high-dose regimen*. Hemophilia 2002; 8: 753-760.
- Foster PA, Fulcher CA et al.: *Localization of the binding regions of a murine monoclonal anti-factor VIII antibody and a human anti-factor VIII alloantibody, both of which inhibit factor VIII procoagulant activity, amino acid residues threonine 351-serine 365 of the factor VIII heavy chain*. J Clin Invest .1988; 82: 123-128.
- Foster PA, Fulcher CA, Houghton RA et al.: *An immunogenic region within residues Val 670-Glu 1684 of factor VIII light chain induces antibodies which inhibit binding of factor VIII to von Willebrand Factor*. J Biol Chem. 1988; 263: 5230-34.
- Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Roberts JR et al.: *Localization of human factor VIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments*. Proc Natl Acad Sci. 1985; 82 (22): 7728-32.
- Fulcher CA, de Graff S, Mahoney S , Zimmermann TS. *FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting*. Blood. 1987; 69: 1475-1480.
- Gensana M, Altisent C, Aznar JA: *Influence of von Willebrand factor on the reactivity of human factor VIII inhibitors with factor VIII*. Haemophilia 2001; 7: 369-74.
- Giannelli F, Green PM, High KA et al.: *Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions*. Nucleic Acids Res 1990; 18: 4053-4059.
- Giannelli R, Green P.M., High KA et al.: *Hemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions—second edition*. Nucleic Acids Res. 1991; 19 (Suppl.), 2193-2219.

Giannelli R., High A. et al.: *Haemophilia B: database of point and short additions and deletions—third edition*. 1992; Nucleic Acids Res.20: 2027-2063.

Giannelli F, Green PM; High K et al.: *Haemophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions-fourth edition*. Nucleic Acids Research 22: 3534-3546.

Giannelli F, Green PM, Sommer SS et al.: *Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions- eight edition*. Nucleic Acids Res 1998; 26: 265-268.

Gill JC: *The role of genetics in inhibitor formation*. Thrombosis and Haemostasis 1999; 82 (2): 500-504.

Gilles JGG, Arnout J, Vermynen J et al.: *Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction*. Blood 1993; 82: 2452-2461.

Gilles JG, Saint-Remy JM.: *Healthy subjects produce both anti-factor VIII and specific anti-idiotypic antibodies*. J Clin Invest 1994; 94: 1496-1505.

Gilles JG, Desqueper B, Lenk H et al.: *Neutralizing antiidiotypic antibodies to factor VIII inhibitors after desensitization in patients with hemophilia A*. J Clin Invest 1996; 97: 1382-1388.

Gilles JG, Lavend'homme R et al.; Blackwell Science 1998; Vol.4: 234.

Gilles JGG, Lavend'homme R, Peerlinck K et al.: *Some factor VIII inhibitors recognise a FVIII epitope that is present only on FVIII-VWF complexes*. Thromb Haemost 1999; 82: 40-45.

Gitschier J, Wood WI et al.: *Characterization of the human factor VIII gene*. Nature 1984; 312: 326-330.

Goodeve AC; Williams J, Bray G et al. *Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with Recombinate*. *Thromb Haemost* 2000; 83 (6): 844-48.

Green PM, Bentley DR; Mibashan RS.: *Molecular pathology of hemophilia B* *Embo J* 1989; 80: 67-72.

Green PM, Montadon AJ, Bentley DR et al.: *The incidence and distribution of CpG-TpG transitions in the coagulation factor IX gene*. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 3227-31.

Green PM, Montandon AJ, Bentley DR: *Genetics and molecular biology of haemophilia A and B*. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991; 2: 539-65.

Großmann R, Geise U, Schwender S et al. *Diagnostics and therapy monitoring in patients with acquired coagulation factor inhibitors*. *J Lab Med* 1999; 23: 70-78.

