



**Development, manufacturing and preclinical study program for an Advanced
Therapy Medicinal Product for the treatment of severe hemophilia A**

**Entwicklung, Herstellung und präklinisches Studienprogramm für ein
Arzneimittel für neuartige Therapien zur Behandlung der schweren Form der
Hämophilie A**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Patrick Bittorf

aus

Bad Neustadt

Würzburg 2021

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Keram Pfeiffer

1. Betreuer: Prof. Dr. Heike Walles

2. Betreuer: PD Dr. Oliver Pullig

3. Betreuer: Dr. Ralf Sanzenbacher

4. Betreuer: Martin Zierau

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Entwicklung, Herstellung und präklinisches Studienprogramm für ein Arzneimittel für neuartige Therapien zur Behandlung der schweren Form der Hämophilie A“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagungen

Mein besonderer Dank richtet sich an Dr. Joris Braspenning, Dr. Thorsten Bergmann, PD Dr. Oliver Pullig und Prof. Dr. Heike Walles unter deren Betreuung es mir ermöglicht wurde am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin meine Promotion durchzuführen. Vielen Dank für euer Vertrauen und die Unterstützung, die ich in dieser Zeit von euch erhalten habe. Des Weiteren möchte ich mich bei Martin Zierau für die tolle Zusammenarbeit und die vielen neuen Erkenntnisse bedanken. Ein besonderer Dank gilt Dr. Ralf Sanzenbacher für die riesige Unterstützung und die zweimonatige Betreuung während meines Promotionspraktikums. Dieses betrachte ich heute als eine der wertvollsten Erfahrungen innerhalb meines bis jetzt noch kurzen Berufslebens.

Ein großer Dank geht an die Kollegen aus dem Department of Health Sciences der Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro" Dr. Cristina Olgasi, Dr. Simone Merlin und Prof. Antonia Follenzi für die konstruktive und tolle Zusammenarbeit.

Danke auch an Michaela Baier und Sarah Frosch für die Unterstützung bei den praktischen Tätigkeiten im Labor. Mein Dank richtet sich außerdem auch an alle Kollegen aus den anderen Forschungsgruppen des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Zuletzt gilt ein ganz besonderer Dank meiner Familie, meinem Zwillingenbruder, meinen Eltern, meinen Schwestern und der gesamten Familie Bittorf für die bedingungslose Unterstützung. Allen voran möchte ich hier meiner Frau Miriam Bittorf danken, du bist der wichtigste Mensch in meinem Leben!

Die Unterstützung durch weitere Stellen bzw. Projekte ist im Folgenden aufgezeigt:

This work was supported by HemAcure having received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 667421. The publication Bittorf P et al. Regulatory-Compliant Validation of a Highly Sensitive qPCR for Biodistribution Assessment of Hemophilia A Patient Cells. Mol Ther Methods Clin Dev. 2020;18:176-88. was supported by the Open Access Publication Fund of the University of Würzburg. Patrick Bittorf was supported by a grant from the German Excellence Initiative to the Graduate School of Life Sciences, University of Würzburg.

Danke

Summary/Zusammenfassung

The mandatory non-clinical study scheme prior to the first administration of a cell-based gene therapy medicinal product (GTMP) to human subjects includes and requires investigation of the biodistribution, comprising mobilization, persistence, and clearance, of the GTMP in a relevant animal model. Therefore, a qPCR-based method to determine the amount of human DNA in mouse DNA was developed and validated according to the guidelines of the European Medicines Agency and the International Council for Harmonisation. Furthermore, a preclinical worst-case scenario study was performed, in which this method was applied to investigate the biodistribution of 2×10^6 intravenously administered, genetically modified blood outgrowth endothelial cells from hemophilia A patients after 24 hours and seven days. The isolation, genetic modification and expansion of cells should be performed according to the guidelines on Good Manufacturing Practice. Here, the selection and application of appropriate and necessary raw materials is important. Likewise, the performance of a defined quality control program is mandatory and cells should only be applied within non-clinical studies if they passed all acceptance criteria. The validation of the qPCR method demonstrated high accuracy, precision, and linearity for the concentration interval of $1:1 \times 10^3$ to $1:1 \times 10^6$ human to mouse genomes. The application of this method in the biodistribution study resulted in the detection of human genomes in four out of the eight investigated organs after 24 hours. After seven days, no human DNA was detected in the eight organs analyzed. This biodistribution study provides mandatory data on the toxicokinetic safety profile of an actual cell-based medicinal product candidate. This is a prerequisite for designing and performing the subsequent toxicity studies necessary to ensure patient safety and permit moving the medicinal product towards a first-in-human clinical trial.

Bevor ein zellbasiertes GTMP erstmalig beim Menschen angewendet werden kann, müssen verschiedene notwendige nicht-klinische Studien durchgeführt werden. Wichtig ist hier u.a. die Untersuchung der Biodistribution im Tiermodell. Diese umfasst die Verteilung, das Engraftment, die Persistenz, die Eliminierung und gegebenenfalls die Expansion der humanen Zellen in verschiedenen Organen, meistens im Mausmodell. Deshalb wurde eine qPCR-basierte Analysenmethode entwickelt, mit der humane genomische DNA innerhalb von muriner genomischer DNA bestimmt werden kann, und entsprechend den regulatorischen Richtlinien der European Medicines Agency und des International Council for Harmonisation validiert. Anschließend wurde diese Methode innerhalb einer präklinischen worst-case Szenario Biodistributionsstudie angewendet. Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Biodistributionsprofils von genetisch modifizierten Blood Outgrowth Endothelial Cells von Hämophilie A Patienten 24 Stunden und sieben Tage nach intravenöser Applikation einer Dosis von 2×10^6 Zellen. Die Isolation, genetische Modifikation und die Expansion der Zellen sollte

entsprechend den Richtlinien der Guten Herstellungspraxis durchgeführt werden. Hierbei ist die Auswahl und Anwendung geeigneter und essentieller Rohstoffe wichtig. Gleichmaßen ist die Durchführung einer definierten Qualitätskontrollstrategie notwendig und die Patientenzellen sollten nur innerhalb von nicht-klinischen Studien eingesetzt werden, wenn alle Akzeptanzkriterien erfüllt wurden. Die Validierung der qPCR-Methode zeigte eine hohe Genauigkeit, Präzision und Linearität innerhalb des Konzentrationsintervalls von $1:1 \times 10^3$ bis $1:1 \times 10^6$ humanen zu murinen Genomen. Bei Anwendung dieser Methode für die Biodistributionsstudie konnten nach 24 Stunden humane Genome in vier der acht untersuchten Mausorgane bestimmt werden. Nach sieben Tagen konnten in keinem der acht Organe humane Genome nachgewiesen werden. Diese Daten stellen einen wichtigen Teil des toxikokinetischen Sicherheitsprofils für das zellbasierte Arzneimittel dar. Sie ermöglichen bzw. sind eine Notwendigkeit für die anschließende Definition der Dauer und des Designs weiterer nicht-klinischer Sicherheitsstudien zur Sicherstellung der Patientensicherheit für eine erste Anwendung innerhalb einer klinischen Prüfung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	12
1.1 Zielsetzung und Projektbeschreibung.....	12
1.2 Regulatorische Rahmenbedingungen für ATMPs.....	12
1.3 Klassifizierung und Bestimmung der regulatorischen Anforderungen.....	15
1.4 Nicht-klinische Studien mit Schwerpunkt Biodistribution	16
1.5 Anforderungen an die qPCR-basierte Analysenmethode für die Untersuchung der Biodistribution	18
1.6 Arzneimitteltherapie der schweren Form der Hämophilie A und neue Arzneimittelentwicklungen	21
1.7 BOECs: Herstellungsprozess und Qualitätskontrolle.....	25
2. Materialien und Methoden	26
2.1 GMP-Anforderungen an Rohstoffe für ATMPs.....	26
2.1.1 Evaluierung der Anforderungen an Rohstoffe für Isolierung und Expansion von BOECs anhand eines Thrombozytenkonzentrates zum Serumersatz.....	27
2.1.2 Durchführung des risikobasierten Ansatzes am Beispiel eines Thrombozytenkonzentrates zum Serumersatz.....	28
2.2 BOEC Isolierung, Transduktion, Expansion und Qualitätskontrolle.....	30
2.2.1 BOEC Isolierung und Transduktion in UPO	30
2.2.2 Expansion von BOECs	31
2.2.3 Qualitätskontrolle von BOECs	32
2.3 Entwicklung, Validierung und Anwendung der qPCR-Methode zur Untersuchung der Biodistribution	35
2.3.1 Methodenentwicklung und Robustheitstest.....	42
2.3.2 Methodvalidierung.....	47
2.4 Studienprotokoll für die Biodistributionsstudie für die intravenöse Verabreichung von tHA-BOECs	55
2.4.1 Vorbereitung der tHA-BOECs und i.v.-Applikation.....	57
2.4.2 Organentnahme.....	58
2.4.3 Organaufbereitung, DNA-Isolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung	59
2.4.4 Analyse der Biodistributionsproben mittels qPCR	60
2.4.5 Statistische Datenauswertung und Ausschluss von Daten	62
3. Ergebnisse	64
3.1 Risikoanalyse und Risikobewertung anhand eines Thrombozytenkonzentrates zum Serumersatz	64
3.2 BOEC Isolierung, Expansion und Qualitätskontrolle	66
3.2.1 Expansion von tHA-BOECs für die Biodistributionsstudie.....	66

3.2.2 Qualitätskontrolle von tHA-BOECs für die Biodistributionsstudie	68
3.3 Methodenentwicklung und Methodvalidierung zur Durchführung von Biodistributionsstudien	72
3.3.1 Methodenentwicklung und Robustheitstest	73
3.3.2 Methodvalidierung	95
3.4 Biodistributionsstudie für die intravenöse Verabreichung von tHA-BOECs	102
3.4.1 Organentnahme	103
3.4.2 Organaufbereitung, DNA-Isolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung	103
3.4.3 Analyse mittels qPCR und statistische Datenauswertung	104
4. Diskussion	110
4.1 Umsetzung von GMP-Anforderungen an Rohstoffe im ATMP-Herstellungsprozess	110
4.2 Isolierung, Expansion und Qualitätskontrolle von tHA-BOECs	112
4.3 Methodenentwicklung und Methodvalidierung	114
4.4 Worst-case-Szenario-Biodistributionsstudie mit tHA-BOECs im Mausmodell	119
5. Schlussfolgerung	124
6. Referenzen	125
7. Anhang	131

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung und Projektbeschreibung

Die Ziele dieser Doktorarbeit sind zum einen das Design und die Durchführung von präklinischen Sicherheitsstudien für einen Arzneimittelkandidaten aus der Gruppe der neuartigen Arzneimittel, auch Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) genannt, sowie die Etablierung der hierfür benötigten analytischen Methoden unter Einhaltung der regulatorischen Anforderungen. Ein weiteres Ziel ist die Erfüllung der Voraussetzungen an die Gute Herstellungspraxis (GMP) für den Herstellungsprozess des ATMPs hinsichtlich der Anforderungen an die Rohstoffe mithilfe eines risikobasierten Ansatzes. Das Arzneimittel wird für die Behandlung von Patienten mit der schweren Form der Hämophilie A entwickelt.

1.2 Regulatorische Rahmenbedingungen für ATMPs

ATMPs stellen eine neue und innovative Arzneimittelgruppe dar, für die mit der Verordnung (EG) Nr. 1394/2007 über Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP-Verordnung) ein eigener Rechtsrahmen geschaffen wurde. Der Grund hierfür ist, dass ATMPs meist sehr komplex und individuell sehr verschieden sind und sich stark von anderen Arzneimittelklassen unterscheiden (1). Dies betrifft beispielsweise den Herstellungsprozess, das Ausgangsmaterial und den Wirkmechanismus. Da ATMPs eine sehr heterogene Arzneimittelgruppe darstellen, werden diese in drei Untergruppen aufgeteilt: die Gentherapeutika (GTMP), die somatischen Zelltherapeutika (SCTP) sowie die biotechnologisch bearbeiteten Gewebeprodukte (TEP). Die Einstufung eines biologischen Arzneimittels bestehend aus Zellen oder Gewebe, bestimmt zur Anwendung im oder am Menschen, als ATMP findet statt, wenn diese Zellen oder das Gewebe substantiell bearbeitet wurden. Unter substantieller Bearbeitung von Zellen oder Gewebe versteht man die Veränderung biologischer Merkmale, physiologischer Funktionen oder struktureller Eigenschaften durch den Herstellungsprozess entsprechend ihrer beabsichtigten therapeutischen Funktion bzw. Wirkweise (2). Beispiele hierfür sind die Expansion, genetische Modifikation oder Differenzierung von Zellen. Trifft dies nicht zu, findet unabhängig davon eine Klassifizierung als ATMP statt, wenn Zellen oder Gewebe im Empfänger im Wesentlichen nicht derselben Funktion dienen wie im Spender. Dies wird auch als „non-homologous use“ bezeichnet und trifft zum Beispiel zu, wenn mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe eines Patienten gewonnen werden und aufgrund ihrer immunmodulatorischen Effekte in ein strukturell oder anatomisch anderes Gewebe verabreicht werden (3). Die Klassifizierung eines Arzneimittels als ATMP und die Zuteilung in eine der drei Untergruppen ist von entscheidender Bedeutung und sollte bereits am Anfang der Produktentwicklung beachtet werden, um die zutreffenden und verpflichtenden regulatorischen Anforderungen an das Arzneimittel eindeutig zu definieren (2). Enthält ein ATMP

außerdem als festen Bestandteil ein oder mehrere Medizinprodukte, wird es als kombiniertes ATMP eingestuft (1). Zusätzlich zu den regulatorischen Anforderungen an das kombinierte ATMP, gelten für den angewendeten Medizinproduktbestandteil an sich eigenständige regulatorische Rahmenbedingungen, die ebenfalls beachtet werden müssen (4). Bevor ein ATMP, ein kombiniertes ATMP oder generell ein Arzneimittel für die Anwendung am Patienten zugelassen werden kann, muss für dieses die Qualität, die Unbedenklichkeit und die Wirksamkeit sowie ein positives Nutzen-Risiko-Verhältnis nachgewiesen werden. Dieser Nachweis wird durch wissenschaftliche Wirksamkeits- und Sicherheitsdaten sowohl aus nicht-klinischen als auch klinischen Prüfungen erbracht. Die für ein Arzneimittel benötigten Daten und die hierfür notwendigen Prüfungen, Studien oder Experimente orientieren sich stets am aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik und können bei ATMPs, aufgrund der ausgeprägten Heterologie bei verschiedenen Arzneimittelkandidaten, sehr unterschiedlich sein (5). Die Reihenfolge bei der Entwicklung von ATMPs gliedert sich hierbei chronologisch grundsätzlich in eine erste anwendungsorientierte Entwicklung im Labor, in nicht-klinische Prüfungen und in klinische Prüfungen gefolgt von der Zulassung, wobei Überschneidungen in den einzelnen Phasen möglich sind. Das erste Ziel ist es durch *in-vitro* Experimente im Labor oder durch erste präklinische Tierstudien einen Wirksamkeitsnachweis für die festgelegte Indikation bzw. für die Behandlung der vorgesehenen Erkrankung (Proof-of-Concept) zu zeigen. Anschließend folgt in der Regel die Durchführung von nicht-klinischen Sicherheitsstudien sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*. Liegen der Nachweis des Proof-of-Concepts für die ausgewählte Therapiestrategie sowie ausreichend Sicherheitsdaten für das ATMP vor, müssen vor einer „first in human“-Anwendung des ATMPs innerhalb einer klinischen Prüfung die Applikationsform, die Darreichungsform und das Intervall für eine sichere und effektive Startdosis definiert sein (6). Außerdem wird für die Durchführung einer klinischen Prüfung in Deutschland eine Genehmigung der zuständigen Bundesoberbehörde - im Fall von ATMPs das Paul-Ehrlich-Institut - und eine positive Bewertung der zuständigen Ethikkommission benötigt (5). Für die Herstellung der in der klinischen Prüfung angewendeten ATMPs wird bei Entnahme von Zellen oder Gewebe eine Entnahmeerlaubnis nach § 20b des Arzneimittelgesetzes (AMG) und eine Herstellungserlaubnis nach § 13 AMG benötigt (7). Eine Herstellungserlaubnis für Arzneimittel wird in Deutschland von den zuständigen Landesbehörden erteilt. Dies trifft auch für die erforderliche Erlaubnis zur Entnahme von autologem Gewebe für die Herstellung von ATMPs zu. Verglichen mit klassischen Arzneimitteln, wie z.B. Tabletten oder Kapseln, stellen ATMPs, wie bereits erwähnt, eine sehr komplexe und individuell sehr unterschiedliche Arzneimittelgruppe dar. Aus diesem Grund sind die Anforderungen an die GMP-konforme Herstellung für ATMPs in einem eigenen Dokument, den „Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products“ der Europäischen Kommission festgehalten (8). Diese erlauben dem Hersteller und Entwickler eines ATMPs eine gewisse Flexibilität, diejenigen Maßnahmen zu definieren und

anzuwenden, die die individuellen Charakteristika des zugrundeliegenden Herstellungsprozesses sowie des spezifischen ATMPs am besten berücksichtigen. Diese Richtlinien unterscheiden zwischen „investigational ATMPs“, die sich noch in der Entwicklung befinden und noch keine Marktzulassung haben, und „authorised ATMPs“, für welche eine solche Zulassung bereits vorliegt. Vor allem für Erstere ist eine gewisse Flexibilität - jedoch immer unter Berücksichtigung der Patientensicherheit - notwendig, da am Anfang bzw. während der frühen klinischen Entwicklung noch nicht ausreichend Wissen über das Produkt vorhanden ist, z.B. hinsichtlich Wirksamkeit des ATMPs beim Patienten (8). Weitere Anforderungen bei der ATMP-Herstellung für Patienten sind im Europäischen Arzneibuch zugrunde gelegt, auf die diese Richtlinie gegebenenfalls verweist. Liegen sowohl eine Herstellungserlaubnis als auch eine Genehmigung der klinischen Prüfung vor, können u.a. Daten zur Pharmakokinetik, Dosisfindung, zum Wirksamkeitsnachweis und der Sicherheit und Unbedenklichkeit des ATMPs erhoben werden. Diese Daten, zusammen mit den Daten aus dem nicht-klinischen Untersuchungsprogramm, bilden die Grundlage für die Beantragung der Marktzulassung des ATMPs. Hier ist jedoch zu beachten, dass ATMPs das von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) koordinierte, zentralisierte Zulassungsverfahren durchlaufen müssen (1). Bei diesem Verfahren ist zusätzlich das Committee for Advanced Therapies (CAT) beteiligt, welches die eingereichten Unterlagen bewertet und ein Gutachten entwirft. Unter Berücksichtigung der Qualität, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit des ATMPs wird eine Empfehlung an das Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) ausgesprochen. Das CHMP trifft anschließend eine Entscheidung und teilt diese der Europäischen Kommission, welche die finale Entscheidungsgewalt hat, mit. Wurde eine Marktzulassung durch die Europäische Kommission erteilt, erhält der Zulassungsinhaber den Marktzugang in allen Mitgliedsstaaten der EU (1, 5). Alternativ zum zentralisierten Zulassungsverfahren kann für ein ATMP, unter gewissen Voraussetzungen, eine zeitlich befristete Krankenhausausnahme, z.B. in Deutschland nach § 4b Abs. 1 des AMG, für die Anwendung des ATMPs genehmigt werden. Für dieses Genehmigungsverfahren ist in Deutschland ebenfalls das Paul-Ehrlich-Institut zuständig. Die Voraussetzungen für eine zeitlich befristete Krankenhausausnahme sind die Herstellung einer individuellen Zubereitung für einzelne Patienten, eine ärztliche Verschreibung, eine nicht routinemäßige und nach spezifischen Qualitätsnormen durchgeführte Herstellung und die Anwendung in einer spezialisierten Einrichtung der Krankenversorgung unter der fachlichen Verantwortung eines Arztes (1, 7). Eine Krankenhausausnahme ist vor allem für ATMPs angedacht, für die aufgrund weniger Anwendungen die zur Verfügung stehenden Daten zur Wirksamkeit und Sicherheit noch sehr begrenzt sind, beispielsweise bei der nicht routinemäßigen Ausrichtung der Herstellung oder bei seltenen Erkrankungen, die eine geringe Inzidenz aufweisen.

1.3 Klassifizierung und Bestimmung der regulatorischen Anforderungen

Die Voraussetzungen bei der Klassifizierung und der Definition der regulatorischen Rahmenbedingungen eines spezifischen ATMP-Kandidaten müssen immer - grundsätzlich gilt dies für jedes ATMP - individuell betrachtet werden (2). Das ATMP, für das die im Folgenden beschriebenen Arbeiten und Studien durchgeführt wurden, ist ein zellbasiertes Gene Therapy Medicinal Product (Gentherapeutikum, GTMP) in Kombination mit einem Medizinprodukt mit der Indikationsstellung „Behandlung von Patienten mit der schweren Form der Hämophilie A“. Alle Schritte zur Klassifizierung des Arzneimittels und die Festlegung der regulatorischen Rahmenbedingungen sind in den Abbildungen 1 und 2 aufgezeigt.

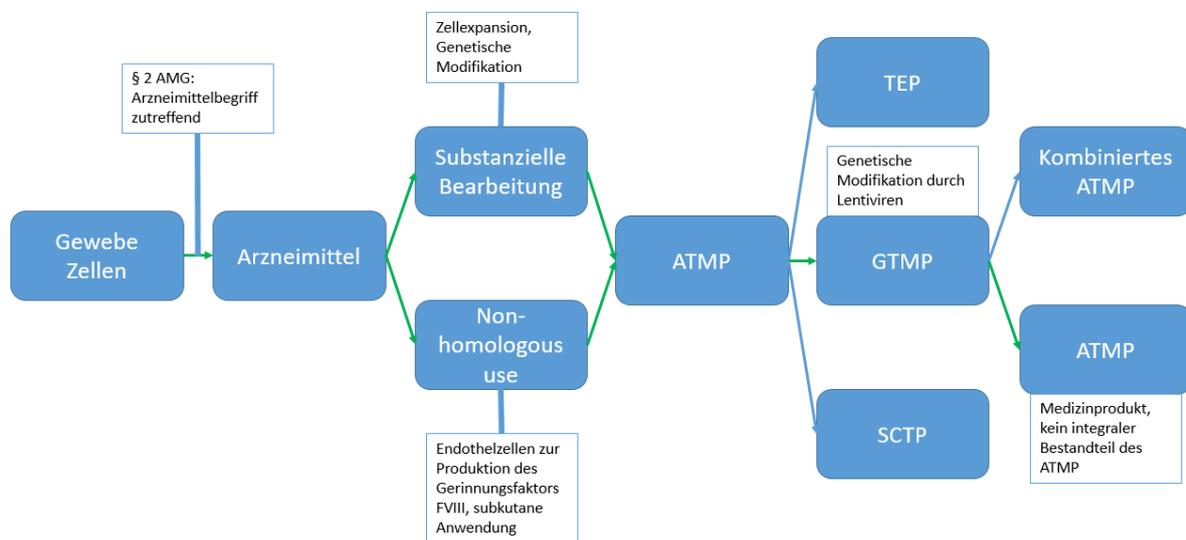


Abbildung 1 Vorgehen bei der Klassifizierung des ATMP-Kandidaten anhand des Herstellungsprozesses, der spezifischen Charakteristika und der Indikationsstellung. Die grünen Pfeile zeigen den Weg der Klassifizierung für den ATMP-Kandidaten dieser Arbeit an.

Da das zelluläre ATMP zur Behandlung von Patienten mit der schweren Form der Hämophilie A eingesetzt werden soll, trifft § 2 AMG zu und das Produkt wird zunächst grundsätzlich als Arzneimittel eingestuft. Die Klassifizierung als ATMP ist anschließend sowohl aufgrund der substanzialen Bearbeitung im Herstellungsprozess als auch durch eine subkutane Anwendung (non-homologous use) gegeben. Das ATMP besteht aus autologen Endothelzellen, die aus dem Blut der Patienten gewonnen und anschließend durch einen Lentivirus genetisch modifiziert werden, sodass diese den Gerinnungsfaktor VIII (FVIII) herstellen. Die aus dem Blut gewonnen und genetisch modifizierten Endothelzellen sollen, nach Expansion, subkutan beim Patienten zur Anwendung kommen. Die genetische Modifikation hat wiederum die Einteilung als GTMP zur Folge. Die Kombination des GTMPs mit einem Medizinprodukt führt zur Klassifizierung als kombiniertes ATMP, wenn das Medizinprodukt ein integraler bzw. fester Bestandteil des Arzneimittels ist. In diesem Falle erfolgt die Anwendung des

Medizinprodukts und des ATMPs aber zeitlich getrennt und das Arzneimittel wird final als GTMP eingestuft. Basierend auf der Arzneimittelklassifizierung ist in Abbildung 2 der zeitliche Ablauf der Produktentwicklung vereinfacht aufgezeigt. Zusätzlich sind die regulatorischen Rahmenbedingungen für ATMPs inklusive der benötigten Studien, Prüfungen und Daten sowie die regulatorisch notwendigen Erlaubnisse dargelegt.

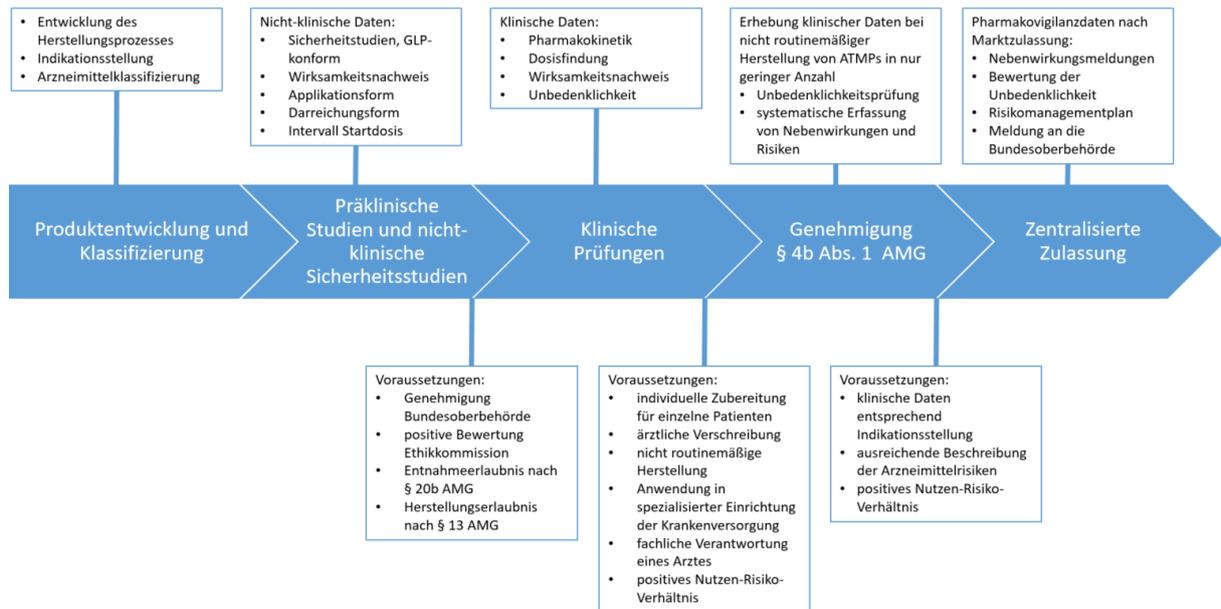


Abbildung 2 Zeitlicher Ablauf der Produktentwicklung eines ATMPs und benötigte Studien, Prüfungen und Daten sowie regulatorisch notwendige Erlaubnisse. GLP = Gute Laborpraxis.

Der in Abbildung 2 gezeigte Zeitablauf bei der ATMP-Entwicklung und -Translation umfasst hierbei meist eine sehr große Zeitspanne von bis zu mehr als 15 Jahren (9). Die Gründe hierfür sind, dass in den verschiedenen Phasen der Entwicklung unterschiedliche Schwierigkeiten auftreten. Diese betreffen beispielsweise regulatorische Anforderungen, die spezifisch für einzelne Länder unterschiedlich sein können, den Herstellungsprozess sowie die Einhaltung der für diesen notwendigen GMP-Anforderungen und das Design von klinischen Prüfungen und nicht-klinischen Studien (9). Teil dieser Promotionsarbeit ist die Untersuchung der Biodistribution, eine nicht-klinische Sicherheitsprüfung des ATMP-Kandidaten im worst-case-Szenario und die Erfüllung der GMP-Anforderungen für den Herstellungsprozess des ATMPs hinsichtlich der Anforderungen an Rohstoffe.

1.4 Nicht-klinische Studien mit Schwerpunkt Biodistribution

Die Ziele bei der Durchführung nicht-klinischer Studien sind die Erbringung eines Wirksamkeitsnachweises, der sogenannte Proof-of-Concept, sowie die Bestimmung und Definition von pharmakologischen und toxikologischen Effekten, die eine Vorhersage für die Anwendung und

Sicherheit beim Patienten ermöglichen. Für einen ATMP-Kandidaten bestehend aus genetisch modifizierten Endothelzellen, genauer Blood Outgrowth Endothelial Cells (BOECs) modifiziert durch lentivirale Vektoren, die subkutan mit einem Medizinprodukt angewendet werden, sind neben dem Wirksamkeitsnachweis u.a. folgende nicht-klinische Sicherheitsstudien und Daten nötig (6, 10, 11):

- Auswahl der angewendeten Dosis bzw. Startdosis
- Verabreichungsweg und Verabreichungsplan
- Effekt der genetischen Modifikation und Änderungen im Genom der Zellen
- Expression und Aktivität des Transgens
- Dauer der Transgenexpression *in-vivo* und der Grund bei eventuellem und unerwartetem Verlust der Transgenexpression
- Biodistributionsprofil der genetisch modifizierten Zellen bestehend aus Verteilung, Engraftment, Persistenz, Eliminierung und gegebenenfalls Expansion der Zellen
- Vektormobilisation, Risiko für Insertionsmutagenese und Toxizität in Bezug auf das Transgen oder die Transgenexpression
- Tumorigenitätsstudien *in vivo*

Aufgrund der subkutanen Verabreichung von genetisch modifizierten BOECs in Kombination mit einem Medizinprodukt stellt die Untersuchung der Biodistribution einen wichtigen Sicherheitsaspekt für den Patienten dar. Hier werden die Verteilung, das Engraftment, die Persistenz, die Eliminierung und gegebenenfalls die Expansion der Zellen in verschiedenen Organen untersucht. Dies stellt einen wichtigen Teil des toxikokinetischen Sicherheitsprofils dar und ermöglicht bzw. ist eine Notwendigkeit für die anschließende Definition der Dauer und des Designs weiterer nicht-klinischer Sicherheitsstudien, wie beispielsweise die Untersuchung der Tumorigenität (6, 10). Bei der Anwendung des hier untersuchten GTMPs, d.h. bei der zeitlich versetzten subkutanen Verabreichung der Zellen in das Medizinprodukt beim Patienten, besteht die Gefahr, dass Zellen teilweise oder im worst-case-Szenario vollständig in den Blutkreislauf gelangen. Entsprechend der Risikobetrachtung für den Patienten ist deshalb sowohl die Untersuchung des Biodistributionsprofils bei intravenöser (i.v.) Applikation, dies entspricht der maximalen systemischen Verteilung der Zellen, als auch bei der vorgesehenen klinischen Anwendung in Kombination mit dem Medizinprodukt notwendig (12). Die Untersuchung der Biodistribution findet meistens zunächst im Kleintiermodell (zumeist Mausmodelle) statt und gliedert sich bei Anwendung einer Analysenmethode, die auf der quantitativen Amplifikation von Nukleinsäuren (qPCR) beruht, vereinfacht in die Prozessschritte Zellapplikation, Organentnahme nach definierten Zeitpunkten, Organaufbereitung, DNA-Isolierung und Analyse mittels qPCR (13-15). Wichtige Charakteristika beim Design und der Durchführung von Biodistributionsstudien, mit Fokus

auf die vorgesehene klinische Anwendung in Kombination mit dem Medizinprodukt als auch auf das worst-case-Szenario, sind:

- Auswahl des passenden Tiermodells
- Auswahl der geeigneten Zelldosis zur Abbildung einer maximalen systemischen Verteilung
- Untersuchungszeitpunkte, d.h. die Zeitpunkte, an denen die Organentnahme stattfindet
- Anzahl der Versuchs- und Kontrolltiere
- Auswahl geeigneter Methoden zur Organaufbereitung
- Auswahl und Validität der angewendeten Analysemethoden
- statistische Auswertung der Analyseergebnisse

Dementsprechend wird innerhalb dieser Promotionsarbeit das angewandte Studiendesign beschrieben, die hierfür benötigten analytischen Methoden anhand regulatorischer Anforderungen entwickelt und etabliert sowie das Biodistributionsprofil im worst-case-Szenario untersucht.

1.5 Anforderungen an die qPCR-basierte Analyseverfahren für die Untersuchung der Biodistribution

Die wissenschaftliche Rationale bei Auswahl und Design von Analysemethoden für nicht-klinische Studien und die Einhaltung der notwendigen regulatorischen Anforderungen ist wichtig, da die erhobenen Daten bei einem späteren Antrag auf Zulassung einer klinischen Prüfung oder Marktzulassung den Behörden vorgelegt werden müssen (6, 10). Die Biodistribution von zellbasierten GTMPs, vor allem bei Zellen humanen Ursprungs, wird in der Regel in einem immundefizienten Mausmodell, zur Verhinderung von immunologischen Abstoßungsreaktionen der Zellen, untersucht (16, 17). Die Analyse beruht hierbei häufig auf Techniken, die auf der qPCR-Methode beruhen, um so die Menge an humanen Zellen, nach Applikation einer oder mehrerer Dosen des GTMPs, in verschiedenen Mausorganen zu quantifizieren. Genauer gesagt wird die Menge an humanen Genomen in einer heterogenen Stichprobe von Mausgenomen, die in einem Überschussverhältnis vorliegen, quantifiziert (18-20). Neben der qPCR werden beispielsweise auch die Fluoreszenzmikroskopie oder die Durchflusszytometrie als Analysemethoden bei Biodistributionsuntersuchungen eingesetzt (21-23). Die qPCR stellt eine seit Jahren genutzte, molekularbiologische Standardmethode dar und die Gründe für den Einsatz als Analyseverfahren bei Biodistributionsstudien sind, unter anderem, eine hohe Kosteneffizienz, hohe Selektivität und allem voran eine hohe Sensitivität (24, 25). Jedoch ist zu beachten, dass die Performance einer qPCR-basierten Analyseverfahren von mehreren unterschiedlichen Parametern abhängig ist. Hierzu gehören unter anderem die Auswahl des Vorwärts- und Rückwärtsprimers, der Sonde, des qPCR-Thermocyclers, der DNA-Polymerase, der Pufferzusammensetzung, der Reaktionsbedingungen und der Auswertemethode, d.h. die Art der

Berechnung bzw. Bestimmung der Quantification Cycles (C_q-Werte). Diese Parameter können einen starken Einfluss auf die Spezifität, Sensitivität, Genauigkeit und Präzision der Methode haben und so die Studienergebnisse beeinflussen (26-29). Als Konsequenz muss generell für Analysenmethoden, die innerhalb des nicht-klinischen Studienprogramms eingesetzt werden, eine geeignete Methodvalidierung durchgeführt werden (12). So soll sichergestellt werden, dass die Methode für ihren vorgesehenen Einsatzzweck geeignet ist und die mit dieser Methode erhobenen Daten uneingeschränkt verlässlich und interpretierbar sind. Aus diesem Grund wurden sowohl durch die EMA als auch durch das International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Richtlinien entwickelt, die die generellen Anforderungen an die Methodvalidierung definieren. Diese sind die „Guideline on bioanalytical method validation“ der EMA und die ICH Richtlinie „Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology“ (30, 31). Des Weiteren enthält der Monograph 2.6.21 des Europäischen Arzneibuchs spezifische Richtlinien für die Validierung von quantitativen qPCR-Methoden (32). Die Grundlage bei der Methodvalidierung ist der Methodvalidierungsplan, der unter Beachtung der geltenden Anforderungen dieser Richtlinien und Vorgaben die notwendigen Validierungsparameter sowie die Maßnahmen zu deren Untersuchung beschreibt (30-32). Der Methodvalidierungsplan muss zusätzlich noch durch die Anwendung eines risikobasierten Ansatzes und die hierdurch entwickelten Maßnahmen ergänzt werden, um die spezifischen Bedingungen der Methode und die Umstände bei der Durchführung zu berücksichtigen (8). Werden beispielsweise Hydrolyse-Sonden eingesetzt, die bei Lichtexposition nur für eine begrenzte Zeit stabil sind, und ist gleichzeitig die Vorbereitungszeit der Proben bei einem großen Probeneinsatz, wie bei Biodistributionsstudien üblich, erhöht, muss dies in Betracht gezogen und der Einfluss auf die Methode untersucht werden. Abbildung 3 zeigt den Ablauf des Validierungsprozesses, der für die qPCR-basierte Methode angewendet wurde, aber auch für andere Analysenmethoden angewendet werden kann, inklusive aller benötigter Validierungsparameter.

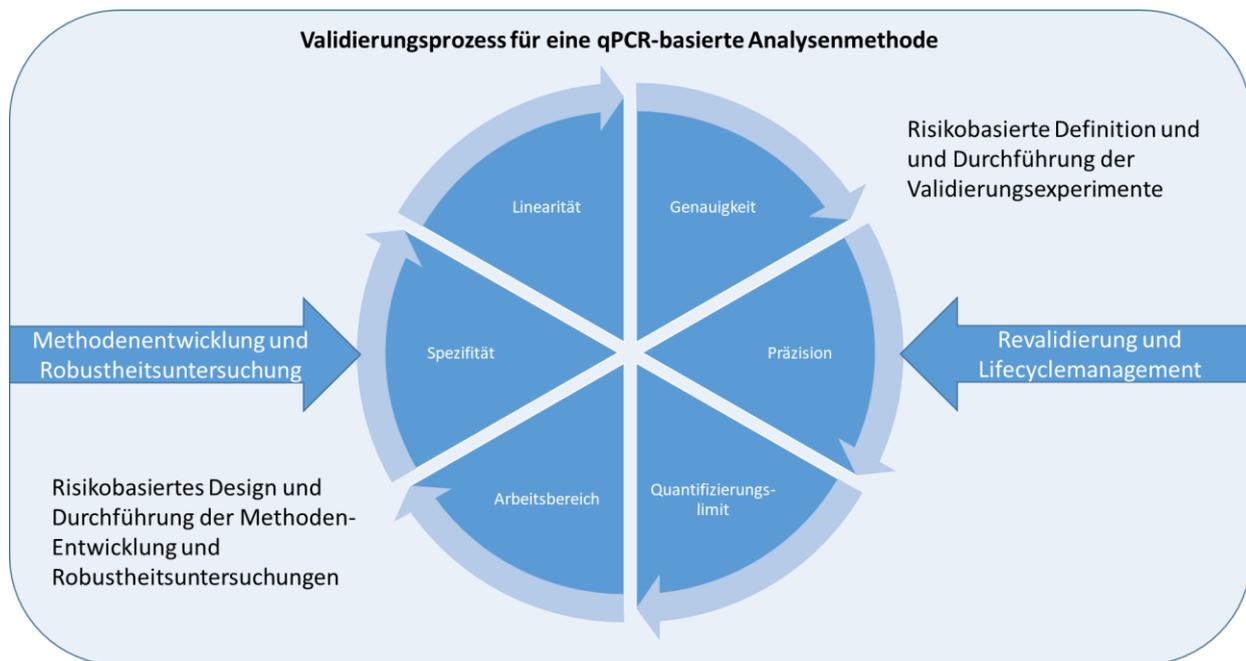


Abbildung 3 Validierungsprozess für eine qPCR-basierte Analysenmethode und die für die Methodvalidierung benötigten Validierungsparameter.

Zusätzlich zu den bisher genannten Anforderungen, muss die Analysenmethode dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik entsprechen (12, 33, 34). Bei qPCR-basierten Methoden zur Untersuchung der Biodistribution ist hier die Sensitivität der Methode hervorzuheben, da hier letztendlich die Aussage getroffen wird, ob sich humane Zellen in einem Mausorgan verteilen, persistieren und/oder eliminiert werden. Deshalb wurden zusätzlich zu den bisher genannten Anforderungen zunächst die Anforderungen an die Sensitivität der Analysenmethode sowie weitere institutionelle Anforderungen definiert:

- Quantifizierungslimit von mindestens einem humanen Genom in einem Überschuss von 1×10^6 Mausgenomen, entsprechend dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik (14, 15, 35)
- Anwendbarkeit der Analysenmethode für eine große Reichweite von zellbasierten ATMPs
- Durchführung der Validierung auf einem qualifizierten qPCR-Cycler
- Übertragbarkeit des Validierungsprozesses auf andere Methoden

Damit das geforderte Quantifizierungslimit erreicht werden kann, ist die Auswahl von geeigneten Primern und Sonden entscheidend. Üblicherweise kann durch die Verwendung von Sonden-basierten qPCRs eine höhere Sensitivität erzielt werden als zum Beispiel bei SYBR Green-basierten qPCRs, auch wenn deren Anwendung nicht obligatorisch ist (35, 36). Bisher wurden u.a. die α -satellite DNA auf dem humanen Chromosom 17 sowie die humane Downsyndromregion auf dem Chromosom 21 als PCR-Zielsequenzen für die Primer und die Sonde angewendet, wobei unterschiedliche Quantifizierungslimits erreicht wurden (37, 38). Die wichtigste Eigenschaft für die ausgewählte

Zielsequenz ist eine hohe Speziespezifität, die eine genaue, präzise und sensitive Quantifizierung von humaner genomischer DNA (hgDNA) in einem Überschuss von muriner genomischer DNA (mgDNA) erlaubt. Die humanen Alu repeat (hAlu)-Sequenzen erfüllen diese Anforderung und ermöglichen zusätzlich aufgrund des hohen repetitiven Vorkommens im humanen Genom eine sensitive, genaue und präzise Quantifizierung von humanen Genomen in Mausorganen (14, 36, 39). Folglich wurden die hAlu-Repeatsequenzen bereits durch verschiedene Forschungsgruppen u.a. für Biodistributionsanalysen verwendet (14, 35, 36). Die Anwendung dieser Zielsequenz ermöglicht prinzipiell die Bestimmung von humaner genomischer DNA auch in anderen Tiermodellen und die breite Anwendbarkeit der Analysenmethode für Biodistributionsstudien für alle ATMPs, die auf Zellen humanen Ursprungs beruhen. Standardmäßig muss vor der Methodvalidierung eine geeignete Gerätequalifizierung durchgeführt werden, wenn diese Methode in einem GMP-Bereich eingesetzt werden soll (8). Hierdurch wird gezeigt, dass das Gerät für den vorgesehenen Verwendungszweck geeignet ist. Für den verwendeten qPCR-Cycler wurde bereits im Vorfeld eine Gerätequalifizierung durchgeführt, woraufhin das Gerät direkt für die Methodvalidierung und für die Biodistributionsstudie für den ATMP-Kandidaten, zur Behandlung der schweren Form der Hämophilie A, verwendet werden konnte.

1.6 Arzneimitteltherapie der schweren Form der Hämophilie A und neue Arzneimittelentwicklungen

Hämophilie A ist eine Blutgerinnungsstörung, ausgelöst durch das Fehlen oder eine funktionelle Defizienz des Gerinnungsfaktors VIII. Grund hierfür sind Mutationen im Gen FVIII, das für diesen Gerinnungsfaktor codiert und auf dem X-Chromosom liegt (40, 41). Hämophilie A wird X-chromosomal-rezessiv vererbt und tritt daher in der Regel nur bei Männern auf. Jedoch kann eine Neuerkrankung auch sporadisch auftreten, bedingt durch eine Neumutation im X-Chromosom. Die Prävalenz der schweren Form der Erkrankung liegt bei Männern ca. bei einer Erkrankung auf 5000 Geburten (42, 43). Bedingt durch den Schweregrad der Hämophilie A wurden zur Unterscheidung drei Gruppen definiert:

- Schwere Hämophilie A – FVIII-Restaktivität < 1%
- Mittelschwere Hämophilie A – FVIII-Restaktivität 1-4%
- Leichte Hämophilie A – FVIII-Restaktivität 5-24%

Bei einer Restaktivität des FVIII von 25-50% spricht man bereits von einer Subhämophilie. FVIII wird für die Bildung von Thrombin benötigt. Thrombin wiederum wird benötigt für die Bildung von Fibrin, welches zusammen mit dem Gerinnungsfaktor XIII zur Vernetzung von Thrombozyten führt und anschließend den Wundverschluss einleitet. FVIII ist also ein wichtiger Bestandteil der Gerinnungskaskade beim Menschen (siehe Abbildung 4) und dessen Mangel kann vor allem bei der

schweren Hämophilie A zu spontanen Blutungen führen (44, 45). Blutungen können an verschiedenen Stellen im Körper des Patienten auftreten. Ohne Behandlung kommt es beispielsweise häufig zu Blutungen in den großen Gelenken und Muskeln. Diese können sehr schmerzhaft sein und insbesondere Gelenkblutungen stellen ein erhöhtes Risiko für zukünftige Gelenkschäden und das Auftreten von rezidivierenden Blutungen dar. Dies kann schließlich zu chronisch-entzündlichen Prozessen führen und zu chronischen Schäden an Gelenkknorpel und Gelenkknochen (41-43). Die Standardtherapie bei der Behandlung der Hämophilie A besteht aus der prophylaktischen und intravenösen Infusion des fehlenden FVIII Proteins, das entweder aus humanem Blutplasma gewonnen oder rekombinant hergestellt wird. Beide Arten von FVIII-Präparaten haben bei Erwachsenen eine ungefähre Halbwertszeit von 10,4 Stunden. Deshalb müssen die FVIII-Infusionen zwei- bis viermal wöchentlich beim Patienten durchgeführt werden. Kommt es zu akuten Blutungen oder benötigt ein Patient eine Operation, werden gegebenenfalls abhängig vom Schweregrad weitere Dosen des FVIII-Ersatzpräparates verabreicht (40, 41). Jedoch kann sich der Blutungsphänotyp zwischen Hämophilie A-Patienten mit identischen FVIII-Plasmaspiegeln stark unterscheiden und z.B. von Alter, Gewicht, körperlicher Aktivität und weiteren Faktoren abhängig sein (40, 41, 46). Aus diesem Grund wird heutzutage eine personalisierte Patientenbehandlung angestrebt, bei der diese wichtigen Faktoren miteinbezogen und die erforderlichen Konzentrationslevel des Gerinnungsfaktors dementsprechend individuell festlegt werden (47). Eine weitere Schwierigkeit bei der Behandlung der schweren Hämophilie A ist die Bildung von Antikörpern gegen FVIII durch das Immunsystem bei ca. 30% der Patienten. Dies kann zu einer Resistenz gegen die Substitutionstherapie und zu einem erhöhten Risiko für Blutungen führen (48, 49). Deshalb und aufgrund der hohen Kosten der Substitutionstherapie und der hohen Belastung für die Patienten, u.a. durch häufige Infusionen, wird intensiv an neuen Behandlungsmethoden geforscht (50). Die Produkte, die sich zurzeit in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden, verfolgen verschiedene Konzepte zur Optimierung der Behandlung für Hämophilie A-Patienten und sind daher u.a. hinsichtlich Wirkmechanismus, molekularer Zielstruktur und der Zielsetzungen verschieden (50). Sie lassen sich diesbezüglich in drei verschiedene Gruppen einteilen. Darüber hinaus existieren weitere Produkte bzw. Produktentwicklungen, für die diese Einteilung nicht zutrifft. Diese werden in einer vierten Gruppe unter „further product developments“ zusammengefasst und in dieser Arbeit nicht näher betrachtet. Tabelle 1 zeigt diese Einteilung, nennt aktuelle Produktkandidaten, die sich in unterschiedlichen Entwicklungsphasen befinden, inklusive der dazugehörigen Firmen und nennt die molekularen Zielstrukturen bzw. den Wirkmechanismus der spezifischen Produktgruppe (50-52). In Abbildung 4 ist zudem der Wirkmechanismus schematisch dargestellt, um die Zielsetzung der jeweiligen Produktgruppe zu verdeutlichen. Diese Abbildung zeigt die Zielstrukturen der Produktgruppen innerhalb der Gerinnungskaskade auf.

Tabelle 1 Übersicht der verschiedenen neuen Produkte und Produktentwicklungen zur Behandlung der Hämophilie A.

Produktgruppe	Produktkandidaten (Firma)	Molekulare Zielstruktur/Wirkmechanismus
Extended half life products (EHLs)	BAY94-9027 (Bayer) N8-GP (Novo Nordisk) Bax 855 (Shire) Elocta (Biogen/Sobi)	Substitutionstherapie mit FVIII mit strukturell veränderter Glykoproteinstruktur z.B. durch Quervernetzung mit Polyethylenglykol zur Verlängerung der Halbwertszeit
Non clotting factor products (NCF)	Emicizumab (Roche) Fitusiran (Alnylam Pharmaceuticals) Concizumab (Novo Nordisk)	IgG4-Antikörper mit FVIII-Koenzymaktivität → FVIII mimetische Wirkung siRNA gegen Antithrombin → Antithrombininhibition Monoklonale Antikörper gegen TFPI (Tissue factor pathway inhibitor) → keine Inhibition der Bildung von FXa
Gene therapy products with Adeno-associated viruses (AAV)	BMN 270 (Biomarin) Spk-8011 (Spark Therapeutics) GO-8 (UCL/St Jude) SB-525 (Sangamo Biosciences)	Integration des funktionellen FVIII-Gens in das Genom der Hepatozyten der Patienten, sodass FVIII durch diese Zellen selbst hergestellt wird
Further product developments	SerpinPC (ApcinteX Ltd) CRISPR/Cas-basierte Methoden	Inhibition von aktiviertem Protein C und damit Verhinderung des Abbaus des thrombinbildenden Komplexes

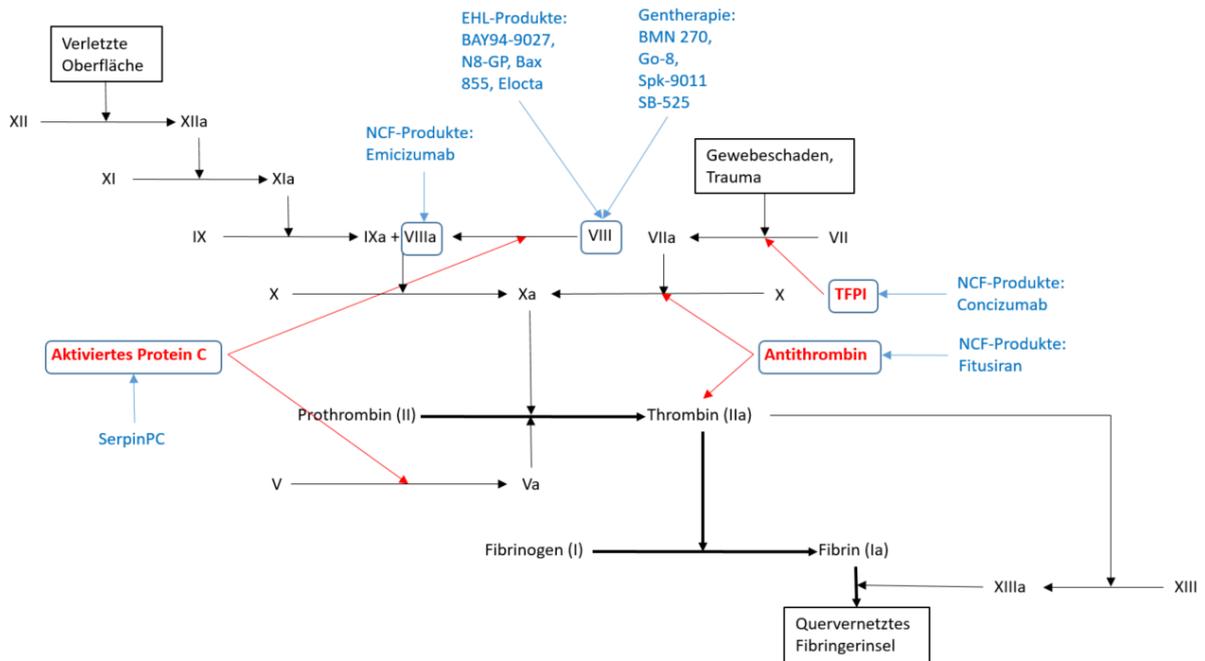


Abbildung 4 Zielstrukturen und Wirkmechanismen verschiedener neuer Produkte und Produktentwicklungen zur Behandlung der Hämophilie A gezeigt anhand der Gerinnungskaskade. Die Produkte und Produktentwicklungen sind blau markiert und die von den non clotting factor products und von SerpinPC adressierten Zielstrukturen sowie deren Funktionen innerhalb der Gerinnungskaskade sind rot dargestellt.