Gruppo R, Chen H, Schroth P, Bray GL: *Safety and immunogenicity of recombinant factor VIII (Recombine) in previously untreated patients (PUPs). A 7,3 year update*. Abstract No. 291, XXIII Congress of the WFH, The Hague; *Haemophilia* 1998; 4: 228.

Guerois C, Laurian Y, Rothschild C.: *Incidence of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A patients treated with only one brand of highly purified plasma-derived concentrate*. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 73: 215-218.

Hay CR, Ollier W, Pepper L et al.: *HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A*. *Thromb Haemost* 1997; 77 (2); 234-37.

Hay CRM, Ludlam CA, Colvin BT: *Factor VIII inhibitors in mild and moderate severity hemophilia A*. *Thromb Haemost* 1998; 79 (4): 558-563.

Hay CRM: *Why do inhibitors arise in patients with haemophilia A?*. *Br J Haematol* 1999; 105: 584-590.

High KA: *Inhibitors to Coagulation Factors*: Plenum Press, New York 1995; 79-86.

High KA: *Factor IX: molecular structure, epitopes and mutations associated with inhibitor formation*. *Adv Exp Med Biol* 1995; 386: 79-86.

Hoyer LW. *The factor VIII complex: structure and function*. *Blood* 1981; 58: 1-13.

Hoyer LW: *Molecular pathology and immunology of factor VIII (hemophilia A and factor VIII inhibitors)*. *Hum Pathol* 1987;18: 153-61.

Hoyer LW. *Hemophilia*. *N Engl J Med* 1994; 330: 38-47.

Hoyer LW: *Inhibitors to Coagulation Factors*. New York: Plenum Press 1995; 35-45.

Hoyer LW: *The incidence of factor VIII inhibitors in patients with severe hemophilia A*. *Adv Exp Med Biol* 1995; 386: 35-45.

Hoyer LW: *Why do so many hemophilia A patients develop an inhibitor?* *Brit J Haematol* 1995; 90: 498-501.

Jacquemin MG, Desqueper BG, Benhida A.: *Mechanisms and kinetics of factor VIII inactivation: Study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a haemophilia A patient with an inhibitor*. *Blood* 1998; 92: 496-506.

Jacquemin MG, Lavendhomme R, Benhida A et al : *A novel cause of mild/moderate hemophilia A mutations scattered in the factor VIII –domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor*. *Blood* 2000; 96: 958-965.

Jerne NK. *Towards a network theory of the immune system*. *Ann Immunol (Paris)* 1974; 125 C: 373-389.

Josic D, Stadler M, Buchacher A: *Degradation products of factor VIII which can lead to increased immunogenicity*. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 78; (Suppl.): 576.

Kallas A, Talpsep T. *Von Willebrand factor in factor VIII concentrates protects against neutralization by factor VIII antibodies*. Haemophilia 2001; 7: 375-380.

Kane WH, Davie EW: *Cloning of a cDNA coding for human factor V, as a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin*. Proc Natl Acad Sci 1986; 83: 6800-6804.

Kasper CK.: *Plasma-derived versus recombinant factor VIII for the treatment of hemophilia A*. Vox Sang 1996; 70 (Suppl.3): 17-20.

Kasper CK, Aledort LM, Aronson D: *A more uniform measurement of factor VIII inhibitors*. Thrombos Diathes Haemorrh 1975; 34: 869-872.

Kaufman RJ, Wasley LC et al: *Synthesis, processing and secreting of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells*. J Biol Chem 1988; 263: 6352-6362.

Kaufman RJ: *Advances toward gene therapy for hemophilia at the millenium*. Hum Gene Ther 1999; 10 (13): 2091-107.

Kaufmann R, Pipe S: *Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor*. Thrombosis and Haemostasis 1999; 82 (2): 201-208.

Kazazian HH jr.: *The molecular basis of hemophilia A and the present status of carrier and antenatal diagnosis of the disease*. Thromb Haemost 1993; 70: 60-62.