Tabelle 1 und Abbildung 4 zeigen, dass verschiedene Behandlungsansätze entwickelt werden, die unterschiedliche Ziele zur Verbesserung der Behandlung der Hämophilie A-Patienten verfolgen. Zu diesen gehören u.a.:

- Entwicklung einer Therapie für Patienten mit stark ausgeprägter FVIII-Inhibition durch Antikörper
- Verringerung der Dosisfrequenz bei der Substitutionstherapie
- Entwicklung einer Therapie, bei der eine kurative Einmalbehandlung ausreichend ist

Im Vergleich dazu werden von den in Kapitel 1.3 beschriebenen zellbasierten ATMP-Kandidaten vor allem folgende Ziele verfolgt bzw. sind zusätzliche Indikationsstellungen möglich:

- Verringerung der Dosisfrequenz bei der Substitutionstherapie bzw. Reduktion auf viertel- bzw. halbjährige Dosisfrequenzen
- Entwicklung einer Behandlung mit geringer Dosisfrequenz für sehr junge Patienten, die nicht durch eine Gentherapie behandelt werden können
- Therapie bei Immunitäten gegen AAV-basierte Gentherapeutika (50)

Die Zielsetzung für den spezifischen ATMP-Kandidaten dieser Arbeit und ebenso die genauere Indikationsstellung im Vergleich zu den Produkten anderer Hersteller - und damit auch dem aktuellen

Stand von Wissenschaft und Technik - sind wichtige Voraussetzungen bei der Produktentwicklung. Der Grund hierfür ist, dass dies wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung des Herstellungsprozesses, das Design und die Durchführung der nicht-klinischen Studien und die Übertragung des Herstellungsprozesses in ein GMP-Umfeld sind.

1.7 BOECs: Herstellungsprozess und Qualitätskontrolle

Der Herstellungsprozess des zellbasierten ATMP-Kandidaten für die Behandlung der schweren Hämophilie A besteht aus den übergeordneten Prozessschritten: Blutentnahme vom Patienten, Isolierung von BOECs aus dem Patientenblut, genetische Modifikation der BOECs, Expansion der BOECs, Vorbereitung der finalen Dosierung und Formulierung und zuletzt Applikation des Arzneimittels in Verbindung mit einem Medizinprodukt beim Patienten. Da dieser Herstellungsprozess sehr komplex ist und die Entwicklung sowie Optimierung der einzelnen Teilschritte von spezialisierten Forschungsgruppen durchgeführt wird, sind die Prozesse der Isolierung und vor allem der Expansion der BOECs inklusive der Qualitätskontrolle ein Teil dieser Doktorarbeit. Für die Isolierung von BOECs aus peripherem Blut sind einige ähnliche Methoden von verschiedenen Forschungsgruppen beschrieben und die Kernschritte sind grundsätzlich eine Dichtezentrifugation in Verbindung mit der Entnahme der Pheripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) sowie die Kultivierung dieser Zellen mit einem Selektionsmedium für Endothelzellen. Unterschiede in den einzelnen Protokollen sind z.B. in der Menge des verwendeten Blutvolumens, den Zellkulturschritten oder der Konzentrationen an Supplementen im Medium für die Selektion der Endothelzellen zu finden (53-56). BOECs sind beschrieben als vollständig differenzierte Endothelzellen und zeigen während der Zellkultur ca. zwei Wochen nach Isolation und Selektion eine typische endotheliale Pflastersteinmorphologie (55, 57). Sie sind Nachkommen von zirkulierenden Zellen und Knochenmarkszellen, die vermeintliche endotheliale Vorläuferzellen darstellen (54, 57). Die Gründe für die Isolierung und Auswahl von BOECs für den ATMP-Kandidaten waren:

- Es konnte zuvor gezeigt werden, dass Endothelzellen und im besonderen LSECs (liver sinusoidal endothelial cells) diejenigen Zellen sind, die hauptsächlich für die Produktion von FVIII verantwortlich sind (17, 58-60). Demzufolge könnten Endothelzellen die optimale Wahl für die Entwicklung einer Zell- und Gentherapie für die Behandlung der Hämophilie A darstellen.
- Für BOECs konnte eine sehr hohe Expansionskapazität bei der Anwendung von *in-vitro* Zellkulturverfahren und ein günstiges Sicherheitsprofil, z.B. ein stabiler Phänotyp bei längerer Expansion, gezeigt werden (54, 56, 57, 61).

- Für genetisch modifizierte BOECs zur erhöhten Produktion von FVIII zur Behandlung der Hämophilie A, hergestellt z.B. durch lentivirale Transduktion oder Plasmidtransfektion, wurden einige vielversprechende Vorversuche für verschiedene Anwendungen hinsichtlich Wirksamkeit und Sicherheit durchgeführt. Dazu gehören beispielsweise verschiedene Verabreichungswege von BOECs im Mausmodell, u.a. intravenös oder subkutan, und die anschließende Evaluierung der Menge an FVIII im Blutspiegel oder die Untersuchung der Biodistribution ebenfalls im Mausmodell (21, 23, 62). Diese Daten können als Anhaltspunkt dienen, jedoch muss aufgrund der Unterschiede zwischen den einzelnen ATMPs jeweils ein individuelles nicht-klinisches und klinisches Entwicklungsprogramm durchgeführt werden (6).

Wird ein ATMP in einer klinischen Prüfung am Patienten getestet, dann muss seine Herstellung und Qualitätskontrolle unter Einhaltung der GMP-Bedingungen durchgeführt werden und eine Herstellungserlaubnis nach § 13 AMG vorliegen (8). Werden BOECs innerhalb von nicht-klinischen Sicherheitsstudien, z.B. Tumorigenitätsstudien, im Tiermodell getestet, so soll die Herstellung des ATMPs ebenfalls unter GMP-Bedingung durchgeführt werden oder, falls dies noch nicht möglich ist, den Herstellungsprozess und somit auch die klinische Anwendung für das dort eingesetzte ATMP möglichst genau abbilden (6, 11). Ein wichtiger Punkt ist demzufolge, schon sehr früh in der Produktentwicklung, die Festlegung von Qualitätskontrollparametern inklusive geeigneter Spezifikationen und Akzeptanzkriterien für das individuelle ATMP anhand eines risikobasierten Ansatzes. Die Qualitätskontrolle und die Überprüfung der festgelegten Spezifikationen haben das Ziel sicherzustellen, dass alle notwendigen und relevanten Tests durchgeführt werden, so dass nur ATMPs bzw. BOECs mit nachgewiesener und ausreichender Qualität für die weitere Verwendung freigegeben und angewendet werden (8, 10, 12).

Aus diesen Gründen ist eine weitere Aufgabenstellung dieser Promotionsarbeit die Evaluierung und Erfüllung der GMP-Anforderungen an die eingesetzten Rohstoffe für die Isolierung und Expansion der BOECs sowie die Konzeption und Durchführung der Methodvalidierung für die Analysenmethode zur Untersuchung der Biodistribution. Die Anforderungen an die Rohstoffe für die Isolierung und Expansion der BOECs werden ebenfalls mit der Durchführung eines risikobasierten Ansatzes bestimmt und berücksichtigen alle relevanten Qualitäts-, Sicherheits- und Wirksamkeitsmerkmale des ATMPs.

2. Materialien und Methoden

2.1 GMP-Anforderungen an Rohstoffe für ATMPs

Die Anforderungen an Rohstoffe, die in der GMP-konformen Herstellung von ATMPs eingesetzt werden, sind im EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines Part IV

„Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products“ beschrieben (8). Für Rohstoffe biologischen Ursprungs, wie zum Beispiel Thrombozytenkonzentrate oder rekombinant hergestellte Wachstumsfaktoren, gelten im Besonderen auch die Anforderungen des allgemeinen Kapitels des Europäischen Arzneibuchs „5.2.12 Raw materials of biological origin for the production of cell-based and gene therapy medicinal products“ (63). Für die Herstellung des zellbasierten GTMPs, zur Behandlung der Hämophilie A, sind Rohstoffe verschiedenen Ursprungs, zum Beispiel biologisch oder chemisch, notwendig. Das Zellkulturmedium zur Isolation und Expansion der BOECs setzt sich beispielsweise aus einem Basalmedium und speziell für das Wachstum der BOECs angepasste Supplemente, chemischen und biologischen Ursprungs, zusammen (55, 56). Da das Zellkulturmedium und somit auch alle Supplemente mit den Zellen in Kontakt kommen, muss eine geeignete Qualifizierungsstrategie für alle Mediensupplemente - dies gilt grundsätzlich für alle Rohstoffe, die mit dem Arzneimittel in Berührung kommen - etabliert werden, um die Qualität des Arzneimittels und die Sicherheit für den Patienten zu gewährleisten. Für die Isolierung und Expansion von BOECs wird fetales Kälberserum (FCS) oder ein alternatives Serum oder ein Serumersatzpräparat im Zellkulturmedium benötigt. Diese haben einen starken Einfluss auf die Sicherheit und Qualität der BOECs (63, 64). Im Folgenden werden deshalb beispielhaft die Anforderungen und das Vorgehen bei der Evaluierung dieser, für ein humanes Thrombozytenkonzentrat zum Serumersatz für die ATMP-Herstellung, beschrieben.

2.1.1 Evaluierung der Anforderungen an Rohstoffe für Isolierung und Expansion von BOECs anhand eines Thrombozytenkonzentrates zum Serumersatz

Da es sich bei Thrombozytenkonzentrat um einen biologischen Rohstoff handelt, gelten die Anforderungen, die im allgemeinen Kapitel 5.2.12 des Europäischen Arzneibuchs beschrieben sind. Der GMP-Leitfaden für ATMPs, in dem allgemeine Anforderungen an Rohstoffe beschrieben sind, verweist für Rohstoffe biologischen Ursprungs ebenso auf das Kapitel 5.2.12 (8). Zusätzlich ist der vom Paul-Ehrlich-Institut vertretene Standpunkt bzw. sind besondere Aspekte, zum Beispiel die akzeptierte Höchstmenge von gepoolten Spenden bei Anwendung von Humanseren, durch wissenschaftliche Veröffentlichungen zu verschiedenen Themen bezüglich ATMPs evaluierbar (64-66). Jedoch muss der Einfluss der Rohstoffe, hier des Thrombozytenkonzentrates, auf die Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit des jeweiligen ATMPs, unter Berücksichtigung der spezifischen und bestimmungsgemäßen Verwendung und des individuellen Herstellungsprozesses, anhand eines risikobasierten Ansatzes evaluiert werden (63). Die Anforderungen an das Thrombozytenkonzentrat lassen sich in vier Themengebiete einordnen:

- Herstellung des Rohstoffs durch die Herstellerfirma

- Qualität und Qualitätskontrolle des Rohstoffs durch die Herstellerfirma
- spezifische Anforderungen hinsichtlich Spenderauswahl, Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentraten und Virussicherheit
- Einsatz innerhalb des spezifischen ATMP Herstellungsprozesses

Für diese vier Themengebiete gibt es jeweils Vorgaben, die durch die bereits genannten Richtlinien vorgegeben sind. Diese und gegebenenfalls weitere Anforderungen an den Rohstoff werden innerhalb des risikobasierten Ansatzes definiert, überprüft und bewertet.

2.1.2 Durchführung des risikobasierten Ansatzes am Beispiel eines Thrombozytenkonzentrates zum Serumersatz

Die Durchführung des risikobasierten Ansatzes erfolgte anhand des Dokumententemplates „Risk Assessment, raw materials of biological origin_Thrombozytenkonzentrat“, siehe Anhang. In diesem Dokument werden zunächst folgende grundlegende Informationen abgefragt:

- Einstufung des Rohstoffs
- Hersteller
- Ursprung/Quelle
- Darreichungsform
- Einsatz im Herstellungsprozess
- Kritikalität

Anschließend werden, entsprechend der unter 2.1.1 genannten Themengebiete, die einzelnen Anforderungen an das Thrombozytenkonzentrat definiert und evaluiert. Sind die Anforderungen an den Rohstoff festgelegt, müssen nun die notwendigen Informationen, durch Internetrecherche und durch Anforderung von Daten und Informationen vom Hersteller, beschafft werden. Da dies sehr zeitaufwendig sein kann und Schwierigkeiten hauptsächlich durch Verständnis- und Kommunikationsprobleme zustande kommen, hat sich hier die Anwendung eines Fragebogens, der direkt an den Hersteller des Rohstoffs geschickt wird, bewährt. Im Dokument „Risk Assessment, raw materials of biological origin_Thrombozytenkonzentrat“ wird zwischen Risikoabschätzung und Risikominimierung unterschieden. Die Risikoabschätzung enthält folgende Kapitel:

- aktueller Kenntnisstand entsprechend Herstellerangaben
- Risikoidentifizierung entsprechend dem aktuellen Kenntnisstand
- Risikobewertung

Zunächst werden in die Spalte „Aktueller Kenntnisstand entsprechend Herstellerangaben“ alle verfügbaren Informationen eingetragen. Falls der Hersteller auf ein spezifisches Dokument, z.B. das Zertifikat einer DIN EN ISO 9001 Zertifizierung oder das Analysenzertifikat, verweist, wird der Dokumentenname eingetragen und das Dokument als Anhang beigefügt. Anschließend erfolgt ein Abgleich zwischen den definierten Anforderungen und dem aktuellen Kenntnisstand bzw. den bisher vom Hersteller bereitgestellten Informationen. Hierbei ist zu beachten, dass sich das Gebiet „Einsatz innerhalb des spezifischen ATMP Herstellungsprozesses“ im Vergleich zu den anderen Themengebieten nicht auf die Angaben des Rohstoffherstellers bezieht. Stattdessen werden hier die vom Arzneimittelhersteller entsprechend des Herstellungsprozesses benötigten Informationen sowie erforderliche Dokumente und Verträge mit dem Rohstoffhersteller abgefragt. Basierend auf dem Abgleich des aktuellen Standes und der zuvor definierten Anforderungen werden bestehende Risiken identifiziert, festgehalten und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Qualität, Wirksamkeit und Sicherheit für den Patienten bewertet. Wurden bestimmte Anforderungen nicht erfüllt und ein Risiko identifiziert, müssen Risikominimierungsmaßnahmen getroffen werden. Die Risikominimierung ist aufgliedert in drei aufeinanderfolgende Kapitel:

- durchzuführende Maßnahme
- Wirkung/Versagen der Maßnahme
- neue Maßnahme

Ein Risiko könnte eine Kontamination mit Mykoplasmen darstellen. Mykoplasmen sind die kleinsten bisher identifizierten Bakterien, die auch pathogen für den Menschen sein können. Wird beispielsweise festgestellt, dass der Test auf Mykoplasmen nicht sensitiv genug ist und nicht entsprechend den Anforderungen des Kapitels 2.6.7 des Europäischen Arzneibuchs durchgeführt wird, muss eine Maßnahme durchgeführt werden (67). Durch diese muss das entstandene Sicherheitsrisiko minimiert und eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen weitestgehend ausgeschlossen werden (68). Darauffolgend wird der Einfluss der Maßnahme auf das zuvor festgestellte Risiko bewertet. In genanntem Beispiel wäre die Chargentestung des Rohstoffs nach den Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs, zum Beispiel bei einem dafür spezialisiertem Prüflabor, eine Maßnahme, die zur ausreichenden Minimierung dieses Risikos führt. Wird jedoch festgestellt, dass die Maßnahme noch nicht ausreichend zur Minimierung des Risikos war, muss eine neue Maßnahme definiert werden und der gesamte Prozess neu durchlaufen werden. Vor dem Einsatz des Rohstoffs wird abschließend das klinische Nutzen-Risiko-Verhältnis bewertet. Hier wird anhand der Vorarbeiten entschieden, ob der Rohstoff für einen Einsatz im Herstellungsprozess des Arzneimittels, während einer klinischen Prüfung oder nach Marktzulassung, geeignet ist und die Entscheidung begründet. In Kapitel 3.1 wurde, als Ergebnis der Risikoanalyse, das klinische Nutzen-Risiko-Verhältnis für das Thrombozytenkonzentrat bei

der Verwendung im Herstellungsprozess des zellbasierten GTMPs, für eine zukünftige klinische Prüfung zur Behandlung der Hämophilie A, bewertet und eine positive Entscheidung für dessen Einsatz getroffen.

2.2 BOEC Isolierung, Transduktion, Expansion und Qualitätskontrolle

Der Herstellungsprozess für das zellbasierte GTMP startet mit der Isolierung von BOECs aus peripherem Blut von Patienten mit der schweren Form der Hämophilie A. Die Blutabnahme fand im Krankenhaus „A.O.U Città della salute e della scienza“ in Turin in Italien statt und war durch das Ethikkomitee „Comitato Etico Interaziendale A.O.U. Maggiore della Carità, ASL BI, ASL NO, ASL VCO“ unter dem Protokoll „810/CE, Study n. CE 125/17“ genehmigt. Der Bluttransport, die Isolierung und Transduktion der BOECs wurde durch das Personal vom Department of Health Sciences, Università del Piemonte Orientale „A. Avogadro“ (UPO) in Novara in Italien durchgeführt. Für die Isolierung der BOECs wurde eine Standard Operating Procedure (SOP) entwickelt und diese wurde den Kollegen in UPO bereitgestellt.

2.2.1 BOEC Isolierung und Transduktion in UPO

Die Methode zur Isolierung der BOECs basiert auf dem Protokoll von Ormiston et al. (56) und enthält folgende Prozessschritte:

1. Blutabnahme beim Patienten
2. Verdünnung des Blutes 1:1 mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)
3. Dichtezentrifugation mit Ficoll
4. Sammeln der PBMNCs und des Plasmaüberstands
5. Verdünnung 1:1 mit PBS
6. Zentrifugation und Resuspension der Zellen
7. Aussähen der Zellen in Zellkulturflaschen
8. Auswachsen der BOECs nach ca. sieben bis 14 Tagen mit Zellkulturmedium

Im Gegensatz zum Protokoll von Ormiston et al. wurden die Zellen sieben Tage nach initialer Isolation der PBMNCs passagiert. Die Ziele waren die Verkürzung der Wachstumszeit und die Erhöhung der finalen Zellausbeute (53). Das weiterentwickelte Verfahren wurde in einer GMP-konformen SOP abgebildet. Nach Isolierung und kurzer initialer Expansion wurden die BOECs ebenfalls von Mitarbeitern von UPO mit einem lentiviralen Vektor transduziert. Der Vektor trägt die „B domain-deleted“ Variante des humanen Gerinnungsfaktors VIII unter der Kontrolle des „Vascular Endothelial Cadherin“ Promoters und es wurde mit einer MOI (Multiplicity Of Infection) von 20 transduziert (17,

59). Anschließend wurden die transduzierten BOECs (tHA-BOECs), die nun den Gerinnungsfaktor VIII produzieren, auf Trockeneis zum Universitätsklinikum in Würzburg geschickt. Alle Transporte, bei denen Zellen verschickt wurden, waren durch Anwendung eines Datenloggers temperaturkontrolliert.

2.2.2 Expansion von BOECs

Die tHA-BOECs wurden nach Transport von UPO nach Würzburg bis zur weiteren Verwendung in Kryovials in einem Stickstofftank gelagert. Die Zellkultur der BOECs bestand anschließend aus den standardisierten Prozessen Auftauen, Expansion und Einfrieren der Zellen entsprechend dem Protokoll von Ormiston et al. (56). Zur Dokumentation aller relevanten Daten und Informationen wurden Herstellungsprotokolle erstellt, die folgende Informationen beinhalten bzw. abfragen:

- Dokumentenkopf mit Dokumenten ID und Versionsnummer
- Organisationszeile mit Abfrage von:
 - Raum
 - Datum
 - Start- und Endzeit
 - Operator und Experimentennummer
- Donor ID
- Reagenzien und Verbrauchsmaterialien mit leeren Feldern zur Eintragung der Chargennummern
- Zellkulturprozessschritte
- Zellzählung und darauffolgende Zellkulturprozessschritte
- Lagerung bzw. Verbleib der Zellen
- Ankreuzfelder zur Bestätigung der Dokumentation
- Unterschriftenfelder und Dokumentennachverfolgung

Für die Zellzählung wurde der Countess Automated Cell Counter (Invitrogen) mit der Protokolleinstellung „ALLGEMEIN“ verwendet. Nach dem Auftauen oder nach der Expansion der Zellen wurden diese nach der Zellzählung in Cellcoat Collagen Type 1 Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One) ausgesät. Für das Passagieren bzw. die Expansion der Zellen wurde die Zelloberfläche zuerst mit PBS (Sigma Aldrich) gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellschicht mit TrypLE Select 1x (Gibco). Zum Einfrieren der Zellen wurden Cryo-SFM Medium (PromoCell) und 1,5 ml Cryo Tubes (TPP) verwendet. Die Zellzählung ist hier besonders hervorzuheben, da sowohl die Bestimmung des Alters als auch der Viabilität der Zellen nach dem Auftauen anhand der hier ermittelten Zellzahlen erfolgt. Deshalb werden bei jeder Zellzählung drei unabhängige Stichproben der Zellsuspension gezählt und insgesamt drei Populationsverdopplungen (Population Doublings = PDs) und Proliferationsraten

(Population Doubling Time = PDT) berechnet, aus denen anschließend der Mittelwert gebildet wird. Die Zellzählung erfolgte mithilfe des Countess Automated Cell Counters (Invitrogen) der, neben der Zellzahl, auch die Viabilität der Zellen bestimmt. Abschließend wurde durch die Anzahl an gezählten und lebenden Zellen das Alter, entsprechend den PDs, die PDT und gegebenenfalls die Viabilität der Zellen nach dem Auftauen mit folgenden Formeln berechnet (69, 70):

- Berechnung PD:

$$PD_{t2} = 3,32 \times (\log N_{t2} - \log N_{t1}) + PD_{t1}$$

PD_{t2} = Population Doublings der Zellen nach der Expansion

N_{t2} = Zellzahl nach der Expansion

N_{t1} = Ausgangszellzahl beim Aussähen der Zellen

PD_{t1} = Population Doublings der Zellen beim Aussähen der Zellen (Ausgangs-PD)

- Berechnung PDT:

$$PDT_{Exp(t)} = t / (3,32 \times (\log N_{t2} - \log N_{t1}))$$

$PDT_{Exp(t)}$ = Proliferationsrate der Zellen während der Expansionszeit t

t = Expansionszeit der Zellen in Tagen

N_{t2} = Zellzahl nach der Expansion

N_{t1} = Ausgangszellzahl beim Aussähen der Zellen

- Berechnung Viabilität nach dem Auftauen:

$$\text{Viabilität(\%)} = N_{t1} / N_{t2} \times 100$$

N_{t1} = Zellzahl beim Einfrieren

N_{t2} = Zellzahl beim Auftauen

Der initiale Wert für N_{t1} bei der Berechnung der PDs der BOECs wurde anhand der Anzahl der gezählten Zellkolonien, während des Auswachsens der Zellen mit Zellkulturmedium, bestimmt. Hier wird davon ausgegangen, dass jede Zellkolonie letztendlich aus einer einzigen Zelle entstanden ist. Dieser Schritt ist wichtig, um die Berechnung der PDs und der PDT der BOECs zu vereinheitlichen und zu standardisieren. So kann ein geeigneter PD- und PDT-Bereich für einen potentiellen klinischen Einsatz definiert werden. Die Definition eines Bereiches ist nötig, da das Wachstumsverhalten von BOECs unter anderem stark vom jeweiligen Zellspender abhängt (55, 56).

2.2.3 Qualitätskontrolle von BOECs

Vor der Anwendung von tHA-BOECs in einer präklinischen Studie und vor allem auch in einer potentiellen klinischen Prüfung, ist die Durchführung einer ausführlichen und geeigneten

Qualitätskontrolle nötig. Erst nach der Durchführung aller vorgegebener Freigabetests und nach der Bewertung der Ergebnisse, kann das Produkt für das geplante Vorhaben freigegeben werden. Hierbei gibt es einerseits, z.B. vom Europäischen Arzneibuch, vorgeschriebene Freigabetest für aseptisch hergestellte Arzneimittel, wie zum Beispiel der Test auf Mykoplasmakontaminationen nach der Monographie 2.6.7 (67). Andererseits gehören hierzu auch individuell für das jeweilige ATMP entwickelte und definierte Freigabekontrollen. Diese sollen anhand eines risikobasierten Ansatzes festgelegt werden, um so genau auf die für das spezifische ATMP geltenden Bedingungen eingehen zu können (8, 10). Tabelle 2 zeigt die nach der Expansion der BOECs durchgeführte Qualitätskontrolle. Enthalten sind hier die Qualitätskriterien, die Beschreibungen des experimentellen Designs und die zu den Qualitätskriterien gehörenden Spezifikationen. Die Qualitätskontrolle beinhaltet Tests, die sowohl vor dem Kryokonservieren als auch nach dem Wiederauftauen einer Stichprobe der tHA-BOECs durchgeführt werden. Die Stichprobe aus der Gesamtheit der kryokonservierten tHA-BOECs am Ende der Expansion wurde als Qualitätskontroll-Vial (QC-Vial) bezeichnet. Dieses enthält die gleiche Charge an Zellen, die für die präklinischen Studien eingesetzt werden sollen.