Kemball-Cook G, Tuddenham EGD, Wacey AI: *The factor VIII structure and mutation resource site: Harmsters version 4*; Nucleic Acids Res. 1998; 26: 216-19.

Kessler CM: *An introduction to factor VIII inhibitors: the detection and quantitation*. Am J Med 1991; 91 (5A); 1S-5S.

Kesteven PJ, Holland LJ, Lawrie AS: *Inhibitors to factor VIII in mild haemophilia*. Thromb Haemost 1984; 52 (1): 50-52.

Ketterling RP, Vielhaber E, Sommer SS: *The rates of G-C, T-A, and G-C transversions at CpG dinucleotides in the human factor IX gene.* Am J Hum Genet 1994; 54: 831-35.

Klinge J, Auerswald G, Budde u et al.: *Detection of all anti-factor VIII-antibodies in haemophilia A patients by the Bethesda-assay and a more sensitive immunoprecipitation assay.* Haemophilia 2001; 7: 26-32.

Koeberl DD et al.: *Functionally important regions of the factor IX gene have a low rate of polymorphism and a high rate of mutation in the dinucleotide CpG.* Am J Hum Genet 1989; 45: 448-57.

Koeberl DD et al.: *Mutations causing haemophilia B: direct estimate of the underlying rates of spontaneous germ-line transitions, transversions and deletions in a human gene.* Am J Human Genet 1990; 47: 202-217.

Koedam JA, Hamer RJ, Besser-Visser NH et al.: *The effect of VWF on activation of FVIII by factor Xa.* Europe J Biochem. 1990; 1898: 229-234

Koschinsky ML, Funk WD et al.: *Complete c-DNA sequence of human preceruloplasmin.* Proc Natl Acad Sci 1986; 83: 5086-5090.

Kreuz W, Becker S, Lenz E et al.: *Factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A: epidemiology of inhibitor development and induction of immune tolerance for factor VIII.* Semin Thromb Haemost 1995; 21: 382-89.

Kreuz W, Escuriola C et al.: *Epidemiology of inhibitors in haemophilia A.* Vox Sang 1996; 70 (Suppl 1): 2-8.

Kreuz W, Escuriola C et al.: *Inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: a prospective long-term follow-up comparing plasma-derived and recombinant products.* Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2002; Vol.28, Nr.3: 285-290.

Kurachi K, Furukawa M, Yan SH et al.: *Biology of factor IX*. Hematol. Oncol. Clin. 1992; North Am. Vol. 6 (5): 991-997.

Lacroix-Desmazes S, Moreau A, et al.: *Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A*. Nature Medicine 1999; 5: 1044-1047.

Lacroix-Desmazes S et al.: *Factor VIII inhibitor with catalytic activity towards factor V*. Haematologica 2000; 85 (10, Suppl.): 89-92.

Lacroix-Desmazes S, Bayry J, Misra N et al.: *The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII*. New Engl J Med 2002; 346: 662-7.

Lacroix-Desmazes S, Misra N, Bayry J et al.: *Autoantibodies to factor VIII*. Autoimmun 2002; Rev. 1 (1-2): 105-110.

Lacroix-Desmazes S, Misra N, Bayry J: *Antibodies with hydrolytic activity towards factor VIII in patients with hemophilia A*. J Immunol Methods 2002; 269 (1-2): 251.

Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE.: *Inversions disrupting the factor VIII gene as a common cause of severe hemophilia A*. Nature Genet 1993; 5: 236-41.

Laub R et al.: *Restricted epitope specificity of factor VIII inhibitors which appeared in previously treated haemophiliacs after infusion of Octavi SD plus*. Thrombosis and Haemostasis 1997; 78 (Suppl.): 590.

Lawrence JS, Johnson JB.: *The presence of a circulating anticoagulant in a male member of a haemophilic family*. Trans Am Clin Climatol Assoc 1941; 57: 223.

Lenting PJ et al.: *The sequence Glu 1811-Lys 1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX*. J Biol Chem 1996; 271: 1935-40.