Tabelle 2 Qualitätskontrollstrategie für die expandierten tHA-BOECs.

Qualitätskriterium	Experimentelles Design	Spezifikation
Identität	Visuelle mikroskopische Betrachtung der Zellen in einer Zellkulturflasche von einer Stichprobe eines QC-Vials: <ul style="list-style-type: none"> ➔ Betrachtung von drei verschiedenen Positionen (oben, mittig und unten) in der Zellkulturflasche ➔ Vergleich mit einer Referenz 	Endothelzellspezifische Pflastersteinmorphologie
Reinheit	Analyse der Zellmarkerexpression mittels Durchflusszytometrie von einer Stichprobe eines QC-Vials.	CD31+: $\geq 95,0\%$ CD144+: $\geq 95,0\%$ CD45-: $\leq 10,0\%$
Menge und Alter	Zellzählung mit einem automatisierten Zellzähler und Berechnung der PDs und der PDT während der Expansion und beim finalen Kryokonservierungsschritt: <ul style="list-style-type: none"> ➔ Drei individuelle Stichproben der Zellsuspension für jeden Expansions- und Kryokonservierungsschritt 	PD-Bereich: 30,00-40,00 PDs PDT-Bereich: 1,00-3,00 Tage Menge: $\geq 30,00 \times 10^6$
Mikrobiologische Sicherheit	Wachstumsbasierte mikroskopische Kontrolle auf Bakterien und Pilze nach sieben Tagen Kultivierungsdauer für eine Stichprobe eines QC-Vials in einer Zellkulturflasche: <ul style="list-style-type: none"> ➔ Betrachtung von drei verschiedenen Positionen 	Abwesenheit von Bakterien und Pilzen

	<p>(oben, mittig und unten) in der Zellkulturflasche</p> <p>➔ Vergleich mit einer Referenz</p> <p>Da das Zellkulturmedium keine Antibiotika enthält, sind mikrobiologische Kontaminationen im Medium schnell erkennbar.</p>	
Mykoplasmafreiheit	<p>Anwendung des Venor® GeM OneStep Mykoplasma Detection Kits (Minerva Biolabs) nach Herstellerangaben:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Testung des Zellkulturmediumüberstands mit Zellen aus einer Stichprobe eines QC-Vials • Anwendung des PCR-basierten Analyseverfahrens des Kitsystems und Bestätigung der Abwesenheit von Mykoplasma DNA durch negatives Signal im Agarosegel 	Nachweis von Mykoplasma-DNA negativ
Endotoxinfreiheit	<p>Prüfung auf Bakterien-Endotoxine durch Anwendung des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests (LAL-Test). Durchgeführt wird die kinetisch-turbidimetrische Methode (Methode C der Monographie 2.6.14 des Europäischen Arzneibuchs (71)) durch ein Expertenlabor. Testung des Zellkulturmediumüberstands mit Zellen aus einer Zellkulturflasche von einer Stichprobe eines QC-Vials.</p>	Endotoxinlevel ≤ 1 IU/ml
Viabilität nach dem Auftauen	<p>Zellzählung mit einem automatisierten Zellzähler und Berechnung der Viabilität der Zellen nach dem Auftauen eines QC-Vials:</p> <p>➔ Drei individuelle Stichproben der Zellsuspension nach dem Auftauen der Zellen</p>	Viabilität $\geq 70\%$

Für die Durchführung der Analyse der Zellmarkerexpression der tHA-BOECs wurden die Zellen zuerst mithilfe von TrypLE Select 1x von der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend mit Staining-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit Staining-Puffer, bestehend aus PBS, FCS 0,5% (Bio&SELL) und NaN₃ (Carl Roth), und den Antikörpern (siehe Tabelle 3) für 30 Minuten inkubiert. Für jede Probe wurden $1,5 \times 10^5$ Live Events mit einem BD FACSCalibur (BD Biosciences) aufgenommen. Die Datenauswertung wurde mit der BD FACStation Software Version 6.0 (BD Biosciences) durchgeführt.

Tabelle 3 Übersicht und Informationen zu verwendeten Antikörpern für die Analyse der Zellmarkerexpression mittels Durchflusszytometrie.

Antikörper	Hersteller	Antikörper-Konjugat	Klon	Erläuterung
CD31	ImmunoTools	APC	MEM-05	PECAM1 (=CD31) ist ein Zelladhäsionsmolekül und wird von Endothelzellen exprimiert.
CD144	Miltenyi Biotech	PE	REA199	VE cadherin (=CD144) ist ein Zelladhäsionsmolekül und wird von Endothelzellen exprimiert.
CD45	Miltenyi Biotech	PE	5B1	Leukocyte common antigen (=CD45) ist ein Leukozytenmarker und wird nicht von Endothelzellen exprimiert.

Weitere durch den Kooperationspartner UPO durchgeführte Qualitätskontrollen, die nicht Teil dieser Arbeit sind, aber wichtige Tests für die Sicherheit und Wirksamkeit der tHA-BOECs darstellen, waren:

- die Bestimmung der pro Zelle integrierten lentiviralen Kopien
- der Nachweis der Abwesenheit des HIV-1 p24 Proteins
- die Expression von FVIII mittels activated Partial Thromboplastin Time (aPPT)-Assay

Für die Freigabetests in UPO und in Würzburg wurde dieselbe Charge an kryokonservierten Zellen benutzt, um sicherzustellen, dass alle getesteten BOECs innerhalb des definierten PD-Bereichs liegen.

2.3 Entwicklung, Validierung und Anwendung der qPCR-Methode zur Untersuchung der Biodistribution

Bei der Entwicklung einer qPCR-basierten Methode sind zu Beginn die Auswahl der Primersequenzen und die Auswahl der SONDENSEQUENZ entscheidend, da diese einen direkten Einfluss auf die Sensitivität und Selektivität der Methode haben (12, 26, 28). Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und der Hydrolyse-Sonde der hier verwendeten qPCR, inklusive Farbstoff und Quencher sind in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4 Nukleotidsequenzen und Zusammensetzung der Primer und der Hydrolyse-Sonde.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Farbstoff und Quencher
Vorwärtsprimer	5'-TGGTGGCTCTCTCCTGTAAT-3'	

Rückwärtsprimer	5'-GATCTCGGCTCACTGCAA-3'	
Hydrolyse-Sonde	5'- TGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACC -3'	Carboxyfluorescein (FAM) am 5' Ende Eclipse Quencher (Eurofins Genomics) angehängt an das Minor Groove Binder (MGB) Molekül am 3' Ende

Die Nukleotidsequenzen der Primer und die Zusammensetzung der Hydrolyse-Sonde basieren auf den Vorarbeiten von Creane et al. (35). Die Primer und die Hydrolyse-Sonde wurden von Eurofins Genomics synthetisiert und aufgereinigt. Diese wurden sowohl für die Entwicklung und Validierung der qPCR-Methode als auch für die Analyse der Studienproben für die Biodistributionsstudie eingesetzt. Die Aufreinigung der Primer wurde mit dem HPSF Verfahren, eine Trademark der Firma Eurofins Genomics, durchgeführt. HPSF steht für High-Purity, Salt-Free und stellt einen säulenbasierten Aufreinigungsprozess dar (72). Die Hydrolyse-Sonde wurde durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC) aufgereinigt. Alle weiteren für die Entwicklung, Validierung und Durchführung der qPCR-Methode benötigten Verbrauchsmaterialien, Geräte und Reagenzien sind zur Übersichtlichkeit in Tabelle 5 aufgelistet. Genannt sind der Hersteller, der Aufbau der Chargenbezeichnung für selbsthergestellte Reagenzien oder Verdünnungen – dieser entspricht der späteren Bezeichnung in den Datenpräsentationen in den folgenden Kapiteln – und falls erforderlich eine Erklärung, in welchen Prozessschritten diese eingesetzt wurden bzw. das allgemeine Einsatzgebiet. Für die während der Biodistributionsstudie, der qPCR-Methodenentwicklung und der qPCR-Methodenvalidierung angewendeten Verbrauchsmaterialien und Reagenzien ist grundsätzlich wichtig, dass diese frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen sind (32).

Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Reagenzien für die Entwicklung, Validierung und Durchführung der qPCR-Methode.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Einsatzgebiet
Pipette filter tips (10, 100 und 1.000 µl) Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Nerbe plus	
DNA LoBind Tubes 1.5 ml Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Eppendorf	Pipettieren und Lagerung: DNA-Lösungen, Primer, Hydrolyse-Sonde, Referenzstandard, Standardsamples, System-

		Suitability-Kontrolle und Studienproben für die Biodistributionsstudie
Protein LoBind Tubes 5.0 ml Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Eppendorf	Pipettieren und Lagerung von Lösungen mit Volumina > 1,5ml
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Roche Diagnostics	
LightCycler® 480 Sealing Foil Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Roche Diagnostics	
Geräte	Hersteller	Einsatzgebiet
Eppendorf pipettes „Research Plus“ (10, 100 und 1.000 µl)	Eppendorf	
LightCycler® 480 Instrument II	Roche Diagnostics	qPCR-Cycler für die Durchführung der qPCR, Gerätequalifizierung vorhanden
Zentrifuge 5415R	Eppendorf	Zentrifugieren: DNA-Lösungen, Primer, Hydrolyse-Sonde, Referenzstandard, Standardsamples, System-Suitability-Kontrolle und Studienproben für die Biodistributionsstudie vor Anwendung
Mediline Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr	Lagerung: LightCycler® 480 Probes Master, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Vorwärts- und Rückwärtsprimer, Hydrolyse-Sonde, DNA Lösungen vor finaler Konzentrationseinstellung, lyophilisierte Organe
Mediline Kühlschrank (2-8°C)	Liebherr	Lagerung: Mouse genomic DNA, Human genomic DNA, Referenzstandard, Standardsamples, System-Suitability-Kontrolle und Studienproben für die Biodistributionsstudie

Secuflow Tischabzug	Scala Labor-einrichtung	Durchführung aller Pipettieraufgaben
PerfectBlue Gelsystem Midi	Peqlab	Durchführung Gelelektrophorese
Electrophoresis Powerstation	Peqlab	
Transilluminator	Vilber Lourmat	Durchführung Gelelektrophorese
Captair Bio PCR Werkbank	Erlab group	Probenvorbereitung Gelelektrophorese
Reagenzien	Hersteller	Chargenbezeichnung und Einsatzgebiet
DNA away	Molecular BioProducts	Reinigung aller relevanter Oberflächen von DNA-Kontaminationen
Water, PCR grade Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Roche Diagnostics	Herstellung: Arbeitskonzentrationen/Verdünnungen Primer, Mastermix
LightCycler® 480 Probes Master (FastStart <i>Taq</i> DNA Polymerase, Reaction buffer, dNTP und dUTP, 6,4 mM MgCl ₂) Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Roche Diagnostics	Herstellung: Mastermix Erläuterung: Standardsupermix für alle qPCR-Methoden, die auf Hydrolyse-Sonden basieren
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Roche Diagnostics	Mastermix für die Durchführung von Schmelzkurvenanalysen
Vorwärtsprimer 10 pmol/μl (Arbeitskonzentration)	Eigenherstellung	Abkürzung und Datum der Herstellung: hAlu fwd Jahr.Monat.Tag Abkürzung und Datum der Herstellung:
Rückwärtsprimer 10 pmol/μl (Arbeitskonzentration)	Eigenherstellung	hAlu rev Jahr.Monat.Tag Verdünnung der Primer für die Durchführung der qPCR-Experimente
Hydrolyse-Sonde 10 pmol/μl (Arbeitskonzentration)	Eigenherstellung	Abkürzung und Datum der Herstellung: hAlu probe Jahr.Monat.Tag Verdünnung der Hydrolyse-Sonde für die Durchführung der qPCR-Experimente
TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM disodium	Eurofins Genomics	Herstellung: Hydrolyse-Sonde (Arbeitskonzentration)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8.0) Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen		
Tris-EDTA buffer solution (TE-Puffer) (10 mM Tris-HCl, 1 mM disodium EDTA, pH 8.0) Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Sigma Aldrich	Nichtzielkontrolle für qPCR-Analysen, Herstellung: Referenzstandard, Standardsamples, System-Suitability-Kontrolle und Studienproben für die Biodistributionsstudie
Mouse genomic DNA	Novagen	Referenzmaterial für die Herstellung: Referenzstandards und Backgroundkontrolle
Human genomic DNA	Novagen	Referenzmaterial für die Herstellung: Referenzstandard und Standardsamples
Standardsamples	Eigenherstellung	Abkürzung und Datum der Herstellung: (STD) hgDNA, STD10E1-STD10E6 Jahr.Monat.Tag Erstellung der Kalibrationskurve (nur Methodenentwicklung)
Referenzstandard	Eigenherstellung	Abkürzung und Datum der Herstellung: (Ref) hgDNA, Ref10E1-Ref10E6 Jahr.Monat.Tag Erstellung der Kalibrationskurve, Kontrollproben für alle qPCR-Analysen, Einsatz zur Bestimmung der Validierungsparameter
Backgroundkontrolle	Eigenherstellung	Abkürzung und Datum der Herstellung: (Ref) mgDNA Jahr.Monat.Tag Backgroundkontrolle für qPCR-Analysen, Bestimmung des Quantifizierungslimits
Studienproben für die Biodistributionsstudie (Biodistributionsproben)	Eigenherstellung	Bezeichnung der Maus (M1-M15) und des Organs Durchführung der Biodistributionsstudie
System-Suitability-Kontrolle (SSC)	Eigenherstellung	Abkürzung und laufende Nummer SSC1-10 Interne Kontrolle für die Systemtauglichkeit: Biodistributionsstudie und Methodenvalidierung

GelRed® 10.000x in water	Genaxxon bioscience	Sichtbarmachung der DNA-Banden nach Gelelektrophorese mittels UV-Licht
Biozym LE Agarose	Biozym	Herstellung Agarosegel für Gelelektrophorese
PeqGOLD 100 BP DNA Ladder Plus	Peqlab	Kontroll-DNA für Gelelektrophorese
Loading buffer 6x Zertifiziert frei von DNAsen und DNA-Kontaminationen	Peqlab	Verdünnungspuffer für Gelelektrophorese
1x TAE-(TRIS-Acetat-EDTA)Puffer	Eigenherstellung	Lösen der Agarose und Füllen der Kammer für die Gelelektrophorese

Für die qPCR-Methode ist zunächst die Erstellung einer Kalibrationskurve notwendig, anhand derer die Konzentration von Proben mit unbekannter Konzentration bestimmt wird. Durchgeführt wird hierbei eine sogenannte absolute Quantifizierung. Auf der x-Achse der Kalibrationskurve sind die logarithmischen initialen Zielkonzentrationen der Referenzstandards bzw. der Standardsamples gegen die gemessenen Quantification Cycle (Cq)-Werte auf der y-Achse aufgetragen. Demzufolge ist die Herstellung der Standardsamples und vor allem die der Referenzstandards von besonderer Bedeutung, da beispielsweise der Referenzstandard mit der niedrigsten Konzentration (Ref10E6) für die Bestimmung des Quantifizierungslimits der Methode eingesetzt wird. Entsprechend Tabelle 5 wurde für die Herstellung der Referenzstandards kommerziell erhältliche humane genomische DNA als Referenzmaterial verwendet. Diese wurde aus humanem Vollblut gewonnen und war frei von kontaminierenden DNAsen. Die Reinheit der hgDNA-Lösung wurde durch Bestimmung des A260 / A280 nm Absorptionsverhältnisses nachgewiesen, die Akzeptanzkriterien hierfür waren Werte zwischen 1,70 und 1,95. Des Weiteren mussten mehr als 90% der hgDNA-Anteile größer als 100 Kilobasenpaare (kbp) sein und es durfte keine Inhibition durch Restriktionsenzyme auftreten. Die Genauigkeit der Konzentrationsangabe lag bei $\pm 10\%$. Die hierfür angewendeten Methoden sind im Analysezertifikat des Herstellers beschrieben. Tabelle 6 zeigt detailliert die Herstellung der Referenzstandards, Ref mgDNA, Ref hgDNA und Ref10E1-Ref10E6. Das Prinzip bei der Herstellung der Referenzstandards ist eine 1 zu 10 Verdünnungsreihe berechnet auf Genomebene, d.h. haploiden humanen Genomen zu haploiden murinen Genomen. Die Herstellung der Standardsamples erfolgte analog zur Herstellung der Referenzstandards mit dem Unterschied, dass zum Verdünnen der hgDNA TE-Puffer anstatt mgDNA eingesetzt wurde. Die Standardsamples STD hgDNA und STD10E1-STD10E6 wurden ausschließlich während der frühen Methodenentwicklung angewendet. Alle anderen Kalibrationskurven für die Methodvalidierung und für die Analyse der Biodistributionsproben wurden durch Anwendung der Referenzstandards erstellt.

Für die Herstellung der SSC zur Überprüfung der Systemtauglichkeit wurden Stichproben der Leber und des Hirns von der Biodistributionskontrollmaus M6 mit tHA-BOECs gespikt. Das Verhältnis von humanen zu murinen Genomen wurde auf 1:1000, entsprechend dem Referenzstandard Ref10E3, berechnet und eingestellt. Hierfür wurden pro Ansatz 2,5 mg gefriergetrocknetes Organpulver mit einer definierten Menge an tHA-BOECs gespikt. Da in den Leberzellen der Maus nicht nur diploide Zellen vorkommen, wurde zur Einstellung des Genomverhältnisses das Organpulver der Leber mit 36,5 Zellen gespikt (73). Diese Polyploidie ist beim Hirn nicht vorhanden und deshalb wurde dieses Organpulver mit 13,1 Zellen gespikt.

Tabelle 6 Herstellung der Referenzstandards durch serielle Verdünnung von hgDNA mit mgDNA.

Referenzstandard	μl hgDNA ^a Lösung (100 ng/ μl) [μl]	Verdünnungsfaktor (mit TE-Puffer)	Humane Genome/ μl	μl mgDNA ^b Lösung (97,64 ng/ μl) [μl]	Humane Genome/ μl im Referenzstandard	Gesamtheit an humanen Genomen im Referenzstandard	Gesamtheit an murinen Genomen im Referenzstandard	Faktor
(Ref) hgDNA	20	undiluted	2,76E+04	0	2,76E+04	5,53E+05	0	/
Ref10E1	2	undiluted	2,76E+04	18	2,76E+03	5,53E+04	5,53E+05	0,100003
Ref10E2	2	1 to 10	2,76E+03	18	2,76E+02	5,53E+03	5,53E+05	0,010000
Ref10E3	2	1 to 100	2,76E+02	18	2,76E+01	5,53E+02	5,53E+05	0,001000
Ref10E4	2	1 to 1000	2,76E+01	18	2,76E+00	5,53E+01	5,53E+05	0,000100
Ref10E5	2	1 to 10000	2,76E+00	18	2,76E-01	5,53E+00	5,53E+05	0,000010
Ref10E6	2	1 to 100000	2,76E-01	18	2,76E-02	5,53E-01	5,53E+05	0,000001
(Ref) mgDNA	0			18			5,53E+05	

^aFür die Berechnungen wurde für die Größe eines haploiden humanen Genoms ein Wert von 3,30E+09 Basenpaare und für das Gewicht eines Basenpaares ein Wert von 1,10E-15 μg verwendet. ^bDer angewendete Wert für die Größe eines haploiden murinen Genoms war 2,90E+09 Basenpaare.

2.3.1 Methodenentwicklung und Robustheitstest

In der von Creane et al. (35) veröffentlichten Arbeit waren zwar die Sequenzen der Primer und der Hydrolyse-Sonde veröffentlicht, nicht aber das vollständige qPCR-Protokoll. Fehlende wichtige Informationen waren die genaue Zusammensetzung des Mastermixes, d.h. die Konzentration der Primer und der Hydrolyse-Sonde, die Magnesiumkonzentration und die Identität, Effizienz und Konzentration der Polymerase. Außerdem war nicht angegeben, ob z.B. ein fertiger, kommerziell erhältlicher Reaktionsmix eingesetzt wurde oder ob die Polymerase selbst synthetisiert wurde. Folglich wurde zunächst eine Methodenentwicklung in Verbindung mit Untersuchungen zur Robustheit der Methode durchgeführt. Die Ziele waren die Definition der optimalen Reaktionsbedingungen, in Verbindung mit dem Erreichen des in Kapitel 1.5 beschriebenen Quantifizierungslimits, sowie die Untersuchung tolerierbarer Abweichungen von diesen, sodass die Methode immer noch die geforderten Ergebnisse liefert. Der daraufhin definierte Methodenentwicklungsplan beinhaltet die Untersuchung der in Tabelle 7 gezeigten Parameter hinsichtlich deren Einfluss auf die qPCR-Performance. Angegeben ist zusätzlich die zeitliche Reihenfolge in der die Parameter untersucht wurden, der Ausgangswert des Parameters und der Untersuchungsbereich.

Tabelle 7 Parameter für die Entwicklung und Robustheitsuntersuchung der qPCR-Methode.

Reihenfolge	Parameter	Ausgangswert	Untersuchungsbereich
1.	Annealingtemperatur	60°C	60°C – 64°C
2.	Primerkonzentration	500 nM	250 nM – 1000 nM
3.	Hydrolyse-Sondenkonzentration	150 nM	50 nM – 250 nM
4.	Elongationszeit	30 Sek.	10 Sek. – 30 Sek.

Die Methodenentwicklung wurde mit dem initialen qPCR-Protokoll gestartet. Dieses beinhaltet die in Tabelle 8 gezeigten Startparameter und die initiale Zusammensetzung des Mastermixes.

Tabelle 8 Initiales qPCR-Protokoll und Zusammensetzung des Mastermixes.

qPCR-Protokoll	Zeit	Temperatur	Mastermix	Konzentration
Preinkubation	2 Min.	50°C	hAlu fwd/rev	400 nM / 500 nM
Initiale Denaturierung	5 Min.	95°C	hAlu probe	150 nM
Denaturierung	10 Sek.	95°C	DNA-Template	1 µl einer 100 ng/µL Lösung

Amplifikation/Annealing	30 Sek.	60°C	Gesamtvolumen	20 µl/Reaktion (aufgefüllt mit q-PCR-Wasser)
Abkühlung	10 Sek.	40°C	Volumen LightCycler® 480 Probes Master	10 µl/Reaktion
Anzahl Denaturierungs- und Amplifikationszyklen (qPCR-Zyklen)	40			

Die optimale Primerkonzentration ist die niedrigste Konzentration, die zu dem niedrigsten C_q-Wert und einem adäquaten Fluoreszenzsignal führt. Diese sollte bei Anwendung des LightCycler® 480 Probes Master im Bereich von 0,3 bis 1 µM liegen und die damit verbundene Startkonzentration am besten bei 0,5 µM (74). Bei der Benutzung des LightCycler® 480 Probes Masters sind außerdem Hydrolyse-Sondenkonzentrationen von 50 nM bis 200 nM anwendbar bzw. empfohlen. Die optimale Hydrolyse-Sondenkonzentration ist analog zur Primerkonzentration die niedrigste Konzentration, die zu dem niedrigsten C_q-Wert und einem adäquaten Fluoreszenzsignal führt (75). Des Weiteren muss hier der potentielle Einfluss auf die Sensitivität der Methode überprüft werden. Vor der Herstellung des Mastermixes wurden die in Tabelle 9 beschriebenen Vorbereitungsmaßnahmen durchgeführt. Anschließend konnte der Mastermix vorbereitet werden und die weiteren Pipettierschritte, ebenfalls wie in Tabelle 9 beschrieben, ausgeführt werden.

Tabelle 9 Vorbereitungsmaßnahmen und Pipettierschema für die Durchführung der qPCR-Experimente während der Methodenentwicklung.

Vorbereitungsmaßnahmen und Pipettierschema	
Reihenfolge	Vorbereitungsschritte
1.	Säuberung aller relevanter Arbeitsflächen, Geräte und Materialien mit DNA away.
2.	Auftauen aller bei -20°C gelagerter Reagenzien und Konditionierung auf Raumtemperatur; lichtgeschütztes Auftauen der hAlu probe (Sonde).
3.	Programmierung des Experiments mit der LightCycler® 480 Software.
4.	Beschriften der LoBind Tubes 1.5 ml mit der entsprechenden Probenbezeichnung.
5.	Zentrifugieren aller Reagenzien durch Verwendung der Pulse-Funktion für 5 Sek.
6.	Homogenisierung aller Reagenzien (entspricht mindestens fünfmal auf und ab pipettieren).
Reihenfolge	Pipettierschritte

1.	Mastermixvorbereitung für die Anzahl der Wells plus zusätzlich der Menge für fünf weitere Wells und Erhöhung des Gesamtvolumens um 15% aufgrund von Pipettierverlusten durch die Viskosität des Supermixes.
2.	Homogenisierung des Mastermixes und Lagerung auf Eis und vor Licht geschützt.
3.	Aufteilen des Mastermixes in die LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, 19 µl/Well.
4.	Homogenisierung der Stichproben (DNA-Template).
5.	Hinzufügen von 1 µl Stichprobe in das entsprechende Well der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96.
6.	Verschließen der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 mit der LightCycler® 480 Sealing Foil.
7.	Einbringen der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 in den qPCR-Cycler.
8.	Starten des Experiments mit dem zuvor definierten Programm der LightCycler® 480 Software.