Lillicrap D.: *The molecular basis of hemophilia B*. Hemophilia 1998; 4 (4): 350-57.



Lippert LE, Fisher LM, Schook LB: *Relationship of major histocompatibility complex class 2 genes to inhibitor antibody formation in hemophilia A*. *Thromb Haemost* 1990; 64 (4): 564-568.

Ljung RCR.: *Gene mutations and inhibitor formation in patients with haemophilia B*. *Acta Haematol* 1995; 94: 49-52.

Ljung R, Petrini P, Lingren A et al.: *Factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs*. *Lancet* 1992; 339: 1550 (letter).

Lorenzo JJ, Lopez A, Altisent C et al.: *Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age*. *Br J Haematol* 2001; 113: 600-603.

Lottenburg R, Kentro T, Kitchens C: *Acquired hemophilia: A natural history study of 16 patients with factor VIII inhibitors receiving little or no therapy*. *Arch Intern Med* 1987; 147: 1077-1081.

Lubahn BC, Ware J, Stafford DW et al.: *Identification of a FVIII epitope recognized by a human hemophilic inhibitor*. *Blood* 1989; 73: 497-499.

Lusher JM et al.: *Lack of inhibitor to monoclonal antibody purified factor VIII concentrate*. *Lancet* 1990; 17: 1249-50.

Lusher JM, Salzmann PM: *Viral safety and inhibitor development associated with factor VIII C ultra-purified from plasma in hemophiliacs previously unexposed to factor VIII concentrates*. The Monoclate Study Group. *Semin. Haematol* 1990; 27 (2 Suppl.2): 1-7.

Lusher JM.: *Viral safety and inhibitor development associated with monoclonal antibody –purified FVIII C*. *Ann Haematol* 1991; 63: 138-141.

Lusher JM, Arkin S, Abilgaard CF et al.: *Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia. Safety, efficacy and development of inhibitors*. *N Engl J Med* 1993; 328: 453-9.

Lusher J, Arkin S, Hurst D.: *Recombinant factor VIII (Kogenate) treatment of previously untreated patients (PUPs) with haemophilia A. Update of safety, efficacy and inhibitor development after seven study years.* Abstract No. 664, ISTH Florence. Thromb Haemost 1997 (Suppl.) 162.

Lusher JM.: *Gene therapy for hemophilia A and B: patient selection and follow-up, requirements for a cure.* Thromb Haemost 1999; 82: 572-75.

Mayr WR, Lechner K et al: *HLA-DR and factor VIII antibodies in hemophilia A.* Thromb Haemost 1984; 51 (2): 293.

Mc Millan CW et al.: *The natural history of factor VIII C inhibitors in patients with hemophilia A: a national cooperative study.* Blood 1988; 71: 344-48.

Morfini M, Mannuci P, Tenconi PM: *Pharmacokinetics of monoclonally purified and recombinant factor VIII in patients with severe von Willebrand disease.* Thromb Haemost 1993; 70: 270-72.

Moreau A, Lacroix S, Stieltjes N et al.: *Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG.* Blood 2000; 95: 3435-41.

Morgan GE et al.: *The high frequency of the -6 G A factor IX promoter mutation is the result both of a founder effect and recurrent mutation at a CpG dinucleotide.* Br J Haematol 1995; 89: 672-74.

Mukherjee S et al.: *Analysis of hemophilia B database and strategies for identification of common point mutations in the factor IX gene.* Hemophilia 2003; 9: 187-192.

Muntean W, Male CH, Streif W et al.: *Low inhibitor incidence in children treated with pasteurised human factor VIII.* Thromb Haemost Suppl. 1997; PS 2640: 647.

- Oldenburg J, Picard J, Schwaab R et al.: *HLA-genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22-inversion with and without inhibitors to factor VIII*. *Thromb Haemost*. 1997; 77: 238-242.
- Oldenburg J, Schröder J, Schmitt C et al.: *Small deletion/insertion mutations within poly A-runs of the factor VIII gene mitigate the severe hemophilia A phenotype*. *Thromb Haemost* 1998; 79: 452-453.
- Oldenburg J, Schwaab R, Brackmann HH: *Induction of immune tolerance in haemophilia A inhibitor patients by the 'Bonn Protocol': predictive parameter for therapy duration and outcome*. *Vox Sang* 1999; 77 (Suppl.1): 49-54.
- Oldenburg J, Brackmann HH, Schwaab R: *Risk factors for inhibitor development in hemophilia A*. *Haematologica* 2000; 85 (Suppl. 10): 7-13.
- Oldenburg J, Schwaab R et al.: *Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes*. *Hemophilia* 2002; 8 (Suppl.2): 23-29.
- Oldenburg J, Schröder J, Ivasekevicius V et al.: *Large scale mutation profiling on haemophilia A- a joint cooperation within the frame of the german human genome project*. In: *Gene diagnosis of inherited bleeding disorders*; 53-76; 2002
- Pang CP; Crossley M, Kent G et al.: *Comparative sequence analysis of mammalian factor IX promoters*. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6731-6732.
- Park F, Ohashi K, Kay MA: *Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver*. *Blood* 2000; 96: 1173-1176.
- Peerlinck K, Arnout J, Gilles JG et al.: *A higher than expected incidence of factor VIII inhibitors in multitransfused haemophilia A patients with a double virus inactivated plasma derived concentrate*. *Thromb Haemost* 1993; 69: 115-118.

Peerlinck K, Rosendaal FR, Vermeylen J: *Incidence of inhibitor development in a group of young hemophilia A patients treated exclusively with lyophilized cryoprecipitate*. Blood 1993; 81: 3332-5.

Peerlinck K et al.: *Factor VIII inhibitors in previously treated haemophilia A patients with a double virus inactivated plasma derived concentrate*. Thrombosis and Haemostasis 1997; 77: 80-86.

Peerlinck K, Jacquemin MG, Arnout J et al.: *Antifactor VIII antibody inhibiting allogeneic but not autologous factor VIII in patients with mild hemophilia A*. Blood 1999; 93: 2267-73.

Penner JA: *Management of haemophilia in patients with high-titre inhibitors: focus on the evolution of activated prothrombin complex concentrate AUTOPLEX T*. Haemophilia 1999; 5 (Suppl 3) : 1-9.

Penner JA: *Haemophilic patients with inhibitors to factor VIII or IX: variables affecting treatment response*: Haemophilia 2001; 7: 103-108.

Pipe SW, Morris JA, Shah J et al.: *Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin*. J Biol Chem 1998; 273: 8537-44.

Pittman DD, Tomkinson KN, Kaufman RJ: *Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells*. J Biol Chem 1994; 269: 17329-37.

Poole S, Firtel RA, Lamar E et al.: *Sequence and expression of the discoidin I gene family in Dictyostelium discoideum*. J Mol Biol 1981; 153: 273-289.

Poon MC, Low S, Sinclair GD: *Factor VIII gene rearrangement analysis and carrier determination in hemophilia A*. J Lab Clin Med 1995; 125: 402-406.

Pratt KP et al.: *Structure of the C –domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution.*

Nature 1999; 402: 439–42.

Prescott R, Nakai H, Saenko EL: *The inhibitor antibody response is more complex in hemophilia A patients than in most nonhemophiliacs with factor VIII auto-antibodies.*

Blood 1997; 98: 3663-71.

Rizza CR, Spooner RJD: *Treatment of haemophilia and related disorders in Britain and Northern Ireland during 1976-80: report on behalf of the directors of haemophilia centres in the United Kingdom.* Br Med J 1983; 286: 929-33.

Rosendaal F et al.: *A sudden increase in factor VIII inhibitor development in multitransfused haemophilia A patients in the Netherlands.* Blood 1993; 81: 2180-2186.