Für die Programmierung, Durchführung und Auswertung der qPCR-Experimente wurde die LightCycler® 480 Software Version 1.5.1.62 (Roche Diagnostics) des LightCycler® 480 Instrument II angewendet. Das Detektionsformat war „Mono Color Hydrolysis Probe / UPL Probe“. Weitere Einstellungen waren „FAM (465-510)“, „Color Compensation Off“ und der Modus „High Confidence“. Die Auswertung bzw. die Bestimmung der Cq-Werte und der Konzentrationen wurde mit der „Absolute Quantification/Second Derivative Maximum“ Methode durchgeführt. Der Vorteil bei dieser Methode ist, dass nur sehr wenige Einstellungen durch den Benutzer festgelegt werden müssen, da diese automatisch vom qPCR-Cycler übernommen werden. So ist eine standardisierte Auswertung möglich und es müssen beispielsweise keine Grenzkonzentrationen oder Basislinien manuell festgelegt werden, wie dies bei der Anwendung der „Fit Points“ Methode nötig ist (76). Abschließend erfolgt eine numerische und grafische Auswertung der Cq- bzw. Konzentrationswerte wie in Kapitel 3.3.1 gezeigt. Zunächst wurden während der Methodenentwicklung die Standardsamples zum Erstellen der Kalibrationskurve (STD hgDNA, STD10E1-STD10E6) benutzt, um die Konzentration der Referenzstandards (Ref hgDNA, Ref10E1-Ref10E6) zu berechnen. Dieser Versuchsaufbau diente der Ermittlung der Unterschiede zwischen der Verdünnung von hgDNA in TE-Puffer oder mgDNA, und folglich der Ermittlung des Einflusses der mgDNA auf die qPCR-Performance. Für die Beurteilung der Eignung der Kalibrationskurve wurden zu Beginn die in Tabelle 10 gezeigten Parameter und die dazugehörigen Spezifikationen festgelegt.

Tabelle 10 Parameter zur Überprüfung der Eignung der Kalibrationskurve.

Parameter	Spezifikationen
Fehlerwert	< 0,2000
Effizienz (%)	90,0 – 110,0%
Geradensteigung	-3,100 – -3,580
Y-Intercept	Wird nur berichtet, Beobachtung zur Trendanalyse

Der Fehlerwert stellt den mittleren quadratischen Fehler des einzelnen Datenpunktes, angepasst an die Regressionsgerade, dar und ist ein Messwert für die Genauigkeit der Quantifizierungsergebnisse. Die Steigung der Kalibrationskurve (=Geradensteigung) beschreibt die Kinetik der PCR-Amplifikation und zeigt an, wie schnell sich die Menge der DNA-Zielsequenz erwartungsgemäß pro qPCR-Zyklus erhöht. Folglich bestimmt die Steigung der Kalibrationskurve die Effizienz, die sehr konstant und zwischen 90,0% und 110,0% liegen muss, um sehr gut reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Zusätzlich ist der Y-Intercept, der den Cq-Wert für die Log-Konzentration von Null angibt, gezeigt. Dieser wird aber nur aufgrund der Vollständigkeit berichtet und es sind keine Spezifikationen festgelegt (31). Die Entscheidung, ob für die Untersuchung der in Tabelle 7 beschriebenen Parameter weitere Experimente notwendig sind und in welchem Ausmaß, wurde jeweils direkt nach Durchführung eines Experiments innerhalb des definierten Untersuchungsbereichs entschieden. So wurde die Notwendigkeit weiterer Experimente direkt nach Auswertung der Daten des vorgeschalteten Experiments bewertet. Dieses Vorgehen bei der Entwicklung der qPCR-Methode führte zur Definition von wichtigen und zusätzlichen Robustheitsparametern (siehe Tabelle 11). In dieser Tabelle sind die Reihenfolge der Durchführung, eine kurze Beschreibung der Durchführung und gegebenenfalls der Untersuchungsbereich angegeben. Als Beispiel ist hier die Anwendung eines neuen Pipettierschemas während der Durchführung der Proof-of-Concept-Experimente zu nennen. Nach der Durchführung von Wiederholungsexperiment 2 wurde anschließend nur noch das Pipettierschema aus dem finalen qPCR-Protokoll angewendet, siehe Kapitel 2.3.2 und 3.3.1.

Tabelle 11 Zusätzliche Robustheitsparameter für die Entwicklung der qPCR-Methode, definiert aufgrund der zuvor durchgeführten Experimente.

Reihenfolge	Parameter	Durchführung/Untersuchungsbereich
1.	Reproduzierbarkeit und Proof-of-Concept	Wiederholungsexperimente zur Definition der finalen Zusammensetzung des Mastermixes und des finalen qPCR-Protokolls mit Variation der eingesetzten Reagenzienchargen und der Operatoren.

2.	TE-Puffer bzw. EDTA Einfluss auf die qPCR-Performance	Anwendung verschiedener Konzentrationen an TE-Puffer bei der Herstellung des Mastermixes: <ul style="list-style-type: none"> • Ausgangskonzentration an TE-Puffer: 5,5% (H₂O) • Doppelte Konzentration an TE-Puffer: 10,5% (1 µl TE) • Maximale Konzentration an TE-Puffer: 42,0% (TE)
3.	Wiederfindungsrate	Herstellung und Anwendung der SSC und Untersuchung der Wiederfindungsrate nach Anspiken von Organpulver mit tHA-BOECs.
4.	Hydrolyse-Sondenstabilität	Durchführung einer qPCR-Analyse nach zweistündiger maximaler Lichtexposition und ohne Kühlung des fertigen Mastermixes zur Überprüfung der Stabilität der Hydrolyse-Sonde (worst-case-Szenariobedingungen).
5.	Kontaminationskontrolle und Amplikonstruktur	Ursachenanalyse für das Auftreten von potentiellen Kontaminationen während der qPCR-Durchführung. Untersuchung der entstehenden Amplikonstruktur mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese.

Die einzigen Änderungen bei der Anwendung des qPCR-Protokolls zur Durchführung der Schmelzkurvenanalyse waren der Austausch der Hydrolyse-Sonde und des LightCycler® 480 Probes Masters gegen den LightCycler® 480 SYBR Green I Master. Hier wurde SYBR Green I zur Detektion des Fluoreszenzsignals verwendet und deshalb wurde auch das Detektionsformat sowie die Auswertemethode geändert. Der Grund für den Austausch der Hydrolyse-Sonde war, dass bei Anwendung einer Hydrolyse-Sonde zur Detektion keine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden kann (76). Das geänderte Detektionsformat war „SYBR Green I / HRM Dye“ und der Modus „SYBR Green I Format“. Die Auswertung wurde mit der „Tm Calling“ Methode durchgeführt. Des Weiteren wurde zur Untersuchung der Amplikonstruktur eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die dafür benötigten Geräte und Reagenzien sind ebenso in Tabelle 5 aufgelistet. Für die Herstellung von 1000 ml des 50x TAE-Puffers wurden 242 g TRIS (Sigma, Molekulargewicht: 121,14 g/mol), 57,1 ml Eisessig (Roth), 100 ml 0,5 M Na₂EDTA/pH 8,0 (Sigma) und VE-Wasser eingesetzt. Vor der Verwendung wurde aus dieser Lösung 1x TAE-Puffer, durch Verdünnung mit VE-Wasser, hergestellt. Das Protokoll für die Durchführung der Gelelektrophorese beinhaltet die folgenden Schritte und Unterschritte:

1. Herstellung eines Agarosegels mit 2% Biozym LE Agarose:
 - a. Abwiegen der benötigten Menge Agarose
 - b. Lösen der Agarose in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle

- c. Zugabe von GelRed® 10.000x in die homogenisierte Agaroselösung mit der finalen Konzentration von 0,43x GelRed®
 - d. Aushärten des Gels für zwei Stunden im Kühlschrank
2. Einbringen der Proben in das Agarosegel:
 - a. Einbringen des Gels in die Gelkammer PerfectBlue Gelsystem Midi
 - b. Füllen der Gelkammer mit TAE-Puffer
 - c. Beladen der Geltaschen mit den zuvor definierten Proben wie in Tabelle 12 beschrieben
 3. Starten der Gelelektrophorese mit den folgenden Bedingungen: 90 V, 105 mA, 120 Min
 4. Analyse des Gels im UV-Licht durch Anwendung eines Transilluminators

Die Proben für die Gelelektrophorese wurden direkt aus der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 nach der Durchführung des jeweiligen qPCR-Experiments entnommen. Tabelle 12 zeigt die verwendeten Proben und Kontrollen bei der Gelelektrophorese und beschreibt deren Zusammensetzung und Verwendung.

Tabelle 12 Eingesetzte Proben und Kontrollen bei der Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Probenmenge	Menge Loading buffer	Verwendung
PeqGOLD 100 BP DNA Ladder Plus	8,5 µl		Referenz zur Bestimmung der Größe des Amplikons der qPCR-Proben.
Loading buffer 6x		1,5 µl	Negativkontrolle
qPCR-Proben	8,5 µl	1,5 µl	Bestimmung der Größe des bzw. der Amplikons bei unterschiedlichen qPCR-Proben: <ul style="list-style-type: none"> • hgDNA • mgDNA • TE-Puffer

2.3.2 Methodvalidierung

Basierend auf den Erfahrungen, Daten und Auswertungen der Methodenentwicklung wurde der Methodvalidierungsplan erarbeitet. Als kritische Prozessschritte wurden vor allem die Herstellung und Eignung der manuell hergestellten Referenzstandards und die Durchführung der qPCR durch den Operator, aufgrund vieler händischer Pipettierschritte, identifiziert. Dies beeinflusste maßgeblich die

Entwicklung des Methodvalidierungsplans (siehe Tabelle 13) der Validierungsmatrix (siehe Tabelle 16) und die Definition der notwendigen Robustheitstests (siehe Tabelle 11). So wurden in den vier Validierungsexperimenten beispielsweise zwei unterschiedliche Chargen der manuell hergestellten Reagenzien verwendet. Für die Referenzstandards wurde außerdem als Voraussetzung definiert, dass beide Chargen von verschiedenen Operatoren hergestellt wurden. Des Weiteren sind sowohl die Vorgaben der für die Methodvalidierung geltenden Richtlinien der EMA und des ICH (30, 31) als auch die Anforderungen der Monographie des Europäischen Arzneibuchs 2.6.21, welche spezifische Richtlinien für die Validierung von qPCR-Methoden enthält, berücksichtigt (32). Tabelle 13 zeigt den Methodvalidierungsplan, welcher die für eine quantitative Analysenmethode geltenden Validierungsparameter und die dazugehörigen Definitionen aus den bereits genannten Richtlinien enthält (30-32). Außerdem sind die während der Validierung ausgewählten Experimentenbezeichnungen und die Angaben zur Durchführung enthalten. Ergänzt wird dies durch die aus den Mindestanforderungen der Richtlinien und den Experimenten und Auswertungen zur Methodenentwicklung abgeleiteten Spezifikationen für die Validierungsparameter der spezifischen qPCR-Methode.

Tabelle 13 Methodvalidierungsplan mit Informationen zu den einzelnen Validierungsparametern.

Experimentenbezeichnung	Validierungsparameter	Definition	Durchführung, gegebenenfalls Mindestanforderungen und Spezifikationen
1. Biodistribution Organe Kontrollmäuse	Spezifität	Spezifität ist die Fähigkeit der analytischen Methode, den zu bestimmenden Analyten, hier hgDNA bzw. humane Genome, einer Probe in der erwarteten Anwesenheit von Verunreinigungen, hier mgDNA oder murine Genome und sonstiger Matrixkomponenten eindeutig bestimmen zu können.	<ul style="list-style-type: none"> Vergleich der Primersequenz mit der Zielsequenz (Bindungsstelle), hAlu-Repeatsequenz: NCBI GenBank Datenbank, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-Algorithmus. Nachweis der Spezifität der qPCR-Methode im angewendeten Mausmodell und in den verschiedenen zu untersuchenden Mausorganen.
2. Validierungsexperimente 1-4	Linearität	Die Linearität einer analytischen Methode ist deren Fähigkeit Testergebnisse zu erhalten, die direkt proportional zu der Konzentration des Analyten, hier hgDNA oder humaner	Bestimmung bzw. Angabe des Fehlerwerts, der Effizienz, der Geradensteigung und des Y-Intercepts der Kalibrationskurven aus den vier Validierungsexperimenten, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden. Folgende Spezifikationen wurden definiert: <ul style="list-style-type: none"> Fehlerwert: $\leq 0,0500$

		Genome, in der Probe sind.	<ul style="list-style-type: none"> • Effizienz: 90,0 – 110,0% • Geradensteigung: -3,100 – 3,580 • Y-Intercept: nicht definiert <p>Diese Parameter werden durch den qPCR-Cycler bestimmt und müssen innerhalb der angegebenen Spezifikationen liegen.</p> <p>Außerdem Darstellung</p> <ul style="list-style-type: none"> • der Methode zur Erstellung der Kalibrationskurve (Detektionsformat und Auswertemethode) • der Diagramme der Kalibrationskurven mit sieben Konzentrationen (Ref hgDNA, Ref10E1-Ref10E6)
3. Validierungsexperimente 1-4	Arbeitsbereich	Der Arbeitsbereich einer Methode gibt das Intervall zwischen der höchsten und der niedrigsten Konzentration, hier der Genomkonzentration, in einer Stichprobe an, für das ein bei Anwendung der Methode ausreichendes Maß an Präzision, Genauigkeit und Linearität gezeigt wurde.	<p>Evaluierung nach Auswertung und Berechnung der Linearitätsparameter, der Genauigkeit und der Präzision der Referenzstandards, Ref hgDNA, Ref10E1-Ref10E6 von vier Validierungsexperimenten, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden. Anschließend Angabe</p> <ul style="list-style-type: none"> • des Referenzstandards mit der höchsten und der niedrigsten Genomkonzentration für den die Spezifikationen für Genauigkeit und Präzision erfüllt sind • der Genauigkeit, Präzision und Linearitätsparameter für diese Referenzstandards bzw. für die Kalibrationskurve
4. Validierungsexperimente 1-4	Genauigkeit	Die Genauigkeit der Methode gibt den prozentualen Unterschied zwischen dem mit der Analysenmethode bestimmten Wert und dem Nominalwert, d.h. einem konventionell als wahr geltenden Wert, an.	<p>Bestimmung der Intra- und Interassay-Genauigkeit für die Referenzstandards Ref hgDNA und Ref10E1-Ref10E6 für vier Validierungsexperimente, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden. Angabe der prozentualen Abweichung vom Nominalwert für die Konzentration an humanen Genomen (theoretischer und berechneter Wert) für:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 28 Werte für Intraassay-Genauigkeit <p>7 Konzentrationen (Ref hgDNA und Ref10E1-Ref10E6 aus 4 Validierungsexperimenten) mit jeweils 5 Replikaten, einzeln für jedes Validierungsexperiment</p> <ul style="list-style-type: none"> • 7 Werte für Interassay-Genauigkeit <p>7 Konzentrationen (Ref hgDNA und Ref10E1-Ref10E6 aus 4 Validierungsexperimenten)</p>

			<p>mit jeweils 20 Replikaten von allen Validierungsexperimenten</p> <p>Spezifikationen und Mindestanforderungen aus den Richtlinien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bestimmung der Genauigkeit bei Proben versetzt mit bekannter Menge an humanen Genomen: %Nominaler Wert: $\pm 15\%$ Ausnahme Quantifizierungslimit: %Nominaler Wert: $\pm 20\%$ • Mindestens fünf verschiedene Konzentrationen und drei Replikate
5. Validierungsexperimente 1-4	Quantifizierungs-limit	Das Quantifizierungs-limit gibt die niedrigste Konzentration, hier an humanen Genomen, in einer Probe an, die mit ausreichender Genauigkeit und Präzision quantifiziert werden kann.	<p>Bestimmung des Referenzstandards mit der niedrigsten Genomkonzentration, für den die Spezifikationen für Präzision und Genauigkeit erfüllt sind und der gleichzeitig eine statistisch signifikant höhere Genomkonzentration hat als die Backgroundkontrolle Ref mgDNA. Durchführung für vier Validierungsexperimente, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden. Folgende Spezifikationen wurden definiert:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Signifikanzniveau $p=0,01$ bei Anwendung eines geeigneten statistischen Tests nach Datenauswertung • Genauigkeit: %Nominaler Wert: $\pm 20\%$ • Präzision: Variationskoeffizient (VK): $\leq 20\%$
6. Validierungsexperimente 1-4	Präzision	Die Präzision drückt den Grad der Übereinstimmung einzelner Messergebnisse aus, wenn das angewendete analytische Verfahren wiederholt an einer homogenen Stichprobe durchgeführt wird.	<p>Bestimmung der Intra- und Interassay-Präzision für die Referenzstandards Ref hgDNA und Ref10E1-Ref10E6 für vier Validierungsexperimente, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden. Berechnung des VK für:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 28 Werte für Intraassay-Präzision 7 Konzentrationen (Ref hgDNA und Ref10E1-Ref10E6 aus 4 Validierungsexperimenten) mit jeweils 5 Replikaten, einzeln für jedes Validierungsexperiment • 7 Werte für Interassay-Genauigkeit 7 Konzentrationen (Ref hgDNA und Ref10E1-Ref10E6 aus 4 Validierungsexperimenten) mit jeweils 20 Replikaten von allen Validierungsexperimenten

			Spezifikationen und Mindestanforderungen aus den Richtlinien: <ul style="list-style-type: none"> • Proben versetzt mit bekannter Menge an Verunreinigung (mgDNA) • VK: $\leq 15\%$ • VK: $\leq 20\%$ (Quantifizierungslimit) • Mindestens fünf verschiedene Konzentrationen und drei Replikate
7. Methodenentwicklung und Robustheitsexperimente	Robustheit	Die Robustheit einer analytischen Methode ist ein Maß für deren Fähigkeit bei kleinen, aber beabsichtigten bzw. bekannten Variationen der Methodenparameter unbeeinträchtigt zu bleiben.	Untersuchung relevanter Parameter und deren Akzeptanzbereiche hinsichtlich der Qualität der Analyseergebnisse der Methode während der Methodenentwicklung und fortlaufend.

Für die Ausführung des Methodvalidierungsplans wurden die nach der Methodenentwicklung finalen Parameter der qPCR-Methode angewendet. Dazu gehören die im Vergleich zur Methodenentwicklung optimierten Versionen von:

- qPCR-Protokoll und Mastermixzusammensetzung (siehe Tabelle 14)
- Pipettierschema (siehe Tabelle 15)

Die Vorbereitungsmaßnahmen wurden grundsätzlich genauso ausgeführt wie in Tabelle 9 beschrieben, mit besonderer Sorgfalt bei der Säuberung der Oberflächen mit DNA away zur Vermeidung von Kontaminationen. Die Software, das Detektionsformat und die Auswertemethode waren ebenfalls dieselben wie in der Methodenentwicklung beschrieben (siehe Kapitel 2.3.1). Bei den Parametern zur Überprüfung der Eignung der Kalibrationskurve (siehe Tabellen 10 und 13) wurde der Grenzwert für den Fehlerwert auf $\leq 0,0500$ angepasst. Der Grund hierfür war, dass bei Anwendung des finalen qPCR-Protokolls ein deutlich geringerer Fehlerwert von $\leq 0,0500$ erreicht werden kann. Deshalb war eine strengere Spezifikation erforderlich, um so die Genauigkeit der Ergebnisse für die spätere Biodistributionsstudie zu erhöhen. Da das Starten eines Validierungsexperiments, im Vergleich zur Methodenentwicklung, über zuvor definierte Validierungstemplates erfolgte, wurde außerdem Folgendes definiert:

- Plattenbelegung der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (siehe Tabelle 15)
- Anforderungen an die Datenintegrität bei der Methodvalidierung
- Validierungstemplates
 - Run Protocol

- Subset Information
- Sample Information

Vor allem im GMP-Bereich aber auch bei der Anwendung von analytischen Methoden für präklinische Sicherheitsstudien in der ATMP-Entwicklung, bestehen für die verwendete Software und für die Daten, die durch diese erzeugt werden, Vorschriften. Die Richtlinie „Good practices for data management and integrity in regulated GMP/GDP environments PI 041-1 (Draft 3)“ des Pharmaceutical Inspection Co-operation Schemes (PIC/S) (77) und die Vorgaben der FDA, 21 CFR Part 11 (78), sehen unter anderem Folgendes vor:

- Software- und Programmanwendungen bzw. Programmänderungen durch Passwort geschützt
- Änderungen nur durch definierte Personen durchführbar und Festlegung der Verantwortlichkeiten
- Änderungsnachverfolgung bei Programmänderungen oder bei Änderungen bei der Auswertung innerhalb elektronischer Systeme
- Sicherheit beim Speichern und Aufbewahren der Daten
- keine Veränderung von Rohdaten möglich

Diese Anforderungen an die Datenintegrität waren der Grund für die Anwendung von Validierungstemplates und der Traceable-Database des qPCR-Cyclers für alle Validierungsexperimente. Validierungstemplates können nur vom Programmadministrator oder von durch diesen freigegebene Personen erstellt oder verändert werden. Die Anmeldung für alle unterschiedlichen Benutzer ist passwortgeschützt und nur der Programmadministrator kann Verantwortlichkeiten und Zugänge für andere Benutzer freischalten. Bei Anwendung der Traceable-Database werden automatisch alle Änderungen nachverfolgt, der Grund für jede Änderung abgefragt und die Speicherung der Daten erfolgt in einer gesicherten Datenbank. Rohdaten können bei Anwendung des LightCycler® 480 Instrument II und der dazugehörigen Software grundsätzlich nicht verändert werden (76). Beispielsweise wurden für den Standardbenutzer nur das Laden von Validierungstemplates, das Starten von qPCR-Experimenten und die Benennung des Experiments als ausführbare Operationen festgelegt. Dementsprechend wurden die Validierungstemplates vorprogrammiert und beinhalten das finale qPCR-Protokoll (siehe Tabelle 14), die Plattenbelegung der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 und die Benennung der entsprechenden Probenbezeichnungen (siehe Tabelle 15). Tabelle 14 beinhaltet weiterhin die finale Zusammensetzung des Mastermixes und Tabelle 15 das angepasste Pipettierschema sowie die Benennung der Validierungstemplates für die Validierungsexperimente.

Tabelle 14 Finales qPCR-Protokoll und Zusammensetzung des Mastermixes.

qPCR-Protokoll	Zeit	Temperatur	Mastermix	Konzentration
Preinkubation	2 Min.	50°C	hAlu fwd/rev	400 nM
Initiale Denaturierung	5 Min.	95°C	hAlu probe	50 nM
Denaturierung	10 Sek.	95°C	DNA-Template	2 µl einer 50 ng/µl Lösung
Amplifikation/Annealing	30 Sek.	60°C	Gesamtvolumen	20 µl/Reaktion (aufgefüllt mit q-PCR-Wasser)
Abkühlung	10 Sek.	40°C	Volumen LightCycler® 480 Probes Master	10 µl/Reaktion
Anzahl qPCR-Zyklen	45			

Tabelle 15 Pipettierschema und Plattenbelegung mit Probenbezeichnungen für die Durchführung der Validierungsexperimente.

Pipettierschema	
Reihenfolge	Pipettierschritte
1.	Mastermixvorbereitung für die Anzahl der Wells plus zusätzlich der Menge für fünf weitere Wells und Erhöhung des Gesamtvolumens um 15% aufgrund von Pipettierverlusten durch die Viskosität des Supermixes.
2.	Homogenisieren und Aufteilen des Mastermixes in Eppendorf DNA LoBind Tubes 1.5 ml mit 99 µl pro Well und Lagerung auf Eis und vor Licht geschützt.
3.	Hinzufügen von 11 µl homogenisierter Stichprobe (DNA-Template) in das entsprechende Tube mit 99 µl Mastermix.
4.	Homogenisierung der Probe und Lagerung auf Eis und vor Licht geschützt.
5.	Pipettieren von 20 µl der Mischung aus Mastermix und Stichprobe in das entsprechende Well der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96.
6.	Verschließen der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 mit der LightCycler® 480 Sealing Foil.
7.	Einbringen der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 in den qPCR-Cycler.
8.	Starten des Validierungsexperiments durch Laden der Validierungstemplates: <ul style="list-style-type: none"> • 2019-02-14 Validation Run 1 Run Protocol • 2019-02-14 Validation Run 1 Subset Information • 2019-02-14 Validation Run 1 Sample Information

Probenbezeichnungen und Plattenbelegung der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ref hgDNA							SSC				
B	Ref10E1											
C	Ref10E2											
D	Ref10E3											
E	Ref10E4											
F	Ref10E5											
G	Ref10E6											
H	Ref mgDNA							TE-Puffer				

Entsprechend dem Methodvalidierungsplan (siehe Tabelle 13) wurde festgelegt, dass vier Validierungsexperimente unter veränderten Bedingungen zur Bestimmung der Validierungsparameter durchgeführt werden. Die dafür entwickelte Validierungsmatrix und die Zuordnung der verschiedenen Bedingungen zu den einzelnen Validierungsexperimenten ist in Tabelle 16 gezeigt:

Tabelle 16 Validierungsmatrix und Zuordnung der verschiedenen Bedingungen zu den einzelnen Validierungsexperimenten.

Validierungsmatrix							
Validierungsexperiment	Bedingungen						
	Datum	Operator	hAlu probe (Charge)	hAlu fwd/rev (Charge)	Referenzstandard (Charge)	LightCycler® 480 Probes Master (Charge)	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Charge)
1	a	a	a	a	a	a	a
2	b	a	b	a	a	b	b
3	c	a	b	b	b	b	b
4	d	b	a	a	a	a	a
Zuordnung der Bedingungen							
Bedingungen	a		b		c		d
Datum	27.02.2019		01.03.2019		04.03.2019		06.03.2019
Operator (OP)	OP1		OP2				
hAlu probe (Charge)	2019-02-12		2018-10-24				

hAlu fwd/rev (Charge)	2019-02-12	2018-10-16		
Referenzstandard (Charge)	2019-02-13 Herstellung OP1	2018-10-15 Herstellung OP2		
LightCycler® 480 Probes Master (Charge)	35481020	35481021		
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Charge)	18009400	18026520		

Während in den Validierungsexperimenten 1 und 3 nur ein Set der verschiedenen Reagenzienchargen (a oder b) verwendet wurde, wurden die anzuwendenden Reagenzienchargen in Validierungsexperiment 2 nach dem Zufallsprinzip bestimmt (a und/oder b). Validierungsexperiment 4 wurde außerdem von einem weiteren Operator durchgeführt.

2.4 Studienprotokoll für die Biodistributionsstudie für die intravenöse

Verabreichung von tHA-BOECs

Das Ziel der Biodistributionsstudie war die Untersuchung der Verteilung, des Engraftments, der Persistenz und der Eliminierung von tHA-BOECs in den Mausorganen Lunge, Herz, Leber, Milz, Niere, Keimdrüsen, Knochen mit Knochenmark und Hirn nach i.v.-Applikation. Die Entnahme von Organen, die am Immunsystem beteiligt sind, z.B. Lymphknoten und die Schilddrüse, war durch die Anwendung des NOD/SCID/gamma(C)(null)-Mausmodells nicht zuverlässig möglich. Diese Organe sind bei immundefizienten Mäusen oft sehr klein und unterentwickelt und deshalb kaum oder nur sehr schwer zu entnehmen (79). Die Zellen wurden als Einzaldosis i.v. verabreicht, um die maximale systemische Exposition im Mausmodell zu erreichen und so das worst-case-Szenario zu untersuchen. Tabelle 17 verdeutlicht den Versuchsaufbau für die Biodistributionsstudie.

Tabelle 17 Versuchsaufbau für die worst-case-Szenario-Biodistributionsstudie.

Studien- gruppe	Anzahl Mäuse	Bezeich- nung	Zelldosis	tHA-BOEC ID	Zeitpunkt Organentnahme	Zellzahl
BD Experiment 24h	5	M1-M5	2x10 ⁶	HA1 VEC F8 3x10 ⁶ 15.03.2018	24 Stunden nach Injektion	10x10 ⁶

BD Experiment 7d	5	M8-M12	2x10 ⁶	HA1 VEC F8 3x10 ⁶ 15.03.2018	7 Tage nach Injektion	10x10 ⁶
BD Kontrolle 24h	2	M6, M7		Nur Saline, keine Zellen verabreicht	24 Stunden nach Injektion	
BD Kontrolle 7d	3	M13-M15		Nur Saline, keine Zellen verabreicht	7 Tage nach Injektion	
Gesamt:	15				Gesamt:	20x10 ⁶

Alle Verbrauchsmaterialien und Reagenzien, die ab der i.v.-Injektion der Zellen für die Durchführung der Biodistributionsstudie benötigt wurden, sind, inklusive des Einsatzgebiets, in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für die Injektion der tHA-BOECs und die Organentnahme.

Verbrauchsmaterial	Lieferant	Einsatzgebiet
Tuberkulinspritze 1ml (NORM-JECT)	Henke-Sass Wolf	Aufnahme, Resuspension und i.v.-Injektion der tHA-BOECs in die Schwanzvene der Mäuse
27G AGANI needle	Terumo	
29G syringe (MYJECTOR)	Terumo	Intraperitoneale Verabreichung eines Anästhetikums
Cryo.S 2 ml Cryo Tubes	Greiner bio-one	Lagerung der Organe nach Entnahme
LEUKOPLAST 5 m x 1,25 cm 1521	BSN medical GmbH	Fixieren der Mäuse am Operationstisch
Reagenz	Lieferant	Einsatzgebiet
Sodio cloruro gelenica senese 0,9% (Saline)	Titolare A.I.C.	Herstellung einer tHA-BOEC-Suspension zur i.v.-Injektion, Injektion der reinen Lösung bei Kontrollmäusen
Anästhetikum	Von UPO bereitgestellt	Anästhetikum für die Blutabnahme vom Herzen der lebenden Mäuse

DNA away	Molecular BioProducts	Säuberung der Arbeitsflächen und des Operationsbestecks bei der Organentnahme
----------	-----------------------	---

Die in den Kapiteln 2.4.1 und 2.4.2 beschriebenen Experimente und Arbeiten wurden in den Zellkulturlaboren und den Tierhaltungsräumen in UPO durchgeführt. Die Biodistributionsstudie wurde durch das Animal Care and Use Committee der Università del Piemonte Orientale "A.Avogadro" in Novara in Italien und vom Italian Ministry of Health (Project n. DB064.5) genehmigt. In der Studie wurden acht bis zehn Wochen alte NOD/SCID/gamma(C)(null)-Mäuse (Charles River) eingesetzt. Da die tHA-BOECs humanen Ursprungs sind, werden immundefiziente Mäuse zur Verhinderung von immunologischen Abstoßungsreaktionen nach der i.v.-Injektion der Zellen benötigt (16, 17, 59, 80). Die Mäuse wurden in einer Tierhaltungseinrichtung in UPO mit spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Mäuse aus den Experimenten- und Kontrollgruppen waren in getrennten Polypropylenkäfigen untergebracht und Wasser sowie Futter waren *ad libitum* verfügbar. Tabelle 19 zeigt die Aufteilung der Mäuse in die verschiedenen Käfige und enthält außerdem alle weiteren relevanten Informationen wie Käfignummer, Studiengruppe, Chargennummer, Tier ID, Anzahl und Geschlecht sowie das Geburtsdatum.

Tabelle 19 Käfighaltung und Informationen zu den NOD/SCID/gamma(C)(null)-Mäusen.

Käfignummer	Studien- gruppe	Chargen- nummer	Tier ID	Anzahl und Geschlecht	Geburtsdatum
1.	BD Experiment 24h und 7d	2018/3	NOD/SCID/gamma (C)(null)	4x männlich	23.01.2018
2.		2018/2	NOD/SCID/gamma (C)(null)	6x weiblich	10.01.2018
3.	BD Kontrolle 24h und 7d	2018/3	NOD/SCID/gamma (C)(null)	5x männlich	16.01.2018

2.4.1 Vorbereitung der tHA-BOECs und i.v.-Applikation

Die tHA-BOECs wurden nach Expansion, Kryokonservierung und Qualitätskontrolle, siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2, in einem temperaturkontrollierten Transport auf Trockeneis (-80°C) nach UPO zurückgeschickt. Dort wurden die Zellen von Kollegen aus UPO unter Anwendung der gleichen Zellkulturprozesse aufgetaut und bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit TrypLE Select 1x von den Zellkulturflaschen abgelöst. Nach der Zählung der Zellen mit der Neubauer Improved Zählkammer wurden Zellsuspensionen mit 2×10^6 tHA-

BOECs, für jede Maus individuell, vorbereitet. Hierzu wurden die Zellen bei 190 x g für 5 Minuten zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut bei 190 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Pellets aus 2×10^6 tHA-BOECs wurden in die Tierhaltungseinrichtungen gebracht und bis zur i.v.-Injektion auf Eis gelagert. Vor dem Betreten der Tierhaltungsräume wurde Einmalschutzkleidung, bestehend aus Überschuhen, Schutzkittel, Schutzkappe, Gesichtsmaske und Handschuhen, angelegt. Die geltenden Hygienevorschriften, wie zum Beispiel die Desinfektion der Handschuhe vor dem Eintritt in die Tierhaltungsräume, wurden eingehalten und kontrolliert. Zum Schluss wurden die Pellets aus 2×10^6 tHA-BOECs einzeln mit 100 µl Saline resuspendiert, in eine 1 ml Spritze mit einer 27G Nadel aufgenommen und direkt in die Schwanzvene der Mäuse injiziert.

2.4.2 Organentnahme

Als Vorbereitungsmaßnahme für die Organentnahme wurden alle Cryo.S 2 ml Cryo Tubes mit der in Tabelle 17 vorgesehenen Bezeichnung und der Beschriftung mit dem zu entnehmenden Organ versehen. Für die Zwischenlagerung der Organe in den Tierhaltungsräumen wurde Trockeneis in einer Styroporbox bereitgestellt. Das Operationsbesteck, bestehend aus Scheren, Pinzetten und Skalpell wurde mit DNA away Lösung entsprechend den Herstellerangaben, Einlegen des Bestecks in die Lösung für mindestens zwei Minuten und anschließend abwischen mit einem Einmaltuch, gesäubert und in einem Ofen bei 180°C für drei Stunden sterilisiert. Vor Beginn der Organentnahme wurden außerdem alle Arbeitsflächen mit DNA away gereinigt. Zuerst wurden jeweils die Mäuse der Kontrollgruppen und danach die der Experimentengruppen durch intraperitoneale Verabreichung eines Anästhetikums, ein bis zwei Dosen von 500 µl mit einer 29G Spritze, betäubt. Bis zum Einsetzen der Wirkung wurden die Mäuse in verschiedenen Käfigen gehalten. Der Wirkeintritt wurde durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes überprüft. Den Mäusen wurde vor Organentnahme, für einen anderen Versuch, der nicht Teil dieser Arbeit war, 500 µl Blut aus dem Herzen entnommen. Anschließend wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Für die Organentnahme wurden die Mäuse mit Leukoplast Pflaster fixiert und die Organe wurden nacheinander in der Reihenfolge, Lunge, Herz, Leber, Milz, Niere, Keimdrüsen, Knochen mit Knochenmark und Hirn entnommen. Die Organe wurden in Cryo.S 2ml Cryo Tubes gegeben und direkt, zum Erhalt der bestmöglichen Qualität, auf Trockeneis zwischengelagert. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden wurde auch hier mit den Mäusen der Kontrollgruppen begonnen. Für die Untersuchung der Biodistribution der tHA-BOECs im Knochen und Knochenmark wurde repräsentativ das Femur ausgewählt und vom Skelettmuskel getrennt. Nachdem die Entnahme der Organe bei einer Maus abgeschlossen war, wurden sowohl die Arbeitsflächen als auch das Operationsbesteck ein weiteres Mal mit DNA away Lösung gereinigt. Zum Abschluss wurden alle entnommenen Organe in einem -80°C Gefrierschrank gelagert, bis diese in einem temperaturkontrollierten Transportprozess auf Trockeneis zum TERM geschickt wurden. Dort wurde

die Lagerung bei -80°C , bis zur weiteren Verarbeitung, fortgesetzt. Die maximale Lagerungsdauer war sechs Monate.

2.4.3 Organaufbereitung, DNA-Isolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung

Die gefrorenen Organe wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden lyophilisiert. Darauf folgte die mechanische Homogenisierung der Organe mit flüssigem Stickstoff durch Anwendung eines Mörsers und eines Pistills, bis zur Entstehung eines trockenen und feinen Pulvers. Für die DNA-Isolierung wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) und das dafür vorgesehene Protokoll „Purification of Total DNA from Animal Tissues“ (Spin-Column Protocol) angewendet. Zusätzlich wurde ein Prozessschritt zur RNA-Lysierung, nach Schritt zwei des Protokolls, entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Aufgrund des vorgeschalteten Lyophilisierungsprozesses wurden die eingesetzten Mengen an Organprobe abweichend von den Herstellerangaben auf 2,5 mg festgelegt. Alle verwendeten Reagenzien sind standardmäßig im DNeasy Blood & Tissue Kit vorhanden, mit Ausnahme der für die RNA-Lysierung verwendeten RNase A (Qiagen). Die Anwendung dieses Protokolls wurde wie folgt durchgeführt (81):

1. Hinzugabe von 180 μl ATL-Puffer zu der definierten Menge an Organprobe
2. Hinzugabe von 20 μl Proteinase K gefolgt von Mischen durch Vortexen (5-10 Sekunden) und Inkubieren der Probe bei 56°C auf einem Heizschüttler, bis zur kompletten Auflösung des Organpulvers
3. Hinzugabe von 4 μl RNase A mit einer Konzentration von 100 mg/ml, Mischen durch Vortexen und Inkubation für zwei Minuten
4. Vortexen der Probe für 15 Sekunden und Hinzugabe von 200 μl Puffer AL, Mischen durch Vortexen und Hinzugabe von 200 μl Ethanol (100%), gefolgt von Mischen durch Vortexen
5. Einbringen der Mischung aus Schritt 4 in ein DNeasy Mini Spin Column, das in einem 2 ml Collection Tube platziert wurde, und Zentrifugieren bei $\geq 6000 \times g$ für eine Minute; Verwurf des 2 ml Collection Tubes und des Durchflusses
6. Platzieren des zuvor verwendeten DNeasy Mini Spin Columns in einem neuen 2 ml Collection Tube, Hinzugabe von 500 μl Puffer AW1 und Zentrifugieren für eine Minute bei $\geq 6000 \times g$; Verwurf des 2 ml Collection Tubes und des Durchflusses
7. Platzieren des zuvor verwendeten DNeasy Mini Spin Columns in einem neuen 2 ml Collection Tube, Hinzugabe von 500 μl Puffer AW2 und Zentrifugieren für drei Minuten bei $20.000 \times g$ zum Trocknen der DNeasy-Membran; Verwurf des 2 ml Collection Tubes und des Durchflusses

8. Platzieren des DNeasy Mini Spin Columns in einem DNA LoBind Tube 1.5 ml und Pipettieren von 200 μ l Puffer AE direkt auf die DNeasy-Membran, Inkubation für eine Minute bei Raumtemperatur und Zentrifugation für eine Minute bei $\geq 6000 \times g$ zum Eluieren
9. einmalige Wiederholung von Schritt 8

Die DNA-Konzentration, der nach DNA-Isolierung erhaltenen Lösung, wurde mit der NanoQuant Plate (Tecan) und einem Infinite 200 Plate Reader (Tecan) gemessen. Hierbei wurden die Herstellerangaben für die Anwendung „small-volume samples of nucleic acids in absorbance mode for DNA concentration measurement“ befolgt und verwendet wurde die i-control™ Software Version 1.11 (Tecan). Die DNA-Konzentration der Biodistributionsproben wurde nach der Messung, durch Verdünnen mit TE-Puffer, auf die benötigte Konzentration von 50 ng/ μ l eingestellt. Bis zur Analyse mittels qPCR wurden die Proben bei 2-8°C für maximal sechs Monate gelagert. Es wurden dieselben Sicherheitsmaßnahmen zur Vermeidung von DNA-Kreuzkontaminationen angewendet wie bei der Durchführung der qPCR-Methode. Zur Gewährleistung der Qualität der bereitgestellten Biodistributionsproben wurden folgende Spezifikationen definiert:

- Ausgangskonzentration der DNA-Lösung $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$
- Absorptionsverhältnis A260 / A280 nm $\geq 1,8$

Konnte die Ausgangskonzentration von $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ bei einer Probe nicht eingehalten werden, wurde eine erneute DNA-Isolierung oder eine Fällung mit Ethanol, gefolgt von Aufkonzentration mit TE-Puffer, durchgeführt. Lag das Absorptionsverhältnis A260 / A280 nm unter 1,8 musste ebenfalls eine neue Isolierung durchgeführt werden.

2.4.4 Analyse der Biodistributionsproben mittels qPCR

Für die Analyse der Biodistributionsproben wurde das finale qPCR-Protokoll und die gleiche Mastermixzusammensetzung wie bei der Methodvalidierung verwendet. Des Weiteren wurden die gleichen Vorbereitungsmaßnahmen und das gleiche Pipettierschema verwendet. Abweichend vom Vorgehen bei der Methodvalidierung wurde bei der Analyse der Biodistributionsproben eine externe Kalibrationskurve in der LightCycler®480-Software des qPCR-Cyclers für die Bestimmung der Konzentration an humanen Genomen hinterlegt. Das Vorgehen war hierbei wie folgt:

- Herstellung der Referenzstandards Ref hgDNA, Ref10E1-Ref10E6 und der Backgroundkontrolle Ref mgDNA und Bestimmung der Genomkonzentrationen in drei unabhängigen qPCR-Experimenten
- Integration der Kalibrationskurve aus einem der drei Experimente in das Makro für die Durchführung der qPCR-Analysen über die LightCycler®480-Software

- Prüfen der Erfüllung der Anforderungen an Linearität, Genauigkeit, Präzision und Sensitivität in allen drei qPCR-Experimenten und insbesondere Überprüfung der Einhaltung der Anforderungen an die Anwendung einer externen Kalibrationskurve (76):
 - hohe und reproduzierbare Amplifikationseffizienz (90,0 – 110,0%)
 - konstante Reaktionsbedingungen
 - gleiches Detektionsformat und gleiche Analysen- und Auswertemethode wie im Ausgangsexperiment, aus dem die Kalibrationskurve exportiert wurde
 - Anwendung eines Referenzstandards, der im Arbeitsbereich (Ref10E3-Ref10E6) der qPCR-Methode liegt, zur Anpassung der externen Kalibrationskurve an das aktuelle Experiment; die Anpassung wird durch die LightCycler® 480-Software automatisch vorgenommen

Für die Analyse der Biodistributionsproben wurde die Charge der Referenzstandards 2018-10-15 verwendet. Für diese Charge waren alle zuvor beschriebenen Bedingungen erfüllt und diese wurde auch während der Methodvalidierung verwendet. Die Ergebnisse zu Linearität, Genauigkeit, Präzision und Sensitivität bzw. Quantifizierungslimit sind in Kapitel 3.3.2 beispielhaft für ein Experiment, das Validierungsexperiment 3, gezeigt. Der Referenzstandard, der für die Analyse der Biodistributionsproben zur Anpassung der externen Kalibrationskurve eingesetzt wurde, war Ref10E3. Der Vorteil bei der Verwendung einer externen Kalibrationskurve ist, dass für alle 15 Experimente die gleiche Kalibrationskurve angewendet wird. Zusätzlich können so alle von einer Maus vorhandenen Biodistributionsproben, d.h. die DNA-Lösungen der acht Organe und alle benötigten Kontrollproben mit fünf Replikaten (n=5) innerhalb einer LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 angewendet werden. Für jede Maus (M1-M15) wurde also eine separate LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 pipettiert. Anschließend wurde die qPCR-Analyse durch die LightCycler® 480-Software unter Anwendung eines Makros, das genauso wie die angewendeten Validierungstemplates passwortgeschützt war, gestartet. Durch die Anwendung eines vordefinierten Makros wurde gewährleistet, dass die Bedingungen, wie beispielsweise das Detektionsformat und die integrierte externe Kalibrationskurve, immer konstant und einheitlich waren. Die Entscheidung, ob ein qPCR-Experiment geeignet war oder wiederholt werden musste, wurde anhand der Überprüfung von zuvor definierten Akzeptanzkriterien für die eingesetzten Kontrollproben getroffen. Tabelle 20 zeigt die angewendeten Kontrollproben und die dazugehörigen Akzeptanzkriterien.

Tabelle 20 Kontrollproben und Akzeptanzkriterien bei der Durchführung der Analyse der Biodistributionsproben.

Kontrollprobe	Akzeptanzkriterium
Ref10E3	Genauigkeit: %Nominaler Wert: $\pm 15\%$

	Präzision: VK \leq 15%
Ref mgDNA	Kein signifikanter Konzentrationsunterschied an humanen Genomen von einem Mittelwert aus einem Experiment (n=5) zum Mittelwert aus allen Experimenten (n=15) mit p=0,01. Anwendung der Excelformel KONFIDENZ.T mit p=0,01 gefolgt von grafischer Auswertung (Überschneidung der Konfidenzintervalle).
TE-Puffer	Unterschied von mindestens 2 Cq zwischen der Backgroundkontrolle Ref mgDNA und TE-Puffer.

Wurden alle Akzeptanzkriterien erfüllt gilt das Experiment als valide und muss ausgewertet werden. Hierdurch soll sichergestellt werden, dass die Entscheidung, ob ein Experiment wiederholt wird oder nicht anhand von zuvor definierten Kriterien getroffen wird.

2.4.5 Statistische Datenauswertung und Ausschluss von Daten

Die statistische Datenauswertung wurde mit der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 23 (IBM) durchgeführt. Das Quantifizierungslimit der qPCR-Methode wurde festgelegt durch den Referenzstandard mit der niedrigsten Konzentration an humanen Genomen, der eine statistisch signifikant höhere Genomkonzentration hat als die Backgroundkontrolle Ref mgDNA. Das Signifikanzniveau wurde auf p=0,01 festgelegt. Bei der Untersuchung der Biodistribution wurden alle Biodistributionsproben als negativ definiert, wenn sie eine statistisch signifikant niedrigere Konzentration an humanen Genomen als die Backgroundkontrolle aufwiesen, oder eine nicht statistisch signifikant unterschiedliche Konzentration. Das Signifikanzniveau wurde hier auf p=0,05 festgelegt. Der erste Schritt bei der statistischen Datenauswertung war die Überprüfung auf Normalverteilung der Daten. Diese Überprüfung muss durchgeführt werden, um die geeigneten und anwendbaren statistischen Tests für die Auswertungen der Daten zu bestimmen, z.B. müssen Daten für die Durchführung eines parametrischen Tests einer Normalverteilung unterliegen (82). Diese wurde durch Normalverteilungsplots (Q-Q Plots) und dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Liegen die Datenpunkte beim Normalverteilungsplot auf einer Geraden, kann von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Beim Shapiro-Wilk-Test geht man von einer Normalverteilung der Daten aus, wenn die Nullhypothese nicht verworfen werden kann. Die Entscheidung wird aus einer Kombination von beiden Methoden getroffen, wobei im Zweifelsfall die Entscheidung anhand des Normalverteilungsplots getroffen wird. Der Vorteil bei der Durchführung eines parametrischen Tests, im Vergleich zu einem nicht-parametrischen Test, ist dessen größere Teststärke bzw. Power (82, 83). Bei beiden Szenarien, Quantifizierungslimit und Untersuchung der Biodistribution, werden jeweils zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Demzufolge wird, bei nachgewiesener

Normalverteilung der Daten, der t-Test für unabhängige Stichproben, ein parametrischer Test, angewendet. Sind die Daten nicht normalverteilt, muss zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test, ein nicht-parametrischer Test, durchgeführt werden (84). Bei vorhandener Normalverteilung der Daten muss, vor der Anwendung des t-Tests für unabhängige Stichproben, zusätzlich eine Prüfung auf Varianzhomogenität durchgeführt werden. Diese wird mit der Durchführung des Levene-Tests überprüft und man geht von Varianzhomogenität der Daten aus, wenn die Nullhypothese nicht verworfen werden kann. Ist diese Voraussetzung nicht erfüllt, muss auf den Welch t-Test ausgewichen werden (82, 83). Bei der Analyse der Biodistributionsproben wurde außerdem zur Berechnung der Effektstärke der r-Wert, der Pearson-Korrelationskoeffizient, berechnet. Jedoch wurde dieser nur für Biodistributionsproben ermittelt, die eine statistisch signifikant höhere Konzentration an humanen Genomen als die Backgroundkontrolle aufwiesen. Hierbei deuten r-Werte von $> 0,5$ auf einen starken, Wert von $0,3 \leq r < 0,5$ auf einen mittleren und Werte von $0,1 \leq r < 0,3$ auf einen schwachen Effekt hin (85). Die Formel zur Berechnung ist wie folgt:

$$r = |z/\sqrt{n}|$$

r = Pearson-Korrelationskoeffizient

| | = Betrag der Berechnung

z = z-Wert (Teststatistik, die sich aus den negativen und positiven Rangsummen ergibt, berechnet durch das Statistikprogramm)

\sqrt{n} = Wurzel der Gesamtstichprobenzahl

Für die Auswertung der qPCR-Daten für die Methodvalidierung und die Biodistributionsstudie ist zusätzlich die Definition von Kriterien für den Ausschluss von einzelnen Daten bzw. Einzelwerten oder Replikaten wichtig. Für die Definition als Ausreißer und damit als Einzelwert, der von der Analyse ausgeschlossen wird, führte das Eintreten von einer der folgenden Bedingungen:

- offensichtlich nicht plausible oder abweichende Amplifikationskurve, z.B. verursacht durch eine Blase in einem Well der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96
- Angabe eines unsicheren Cq-Werts durch die LightCycler® 480 Software
- Konzentrationswert an humanen Genomen, der mehr als 50% vom Median abweicht; gilt nur für Referenzstandards Ref hgDNA, Ref10E1-Ref10E6, die Backgroundkontrolle Ref mgDNA und die SSC
- Einzelwert für den ein Fehler dokumentiert oder ein Fehler eindeutig erkennbar und offensichtlich ist, z.B. Pipettierfehler durch den eine Well der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 nicht befüllt wurde
- Einzelwerte der Biodistributionsproben mit einem Cq-Wert von 40, dem Grenzbereich des qPCR-Cyclers, wurden ausgeschlossen, falls außerdem die Durchschnittskonzentration an

humanen Genomen der Probe statistisch signifikant niedriger war als die der Backgroundkontrolle.