Rosendaal FR: *Factor VIII inhibitors on a SD-treated and pasteurised concentrate associated with specific batches and batch characteristics.* Thrombosis and Haemostasis 1997; 78: 590.

Rossi G, Sarkar J, Scandella D.: *Longterm induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A.* Blood 2001; 97: 2750-57.

Rothschild C, Laurian Y, Satre EP et al.: *French previously untreated patients with severe hemophilia after exposure to recombinant factor VIII: incidence of inhibitor and evaluation of immune tolerance.* Thromb Haemost 1998; 80: 779-783.

Rothschild C, Gill J et al.: *Transient inhibitors in the Recombinate PUP study.* Thromb Haemost 2000; 84 (1): 145-6.

Rothschild C, Goudemand J, Demiguel V et al: *Effect of type of treatment (recombinant vs plasmatic) on FVIII inhibitor incidence according to known risk cofactors in previously untreated severe hemophilia A patients (PUPs).* Supplement to the journal of Thrombosis and Haemostasis; Juli 2003

Saenko EL, Shima M et al.: *A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor.* J Biol Chem 1994; 269 (15): 11601-11605.

Saenko EL, Scandella D: *A mechanism for inhibition of factor VIII binding to phospholipid by von Willebrand factor.* J Biol Chem 1995; 270: 13826-13833.

Saenko EL, Shima M, Gilbert G et al.: *Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition.* J Biol Chem 1996; 271: 27424-31.

Saenko EL, Scandella D et al.: *The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von Willebrand factor.* J Biol Chem 1997; 272 (29): 18007-18014.

Saenko EL, Scandella D, Yakhyaev AV et al: *Activation of factor VIII by thrombin increases its affinity for binding to synthetic phospholipid membranes and activated platelets.* J Biol Chem 1998; 273: 27918-26.

Saenko EL et al.: *Hemophilia A: effects of inhibitory antibodies on factor VIII functional interactions and approaches to prevent their action.* Hemophilia 2002; 8: 1-11.

Santagostino E, Gringeri A et al.: *Molecular characterization of inhibitors and response to factor VIII and desmopressin.* Thromb Haemost 1995; 74 (2): 619-621.

Scandella D, Mattingly M, de Graff S, Fulcher CA. : *Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization.* Blood 1990; 74: 1618-1626.

Scandella D.: *Human anti-factor VIII antibodies: Epitope localization and inhibitory function.* Vox Sang 1996; 70 (suppl. 1): 9-14.

Scandella D: *Epitope specificity and inactivation mechanisms of factor VIII inhibitor antibodies.* Vox Sang 1999; 77 (suppl 1): 17-20.

Scandella D; In: Shapiro A: *Inhibitors in Hemophilia: Current perspectives and directions*. 2001: 17-29.

Scandella D et al.: *In hemophilia A and autoantibody inhibitor patients: the factor A2 domain and light chain are most immunogenic*. *Thrombosis Res* 2001; 101 (5): 377-85.

Scharrer I , Neutzling O: *Incidence of inhibitors in hemophilia A patients- a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates*. *Haemophilia* 1999; 5: 145-154.

Schimpf K, Schwarz HP, Kunschak M: *Zero incidence of inhibitors in previously untreated patients who received intermediate purity factor VIII concentrate or factor IX complex*. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 73: 553-554.

Schwaab R, Brackmann H, Meyer C et al.: *Haemophilia A: Mutation type determines risk of inhibitor formation*. *Thromb Haemost*. 1995; 74: 1402-1406.

Schwartz RS, Abildgaard CF, Aledort LM et al.: *Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A* *N Engl J Med* 1990; 323: 1800-5.

Schwarz HP: *Hemmkörperentwicklung bei Verabreichung von Gerinnungsfaktorpräparaten*. *Ellipse* 1996; 12: 44-48.