3. Ergebnisse

3.1 Risikoanalyse und Risikobewertung anhand eines Thrombozytenkonzentrates zum Serumersatz

Das ausgewählte und zu evaluierende Thrombozytenkonzentrat zum Serumersatz ist humanen Ursprungs. Es wurde aufgrund des starken Einflusses auf das Wachstumsverhalten der BOECs und aus Gründen der Virussicherheit zunächst mit einer hohen Kritikalität bewertet. Dies hat zur Folge, dass eine detaillierte und ganzheitliche Risikoanalyse durchgeführt wird. Entsprechend den Herstellerangaben ist bei Anwendung des Thrombozytenkonzentrates zusätzlich der Einsatz von Heparin im Zellkulturmedium nötig. Da das hierfür angewendete Heparin aber ein in Deutschland zugelassenes Arzneimittel ist, entsteht durch dessen Einsatz im Zellkulturmedium kein Sicherheitsrisiko für den Patienten, sodass keine eigenständige Risikoanalyse und auch kein Analysenzertifikat für das Heparin benötigt werden (8). Die für den risikobasierten Ansatz benötigten Informationen und Daten wurden durch einen Fragebogen und weitergehende Informationen anschließend durch E-Mailkontakt von der Herstellerfirma in Erfahrung gebracht. Da bei der Herstellung des Thrombozytenkonzentrates ein Virusinaktivierungsschritt eingesetzt wird, wurden für diesen zusätzlich das „Certificate of processing“ und die Ergebnisse der „Viral clearance study“ abgefragt. Diese Dokumente werden von den Rohstoffherstellern teilweise erst nach dem Abschluss eines Lieferantenvertrags bereitgestellt und unterliegen einer Geheimhaltungsvereinbarung. Das vollständig ausgefüllte Dokument „Risk Assessment, raw materials of biological origin_Thrombozytenkonzentrat“ enthält ebenfalls Informationen und Daten, die der Geheimhaltung unterliegen. Deshalb ist im Anhang nur das Template gezeigt und als Ergebnis des risikobasierten Ansatzes wird ausschließlich die finale Bewertung des klinischen Nutzen-Risiko-Verhältnisses (siehe Abbildung 5) veröffentlicht.

Requirements	Risk assessment			Risk mitigation			
	Current Status according to manufacturer	Risk identification considering the current status	Risk evaluation	Established action	Effect/Failure	New action	
Evaluation of the clinical benefit and risk	<p>The platelet lysate will be used for the isolation and the expansion phase of the cells within a GMP manufacturing process of an investigational ATMP. The application of the PL is also designated for the manufacturing of the ATMP after marketing authorization following clinical development. The PL is used as a cell culture supplement and as a human and allogenic serum replacements the raw material has been valued with a basically high criticality demanding a detailed risk analysis and evaluation.</p> <p>The manufacturing of the PL is performed in compliance with a quality management system according to ISO 13845:2016 and a detailed description of the manufacturing process has been provided by the manufacturer. The manufacturing process includes a sterile filtration (0.2 µm filter) and a viral inactivation step by gamma irradiation. Moreover, aseptic manufacturing is applied and no further substances of biological origin or any unwanted substances like antibiotics are used. The storage and shelf life conditions are defined. Consequently, no risk could be identified here.</p> <p>The certificate of conformity comprises measures and quality controls for the pre raw material the platelet concentrates (PC) by German blood banks and for the PL by the manufacturer respectively. The viral safety of the PC is ensured by serological analysis and viral genome screening performed by the German blood banks. The viral safety of the PL which is pooled from PC of around 60 donors is guaranteed by a viral inactivation step using gamma irradiation. The reliability of this method has been demonstrated by a viral clearance study providing at least a 4 log₁₀ reduction of 5 human viruses and/or models. As the German blood banks and the manufacturer follow legal requirements and sufficient measures are established to assess or ensure the viral safety of the PL no risks are remaining here. The same applies for the BSE/TSE safety of the product. The donors are carefully evaluated by the German blood banks and the manufacturer follows Ph. Eur. requirements minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents. Furthermore, the tests for sterility and for the absence of bacterial endotoxins on the PL are performed according to Ph. Eur. requirements minimizing the risk for microbiological contaminations. The absence of mycoplasma contamination is determined applying a commercially available Mycoplasma Detection Kit. The validity of the test results achieved by this Kit has been assessed. The sensitivity of the assay and the additional assay parameters are sufficient so that no further measures need to be implemented. Quality control measures are established to determine the identity and the efficacy of the raw material. The identity of the PL is confirmed by the certificate of the German blood banks and the performance of further tests by the manufacturer. Results for the evaluation of batch to batch consistency with three batches of the PL have been provided. Assays to determine efficacy of a PL batch include the evaluation of protein and growth factor content and the assessment of the biological activity using primary MSC. Those test are only performed on request and must be defined in a supplier agreement. Although both methods have been described in detail by the manufacturer considering the different behavior of MSC and BOECs a growth based method using MSC is not meaningful. Instead in future foreseen application each batch of PL will be tested with reference BOECs to determine efficacy of the PL before approval. The PL is used for the isolation and expansion of cells. Before potential administration to patients the cells are carefully rinsed with a buffer solution to remove residues of PL and the elimination of PL from the final product has been shown by quantifying the dilution steps. Following exposure of the raw material to the patient is rather unlikely as only minimal residues might remain. Finally, we conclude a positive outcome of our clinical benefit and risk assessment emphasizing on patient safety. The raw material can be applied within the GMP manufacturing of the investigational ATMP.</p>						
Document	Risk Assessment, raw materials of biological origin			Version	1.0	Page	7 of 8

Abbildung 5 Bewertung des klinischen Nutzen-Risiko-Verhältnisses bei Einsatz des Thrombozytenkonzentrats bei der Herstellung des ATMPs nach der Durchführung des risikobasierten Ansatzes. PL = Platelet Lysate.

In dieser Bewertung wird im Besonderen auf die identifizierten Risiken, die Maßnahmen zur Risikominimierung und auf kritische Aspekte, die spezifisch für die Art des Rohstoffs sind, eingegangen. Im Falle des Thrombozytenkonzentrates waren das beispielsweise die Studie zur Virusabreicherung durch den Virusinaktivierungsschritt und der angewendete Test auf Mykoplasma kontaminationen, der nicht entsprechend den Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs durchgeführt wird. Abschließend wird auf mögliche Folgen bei Kontakt des Patienten mit Rohstoffrückständen bei Anwendung des Arzneimittels eingegangen, unter Berücksichtigung der potenziell vorliegenden Konzentration dieser Rückstände am Ende des Herstellungsprozesses. Für das Thrombozytenkonzentrat waren nach Abschluss der Maßnahmen zur Risikominimierung alle Anforderungen hinsichtlich Patientensicherheit und dem Einsatz im Herstellungsprozess für das ATMP erfüllt. Folglich kann das Thrombozytenkonzentrat als Mediumsupplement für die Isolierung und Expansion von BOECs eingesetzt werden.

3.2 BOEC Isolierung, Expansion und Qualitätskontrolle

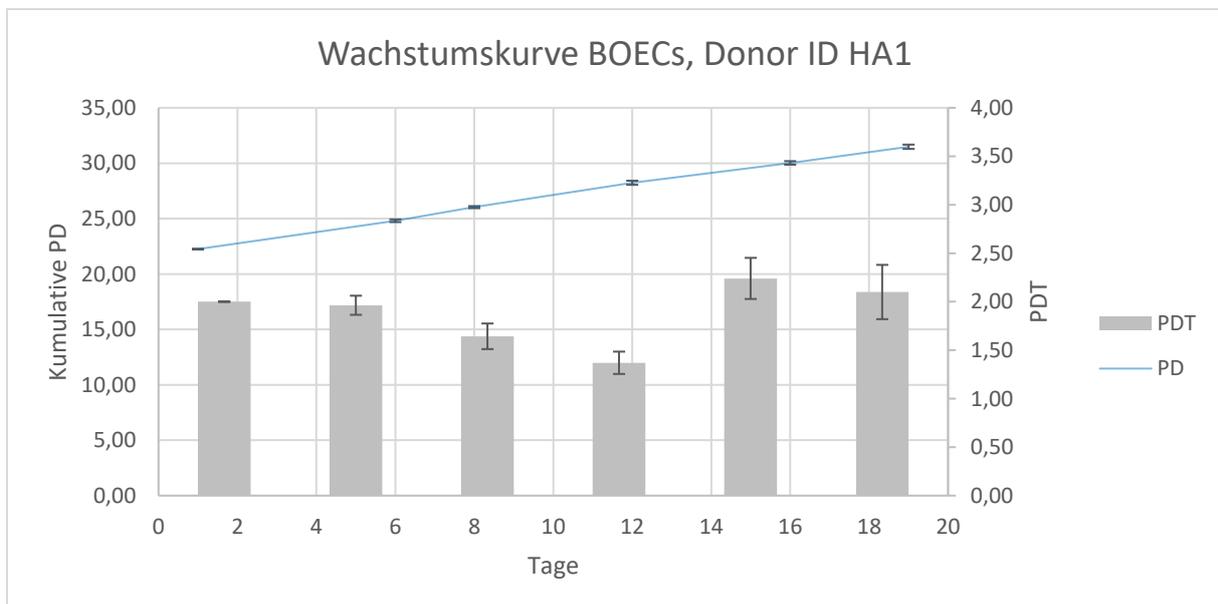
Nach Isolierung der BOECs aus peripherem Blut von Hämophilie A-Patienten nach hier entwickelter GMP-konformer SOP und anschließender lentiviraler Transduktion in UPO wurden die tHA-BOECs auf Trockeneis nach Würzburg transportiert und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die tHA-BOECs, die als Ausgangspunkt für die Expansion benutzt wurden, wurden mit einer Konzentration von $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml und 1 ml Cryo-SFM Medium/Cryo Tube in UPO eingefroren. Die Zellen mit der Donor ID HA1 hatten des Weiteren eine PD von 22,25.

3.2.1 Expansion von tHA-BOECs für die Biodistributionsstudie

Für die Durchführung der präklinischen Biodistributionsstudie wurden insgesamt mindestens 20×10^6 tHA-BOECs benötigt. Da die tHA-BOECs, die in der präklinischen Biodistributionsstudie oder auch in weiteren präklinischen Studien eingesetzt werden, in einem definierten PD-Bereich von 30-40 liegen müssen, um einen späteren klinischen Einsatz der BOECs möglichst genau abzubilden, wurden die Zellen weiter expandiert und eine größere Menge als benötigt kryokonserviert (10). Eine $PD \geq 30$ wurde festgelegt, um die bei einer späteren klinischen Anwendung am Menschen deutlich höheren benötigten Zellzahlen zu berücksichtigen. Das Studienprotokoll für die Durchführung der Biodistributionsstudie ist in Kapitel 2.4 beschrieben. Die im Folgenden gezeigte Tabelle 21 und die Wachstumskurve in Abbildung 6 zeigen die Ergebnisse der Expansion der tHA-BOECs und beinhalten die Angaben zu PDs, PDTs, Zellzahl, Viabilität, Passage, Prozessdauer und zur Donor ID.

Tabelle 21 Übersicht des Herstellungs- und Expansionsprozesses der tHA-BOECs für die Biodistributionsstudie.

Bezeichnung Kryovial bei Expansionsstart: HA1 VEC F8 MOI20 P5 2,0x10 ⁶ 23.03.2017							
Prozessschritt	Prozessdauer	Passage	Ausbeute Zellzahl	Zellzahl Kryokonservierung	Viabilität (%) ^a	PD	PDT
Auftauen	Tag 1	P5	1,53x10 ⁶		77% ^b	22,25	2,00
Expansion	Tag 6	P6	9,03x10 ⁶		96%	24,81	1,95
Kryokons.	Tag 8	P7	21,07x10 ⁶	17,5x10 ⁶	97%	26,03	1,64
Lagerung im Stickstofftank für 18 Tage							
Auftauen	Tag 8	P7	2,80x10 ⁶		70% ^b	26,03	1,64
Expansion	Tag 12	P8	13,00x10 ⁶		95%	28,23	1,37
Expansion	Tag 16	P9	45,45x10 ⁶		94%	30,03	2,24
Kryokons.	Tag 19	P10	132,40x10 ⁶	126x10 ⁶	95%	31,49	2,10
Bezeichnung Kryovials bei Expansionsende: HA1 VEC F8 3x10 ⁶ 15.03.2018							
^a Viabilität während der Zellexpansion bestimmt durch den automatisierten Zellzähler. ^b Viabilität berechnet nach dem Auftauen der Zellen.							

**Abbildung 6** Wachstumskurve und Verdopplungsrate der tHA-BOECs von Donor HA1. Gezeigt sind die kumulativen PDs und die zum Zeitpunkt der Zellzählung bestimmten PDTs als Mittelwert mit Standardabweichung für drei Replikate (n=3). Für Zeitpunkt 1, entsprechend Tag 1, wurden die Ausgangswerte aus UPO abgebildet.

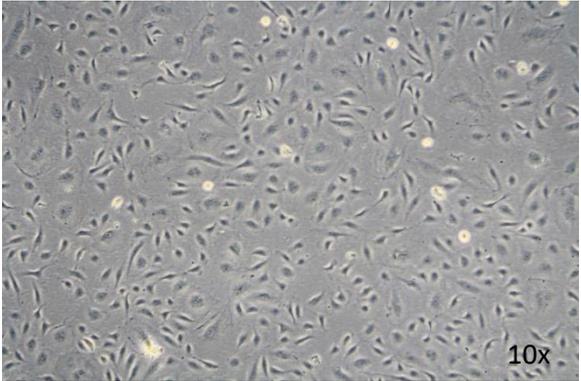
Die Expansion der tHA-BOECs wurde bei PD 31,49 gestoppt und die Zellen wurden kryokonserviert, um sicherzustellen, dass noch genügend PDs für das Auftauen und die Reaktivierung der Zellen vor Injektion in die Schwanzvenen der Mäuse in UPO vorhanden sind. Die Expansionsdauer betrug

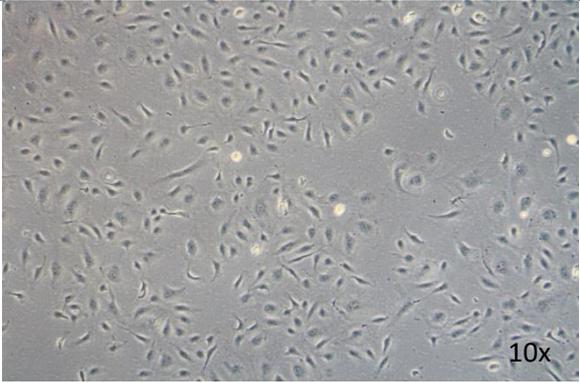
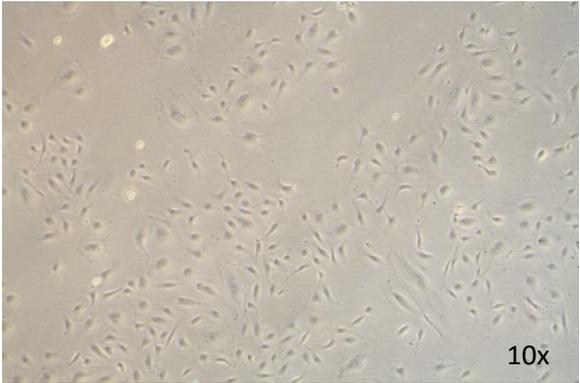
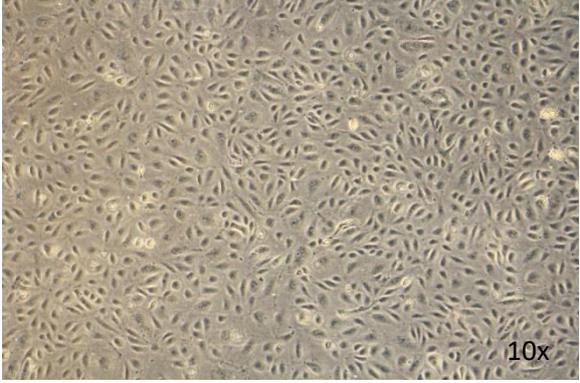
insgesamt 18 Tage und die Spezifikationen für die Zellzahl ($\geq 30,00 \times 10^6$), die Verdopplungsrate (PDT=1,00-3,00 Tage) und das Zellalter (PD-Bereich: 30,00 – 40,00 PDs) wurden eingehalten.

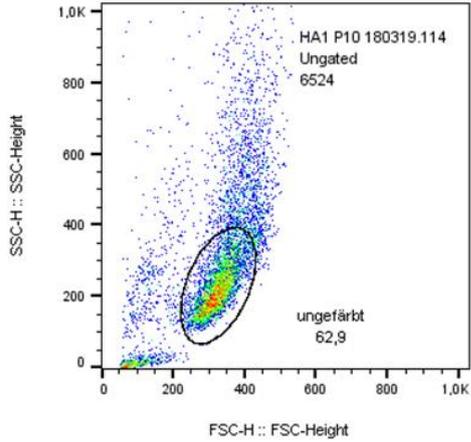
3.2.2 Qualitätskontrolle von tHA-BOECs für die Biodistributionsstudie

Die tHA-BOECs, die für die Biodistributionsstudie im Mausmodell oder für weitere präklinische Studien bestimmt sind, müssen definierte Qualitätskriterien erfüllen. Dieser Nachweis muss nach dem Herstellungsprozess und somit vor deren Anwendung durch definierte Qualitätskontrollen erbracht werden (8, 10). Die Ergebnisse der Qualitätskontrolle für die tHA-BOECs, die für die Biodistributionsstudie verwendet wurden, sowie die Qualitätskriterien und die zuvor definierten Spezifikationen sind in Tabelle 22 gezeigt. Hier wurden tHA-BOECs, entsprechend der Tabelle 21, mit der PD 31,49 verwendet und das eingesetzte QC-Vial mit tHA-BOECs hatte die Charge und Kennzeichnung „HA1 VEC F8 3×10^6 15.03.2018“. Dieselbe Charge wurde anschließend auf Trockeneis nach UPO geschickt. Die durchgeführten Methoden zu den jeweiligen Qualitätskriterien sind in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Des Weiteren ist die Bewertung der Ergebnisse der Qualitätskontrolle, inklusive der Freigabe der Zellen für die Verwendung in der Biodistributionsstudie, in Tabelle 22 gezeigt.

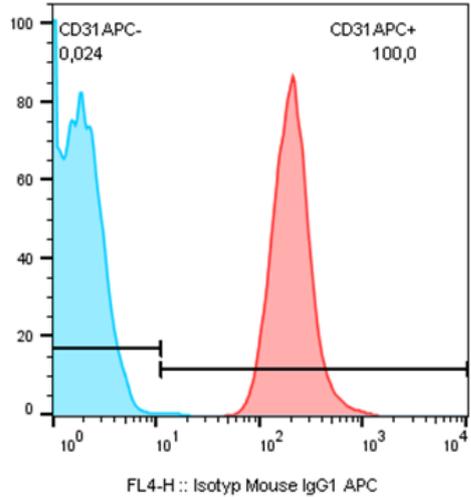
Tabelle 22 Qualitätskriterien, Spezifikationen und Ergebnisse der Qualitätskontrolle von tHA-BOECs nach Expansion.

Qualitätskriterium	Spezifikation	Ergebnisse
Identität	Endothelzellspezifische Pflastersteinmorphologie	<p>Nach dem Auftauen: Bezeichnung: HA1 P10 VEC F8 23.03.2018 Unterer Bereich der Zellkulturflasche:</p>  <p>Mittlerer Bereich der Zellkulturflasche:</p>

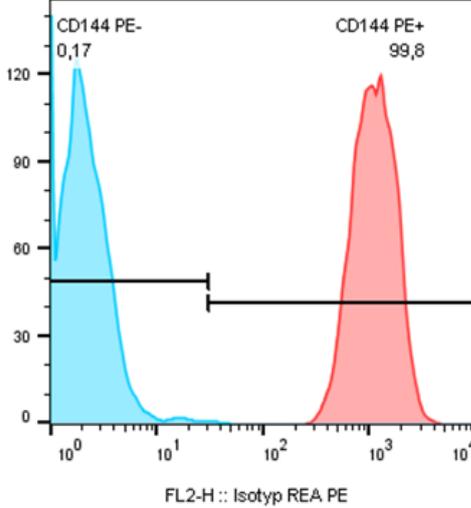
		 <p>Oberer Bereich der Zellkulturflasche:</p>  <p>Vor der Kryokonservierung: Bezeichnung: HA1 P9 VEC F8 15.03.2018 Mittlerer Bereich der Zellkulturflasche:</p>  <p>Die mikroskopischen Bilder bestätigen die typische endothelzellspezifische Pflastersteinmorphologie der BOECs vor dem Kryokonservieren und nach dem Auftauen eines QC-Vials. → Die Spezifikation wurde erfüllt.</p>
Reinheit	CD31+: ≥ 95,0% CD144+: ≥ 95,0% CD45-: ≤ 10,0%	Bezeichnung: HA1 P10 VEC F8 19.03.2018 Gatingstrategie:



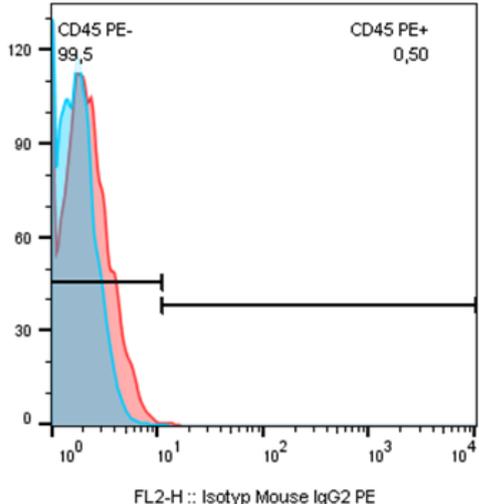
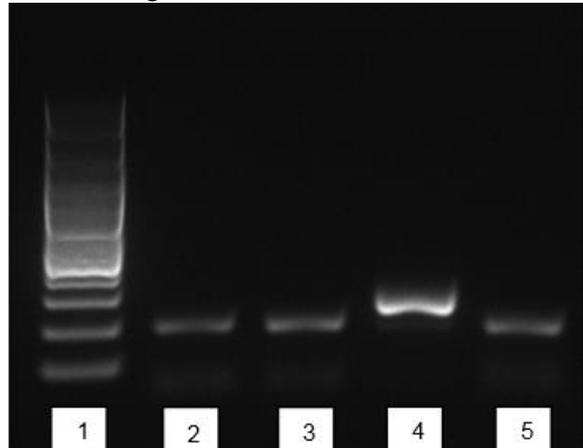
Zellmarker CD31:



Zellmarker CD144:



Zellmarker CD45:

		 <p>BOECs wurden mit Antikörpern inkubiert, die spezifisch für die jeweiligen Oberflächenmarker sind (rot), und mit Isotypenkontrollen als Negativkontrollen (blau) verglichen.</p> <p>Zellmarkerexpression: CD31+: 100,0% CD144+: 99,8% CD45-: 0,5% → Die Spezifikationen wurden erfüllt.</p>
Menge und Alter	PD-Bereich: 30,00-40,00 PDs PDT-Bereich: 1,00-3,00 Tage Menge: $\geq 30,00 \times 10^6$	42 QC-Vials wurden kryokonserviert. Beschriftung: HA1 P10 VEC F8 15.03.2018 Zellzahl/Vial: 3×10^6 PD: 31,49 PDT: 2,10 Tage Gesamtmenge: $132,40 \times 10^6$ → Die Spezifikationen wurden erfüllt.
Mikrobiologische Sicherheit	Abwesenheit von Bakterien und Pilzen	Bezeichnung: HA1 P10 VEC F8 23.03.2018 Die mikroskopische Betrachtung zeigte keine Hinweise für mikrobiologische Kontaminationen (siehe Beispielbilder unter Identität). → Die Spezifikationen wurden erfüllt.
Mykoplasmafreiheit	Nachweis von Mykoplasma-DNA negativ	Bezeichnung: HA1 P10 VEC F8 23.03.2018 

		1. DNA Referenzmarker 100kb 2. Probe: HA1 P10 VEC F8 23.03.2018 3. Probe: verwendetes Zellkulturmedium 4. Positivkontrolle (Mykoplasma-DNA) 5. Negativkontrolle (PCR-Wasser) Es sind keine Mykoplasmakontaminationen nachweisbar. → Die Spezifikation wurde erfüllt.
Endotoxinfreiheit	Endotoxinlevel $\leq 1,00$ IU/ml	Bezeichnung: HA1 P10 VEC F8 23.03.2018 Endotoxingehalt: $< 1,00$ IU/ml Der Test wurde nach Einsenden der Proben von einem spezialisierten Labor durchgeführt. → Die Spezifikation wurde erfüllt.
Viabilität nach dem Auftauen	Viabilität $\geq 70\%$	QC-Vial Beschriftung: HA1 P10 VEC F8 15.03.2018 Menge kryokonservierter BOECs: $3,00 \times 10^6$ Ergebnis der Zellzählung nach dem Auftauen: $1,45 \times 10^6$ Viabilität: 48% → Die Spezifikation wurde nicht erfüllt. Weiteres Vorgehen siehe Bewertung und Freigabe.
Bewertung und Freigabe: Alle Freigabespezifikationen für den Einsatz der BOECs in einer präklinischen Studie wurden erfüllt, mit Ausnahme des Viabilitätskriteriums nach dem Auftauen der BOECs. Die kryokonservierten BOECs wurden für die Biodistributionsstudie nach UPO verschickt und die Viabilität nach dem Auftauen wurde dort für drei weitere QC-Vials überprüft. Die Viabilität lag hier jeweils über 70% und die BOECs wurden für die Anwendung in der Biodistributionsstudie freigegeben.		

3.3 Methodenentwicklung und Methodvalidierung zur Durchführung von Biodistributionsstudien

Die Entwicklungs- und Robustheitsversuche beinhalten die Untersuchung folgender Parameter hinsichtlich ihres Einflusses auf die Performance der qPCR in chronologischer Reihenfolge:

- Annealingtemperatur
- Primerkonzentration
- Hydrolyse-Sondenkonzentration
- Reproduzierbarkeit und Proof-of-Concept
- Elongationszeit
- Einfluss TE-Puffer bzw. EDTA
- Wiederfindungsrate
- Hydrolyse-Sondenstabilität

- Kontaminationskontrolle und Amplikonstruktur

Dementsprechend sind im Folgenden die Ergebnisse zu diesen Entwicklungs- und Robustheitsexperimenten gezeigt. Die Daten zur Methodenentwicklung, zu den Robustheitsuntersuchungen und der Methodvalidierung wurden bereits veröffentlicht und entsprechen daher den dort gezeigten Daten (86).