Shima M, Fulcher CA et al.: *Localization of the binding site for a factor VIII activity neutralizing antibody to amino acid residues Asp1663-Ser1669*. *J Biol Chem* 1988; 263: 10198-203.

Singer ST, Adieggo J et al.: *T-lymphocyte proliferative responses induced by recombinant factor VIII in hemophilia A patients with inhibitors*. *Thromb Haemost*. 1996; 76: 17-22.

- Smith PS, Teutsch SM, Shaffer PA, et al.: *Episodic versus prophylactic infusions for hemophilia A: a cost-effectiveness analysis*. J Pediatr 1996; 129: 424-31.
- Sommer SS, Ketterling RP: *The factor IX gene as a model for analysis of human germline mutations: an update*. Hum Mol Genet 1996; 5: 1505-14.
- Spiegel PC et al.: *Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4 kappa fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII*. Blood 2001; 98: 13-19.
- Stubbs JD, Lekutis C et al.: *C-DNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences*. Proc Natl Acad Sci 1990; 87: 8417-8421.
- Sultan Y: *Prevalence of inhibitors in a population of 3435 hemophilia patients in France*. Thromb Haemost 1992; 67: 600-2.
- Suzuki T, Arai M, Amano K et al.: *Factor VIII inhibitor antibodies with C2-domain specificity are less inhibitory to factor VIII complex with von Willebrand factor*. Thromb Haemost 1996; 76: 749-54.
- Swaroop M, Moussalli M et al.: *Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII*. J Biol Chem 1997; 272: 24121.
- Thompson AR, Bajaj SP et al.: *Founder effect in different families with hemophilia B mutation*. Lancet 1990; 335: 418.
- Thompson AR: *Molecular biology of the hemophilias*. Prog. Hemost. Thromb. 1991; 10: 175-214.
- Thompson AR et al.: *Loss of tolerance to exogenous and endogenous factor VIII in a mild haemophilia A patient with an Arg<sup>593</sup> to Cys mutation*. Blood 1997; 90: 1902-10.



Thorland EC, Drost JB, Lusher JM et al.: *Anaphylactic response to factor IX replacement therapy in haemophilia B patients: complete gene deletions confer the highest risk*. Haemophilia 1999; 5: 101-105.

Tizzano EF, Altisent C et al.: *Intron 22- inversions and hemophilia*. Lancet 1994; 343: 792.

Toole JJ, Knopf JL et al.: *Molecular cloning of a c-DNA encoding human antihemophilic factor*. Nature 1984; 312: 342-347.

Tuddenham EGD, Schwaab R, Seehafer J et al.: *Database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene*. Second edition; Nucleic Acids Res 1994; 22: 3511-33.

Tuddenham EGD, Mc Vey ICH: *The genetic basis of inhibitor development in hemophilia A*. Hemophilia 1998; 4; 558-63:

Vehar GA, Keyt , Eaton D et al.: *Structure of human factor VIII*. Nature 1984; 312: 337-342.

Verbruggen B, Novakowa I, Wessels H et al.: *The Nijmegen modification of the Bethesda-assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability*. Thromb Haemost 1995; 73: 247-251.

Vermlyen J, Briet E.: *Factor VIII preparations: Need for prospective pharmacovigilance*. Lancet 1993; 342 (8873): 693-94.

Vermlyen J.: *How do some hemophiliacs develop inhibitors?* Hemophilia 1998; 4: 538-542.

Vianello F, Radossi P, Tison T et al.: *Prevalence of anti-factor VIII-antibodies in severe haemophilia A patients with inversion of intron 22*. Br J Haematol 1997; 97: 807-811.

Warrier I, Ewenstein BM, Koerper M et al.: *Factor IX inhibitors and anaphylaxis in hemophilia B*. Am J Pediatr Hematol Oncol 1997; 19: 23-27.

Warrier I: *Antibodies to factor IX*. Haematologica 2000, Vol. 85, suppl.10: 31-34.

White G.C. et al.: *Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia*. New Eng. J. Med. 1989; 320: 166-170.

White G, Rosendaal F, Aledort L et al.: *Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Thromb Haemost 2001; 85: 560.

Wion KL, Kelly D, Summerfield JA et al.: *Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues*. Nature 1985; 317: 726-729.

Wulff K, Bykowska K, Lopaciuk S, Herrmann FH: *Molecular analysis of hemophilia B in Poland: 12 novel mutations of the factor IX gene*. Acta Biochimica Polonica 1999; 46: 721-726.

Wulff K, Schröder W, Herrmann FH et al.: *Molecular analysis of haemophilia B: „Greifswald registry FIX deficiency“*. In: *Gene diagnosis of inherited bleeding disorders*; F.H. Herrmann (Ed.), 6 th Greifswald Haemophilia Congress 2001

Young M, Inaba H, Hoyer L W et al.: *Partial correction of a severe molecular defect in hemophilia A, because of errors during expression of the factor VIII gene*. Am J Hum Genet 1997; 60: 565-73.

Youssoufian H: *Immunoaffinity purification of antibodies against GST fusion proteins*. Biotechniques 1998; 24 (2): 198-200.

Yoshitake S, Schach BG, Foster C. et al: *Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (Antihemophilic factor B)*. Biochemistry 1985; 24: 3736-3750.

Yee TT , Lee CA ; in: *Inhibitors in patients with haemophilia*; edited by EC Merchan and CA Lee; 2002: chapter 3: 14-20.

Yee TT, Williams MD, Hill FGH et al.: *Absence of inhibitors in previously untreated patients with severe haemophilia A after exposure to a single intermediate purity factor VIII product*. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 78: 1027-1029.

Zelechowska MG, van Mourik JA, Brodniewicz-Proba T: *Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes*. *Nature* 1985; 317: 729-730.

Zhong D, Saenko EL, Shima M et al.: *Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX*. *Blood* 1998; 92, No.1: 36-142.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Ampere
AK	Antikörper
APC	Aktiviertes Protein C
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaar
BU	Bethesda-Unit
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca.	Circa
D.h.	Das heisst
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDs	Expositionstage
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al	Und andere
Evtl.	eventuell
FV	Gerinnungsfaktor V
FVa	Aktivierter Faktor V
FVII	Gerinnungsfaktor VII
FVIIa	Aktivierter Faktor VIIa
FVIII	Gerinnungsfaktor VIII
FVIIIa	Aktivierter Faktor VIII
FVIIIag	Gerinnungsfaktor VIII-Antigen
FVIIIc	Faktor VIII-Aktivität
FIX	Gerinnungsfaktor IX
FIXa	Aktivierter Faktor IX
FX	Gerinnungsfaktor X
FXa	Aktivierter Faktor X
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde

HA	Hämophilie A
HB	Hämophilie B
HC	Schwere Kette
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HR	High-Responder
Ig	Immunglobulin
IE	Internationale Einheiten
IP	Immunpräzipitationstest
ITT	Immuntoleranztherapie
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
$K_D$	Dissoziationskonstante
l	Liter
LCh	Leichte Kette
LR	Low Responder
M	Molar
mA	Milliampere
MBq	Megabequerel
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
nb	Nicht bekannt
nd	Nicht dargestellt
nmol	Nanomol
p	Wahrscheinlichkeit
P	Patienten
Page	Polyacrylamidelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
pdFVIII	„plasma-derived“ Gerinnungsfaktor

	VIII
PL	Phospholipid
R	Aminosäurereste
rFVIII	„recombinant“-Gerinnungsfaktor VIII
RA	Restaktivität
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“
S	Schwefel
SD	„solvent detergent“
SDS	Sodium dodecyl-sulfat
TBS	„Tris-buffered saline“
Usw.	Und so weiter
V	Volt
VWF	Von Willebrand Faktor