3.3.1 Methodenentwicklung und Robustheitstest

Das erste Experiment wurde entsprechend dem initialen qPCR-Protokoll mit 40 qPCR-Zyklen durchgeführt. Dies führte dazu, dass die C_q-Werte der Standardsamples STD10E5 und STD10E6 in den Grenzbereich von Zyklus 35 bis 40 des LightCyclers® 480 fielen. Für Proben, die in diesen Bereich fallen, wird keine genaue Konzentration berechnet, sondern es wird eine Grenzkonzentration für den C_q-Wert 35 berechnet. Da zwei Standardsamples in diesem Bereich lagen, konnte eine exakte Quantifizierung nicht gewährleistet werden (siehe Abbildung 7).

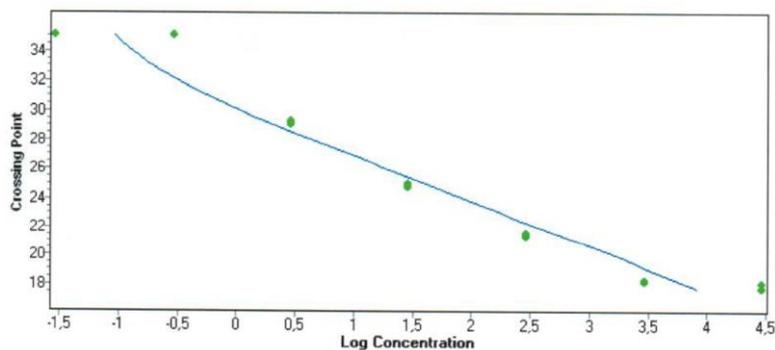


Abbildung 7 Kalibrationskurve erstellt mit den Standardsamples STD hgDNA und STD10E1-STD10E6.

Deshalb war der erste Anpassungsschritt die Erhöhung der Anzahl an qPCR-Zyklen von 40 auf 45, wobei nun der neue Grenzbereich bei C_q-Werten von 40 bis 45 lag. Anschließend wurde der Einfluss verschiedener Annealingtemperaturen und Primerkonzentrationen auf die qPCR-Performance und die Sensitivität getestet. Abbildung 8 zeigt die Daten der Experimente zur Untersuchung von drei verschiedenen Annealingtemperaturen. Tabelle 23 zeigt die Parameter zur Beurteilung der Eignung der Kalibrationskurve.

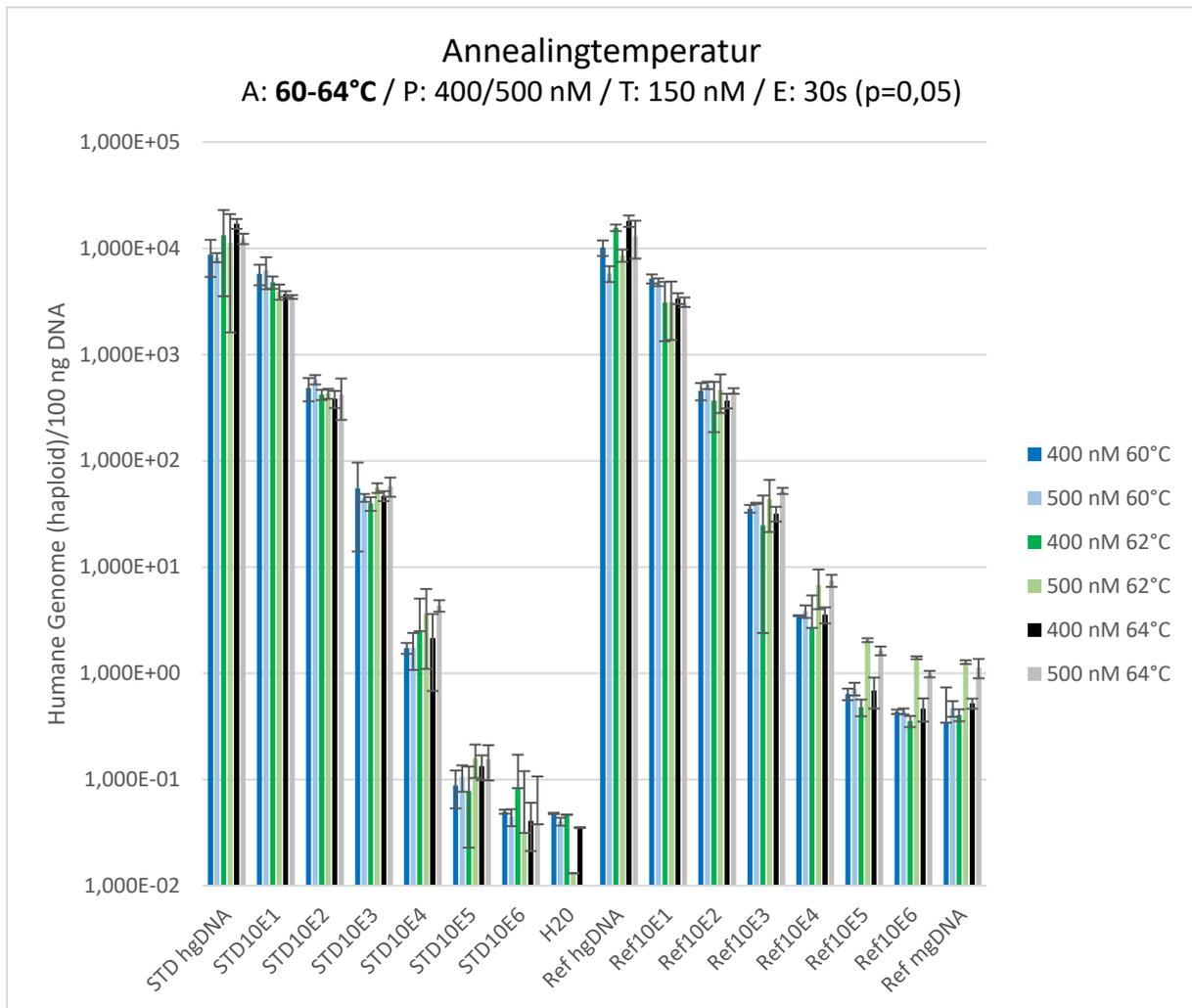


Abbildung 8 Konzentration an haploiden humanen Genomen für Standardsamples und Referenzstandards nach Anwendung des initialen qPCR-Protokolls mit 45 qPCR-Zyklen, zwei Primerkonzentrationen, 400 nM und 500 nM, und Annealingtemperaturen von 60°C bis 64°C. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von drei Replikaten (n=3) für die verschiedenen Proben dar. Für das Experiment 500 nM 62°C stellen die Daten für H₂O den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von zwei Replikaten (n=2) dar; das dritte Replikat war negativ. Für das Experiment 400 nM 62°C stellen die Daten für H₂O den Wert der haploiden Genomkonzentration von einem Replikate (n=1) dar; die anderen zwei Replikate waren negativ. Für das Experiment 400 nM 64°C stellen die Daten für H₂O den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von zwei Replikaten (n=2) dar; das dritte Replikat war negativ. Für das Experiment 500 nM 64°C konnte kein Signal für H₂O gemessen werden. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall für das Signifikanzniveau p=0,05 dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, H₂O = Nichtzielkontrolle.

Tabelle 23 Parameter zur Beurteilung der Eignung der Kalibrationskurve für die Experimente zur Untersuchung der Annealingtemperatur.

Parameter	400 nM 60°C	500 nM 60°C
Fehlerwert	0,1250	0,1310
Effizienz (%)	2,063 (103,2%)	2,064 (103,2%)
Geradensteigung	-3,179	-3,177

Y-Intercept	28,85	28,70
Parameter	400 nM 62°C	500 nM 62°C
Fehlerwert	0,1090	0,0899
Effizienz (%)	2,058 (102,9%)	1,845 (92,3%)
Geradensteigung	-3,190	-3,760
Y-Intercept	29,69	31,20
Parameter	400 nM 64°C	500 nM 64°C
Fehlerwert	0,0765	0,0883
Effizienz (%)	2,017 (100,9%)	1,845 (92,3%)
Geradensteigung	-3,281	-3,760
Y-Intercept	31,91	33,07

Die Ergebnisse der qPCR-Experimente zur Untersuchung verschiedener Annealingtemperaturen zeigen Folgendes:

- Das benötigte Quantifizierungslimit von 1:1.000.000, d.h. ein signifikanter Unterschied in der Konzentration an humanen Genomen zwischen Ref10E6 und Ref mgDNA, wurde mit den bisherigen qPCR-Konditionen nicht erreicht.
- Die Erhöhung der Annealingtemperatur mit dem primären Ziel der Verbesserung der Spezifität und dadurch der Sensitivität der Methode (87) brachte keine ausreichende Verbesserung.
- Eine Erhöhung der Annealingtemperatur führte zu einer Erhöhung der Cq-Werte ohne signifikante Veränderung der Konzentration der Referenzstandards. Für das Standardsample STD10E6 fielen einige Werte in den Grenzbereich Cq-Wert ist gleich 40, der keine genaue Quantifizierung erlaubt.
- Die Beurteilung der Parameter für die Bewertung der Eignung der Kalibrationskurve variieren; hier war noch kein Trend festzustellen und zur Bewertung mussten zuerst weitere Daten generiert werden bzw. die qPCR-Konditionen optimiert werden.
- In der Nichtzielkontrolle (H₂O) wurde ebenfalls ein Signal gemessen.
- Die Cq-Werte der Nichtzielkontrolle waren höher bzw. es waren durchschnittlich mehr Proben negativ bei höheren Annealingtemperaturen.

Da für das Standardsample STD10E6 einige Werte in den Grenzbereich Cq-Wert ist gleich 40 fielen, müsste bei der Anwendung höherer Annealingtemperaturen die maximale Anzahl an qPCR-Zyklen gesteigert werden. Obwohl die Nichtzielkontrolle bei höheren Temperaturen und 45 qPCR-Zyklen negative Werte zeigte, besteht jedoch bei Erhöhung der qPCR-Zyklen über 45 wiederum die

Möglichkeit der Bildung ungewollter qPCR-Produkte und eines falsch-positiven Signals. Deshalb wurden die anschließenden Experimente zu Primer- und Hydrolyse-Sondenkonzentrationen bei 60°C durchgeführt. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Primerkonzentrationen hinsichtlich des Einflusses auf die gemessenen Konzentrationswerte für Standardsamples und Referenzstandards. Abbildung 10 zeigt die bestimmten Cq-Werte für Standardsamples und Referenzstandards bei unterschiedlichen Primerkonzentrationen.

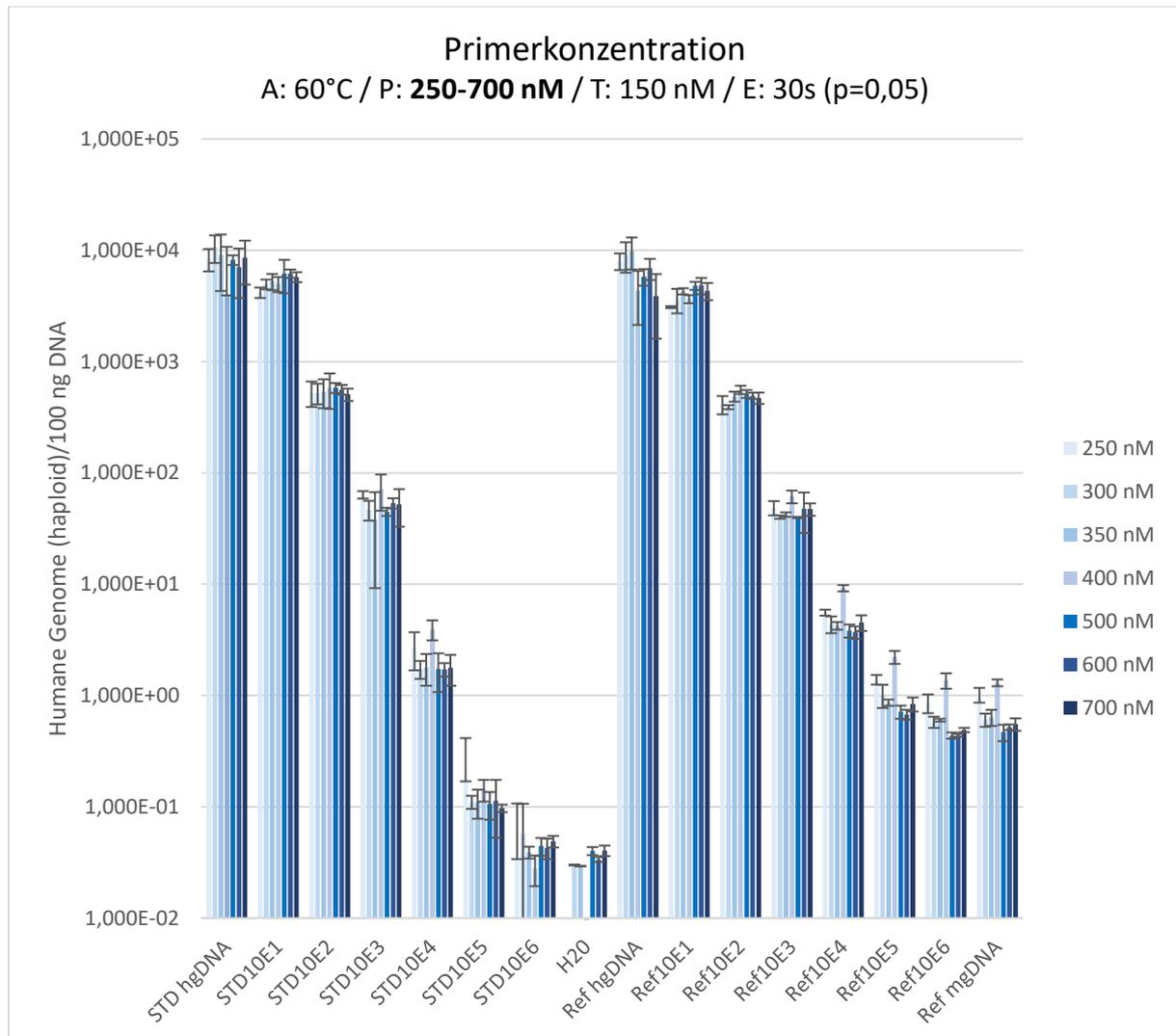


Abbildung 9 Konzentration an haploiden humanen Genomen für Standardsamples und Referenzstandards nach Anwendung des initialen qPCR-Protokolls mit 45 qPCR-Zyklen, 60°C Annealingtemperatur und sieben verschiedenen Primerkonzentrationen. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von drei Replikaten (n=3) für die verschiedenen Proben dar. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall für das Signifikanzniveau p=0,05 dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, H₂O = Nichtzielkontrolle.

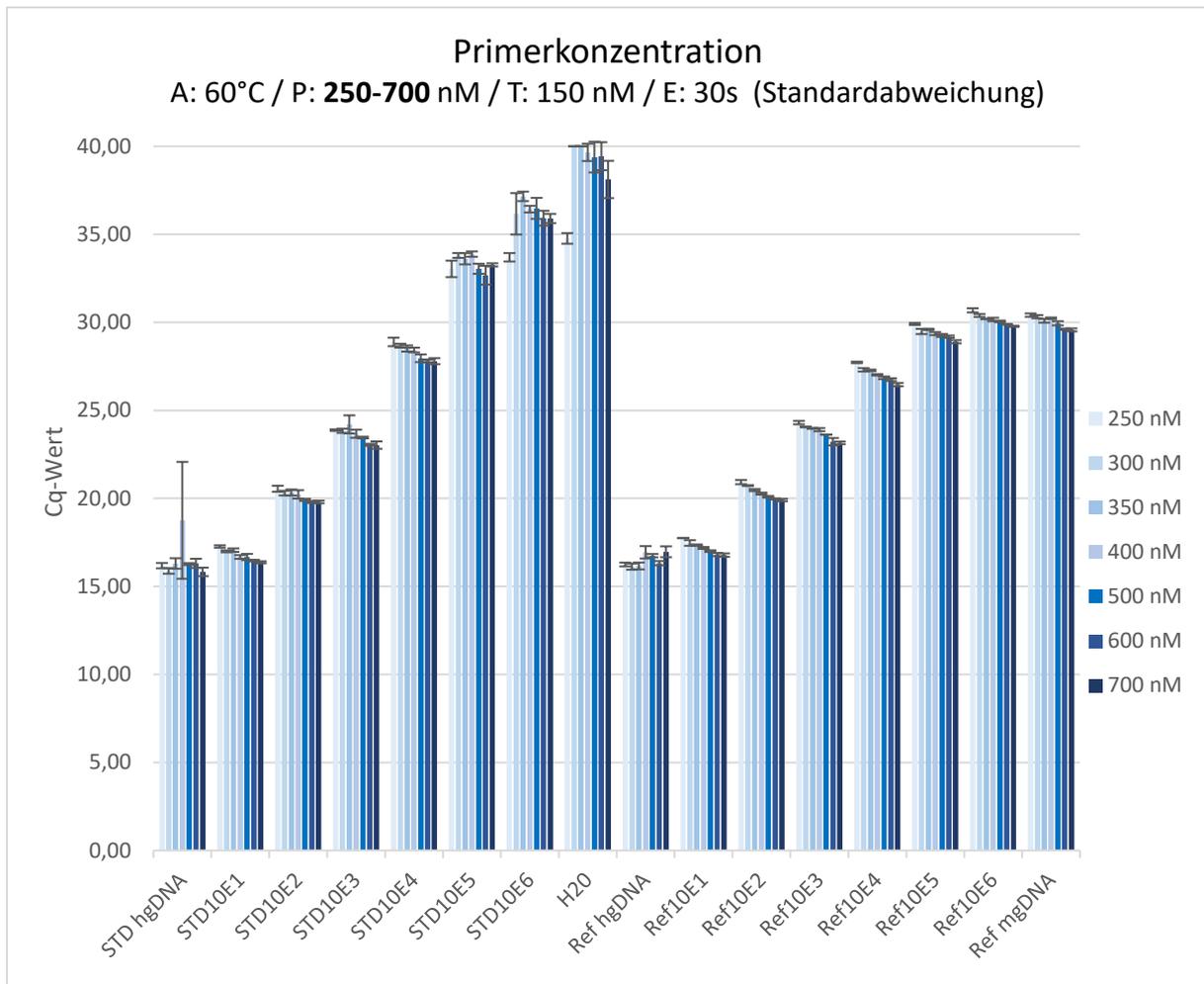


Abbildung 10 Cq-Werte für Standardsamples und Referenzstandards nach Anwendung des initialen qPCR-Protokolls mit 45 qPCR-Zyklen, 60°C Annealingtemperatur und sieben verschiedenen Primerkonzentrationen. Die Daten stellen den Mittelwert der Cq-Werte von drei Replikaten (n=3) für die verschiedenen Proben dar. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, H₂O = Nichtzielkontrolle.

Die in Abbildung 9 und 10 gezeigten Daten weisen darauf hin, dass die qPCR-Methode hinsichtlich verschiedener Primerkonzentrationen grundsätzlich sehr robust ist. In Abbildung 9 sind relativ konstante und kaum signifikant unterschiedliche Konzentrationen an humanen Genomen für fast alle Standardsamples und Referenzstandards zwischen den verschiedenen Experimenten mit Primerkonzentrationen von 250 nM bis 700 nM zu erkennen. Die einzige Ausnahme waren die Konzentrationswerte der Referenzstandards Ref10E4-Ref10E6 und Ref mgDNA für die Primerkonzentration 400 nM. Diese Werte sind sehr wahrscheinlich Ausreißer, da bei den Experimenten 400 nM 62°C und vor allem 400 nM 60°C der ersten Versuchsreihe (siehe Abbildung 8) keine erhöhten Genomkonzentrationen bei dieser Konzentration gemessen wurden. Bei der Betrachtung der Cq-Werte für die verschiedenen Primerkonzentrationen ist ein leichter Abfall der durchschnittlichen Cq-Werte von der niedrigsten bis zur höchsten Primerkonzentration mit einem Plateau beginnend bei der Konzentration 600 nM festzustellen. Ausnahmen hiervon sind das

Standardsample STD hgDNA und der Referenzstandard Ref hgDNA. Da erst ab Primerkonzentrationen, die kleiner als 400 nM sind, bis hin zu einer Konzentration von 250 nM ein deutlicher Anstieg der Cq-Werte erkennbar ist, wurde die zukünftig anzuwendende Primerkonzentration auf 400 nM festgelegt. Aufgrund des Plateaus, beginnend bei der Primerkonzentration 600 nM, wurden keine höheren Primerkonzentrationen evaluiert. Die Ergebnisse der anschließenden Experimente zur Untersuchung von verschiedenen Hydrolyse-Sondenkonzentrationen sind in Abbildung 11 gezeigt.

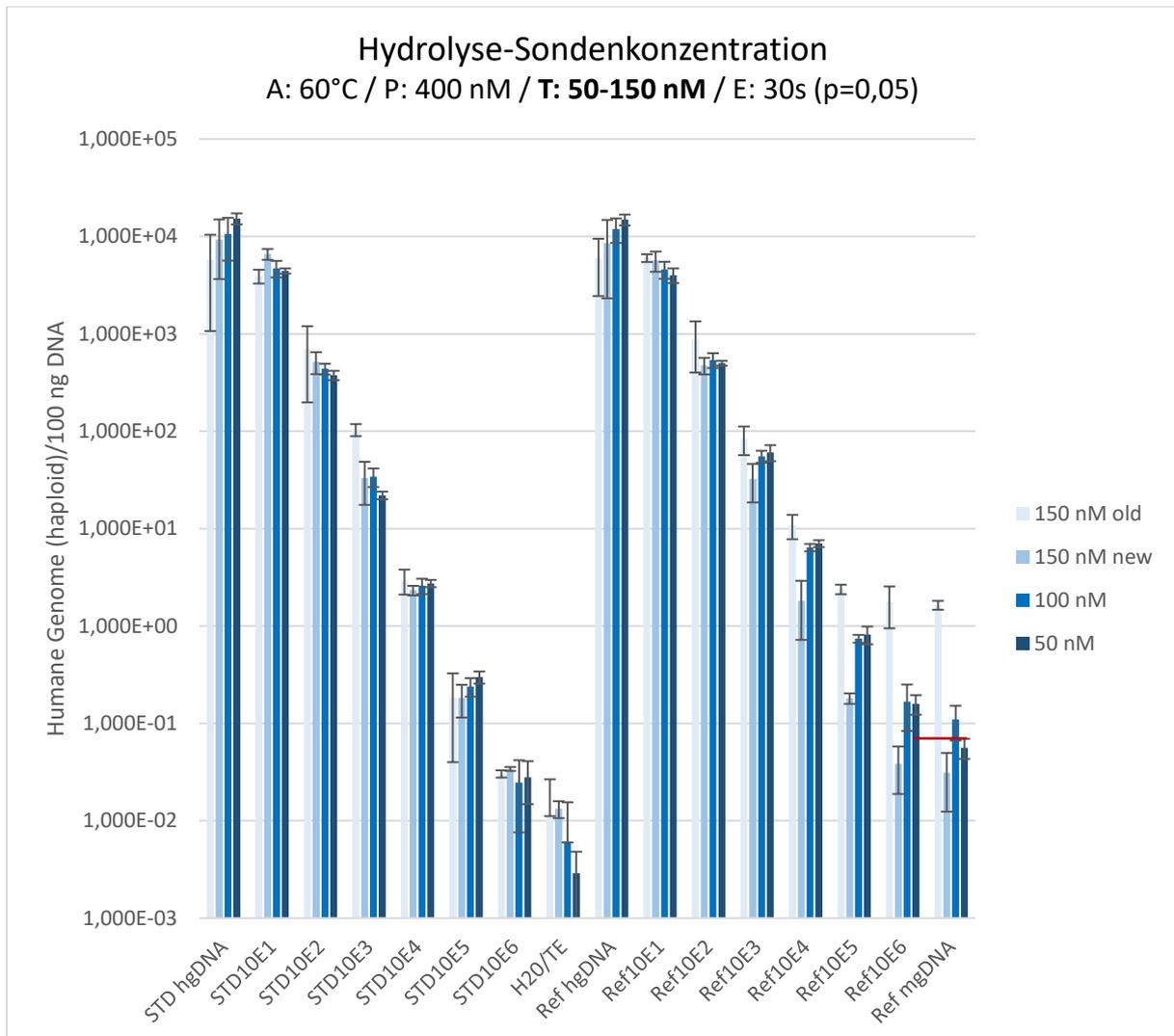


Abbildung 11 Konzentration an haploiden humanen Genomen für Standardsamples und Referenzstandards nach Anwendung des initialen qPCR-Protokolls mit 45 qPCR-Zyklen, 60°C Annealingtemperatur, 400 nM Primerkonzentration und drei verschiedenen Hydrolyse-Sondenkonzentrationen. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von drei Replikaten (n=3) für die Experimente 150 nM new und 150 nM old und von fünf Replikaten (n=5) für die Experimente 100 nM und 50 nM für die verschiedenen Proben dar. Für das Experiment 150 nM new stellen die Daten für H₂O den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von zwei Replikaten (n=2) dar; das dritte Replikate war negativ. Die Bezeichnungen old und new deuten auf die Verwendung unterschiedlicher Chargen von Standardsamples und Referenzstandards hin. Für die Experimente 150 nM new, 100 nM und 50 nM wurde jeweils die gleiche Charge an Standardsamples und Referenzstandards benutzt. Die rote Linie zeigt die Erfüllung der Anforderungen an das definierte Quantifizierungslimit bei dem Experiment 50 nM an. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall für das Signifikanzniveau p=0,05 dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, H₂O/TE = Nichtzielkontrolle, TE = TE-Puffer.

Die Daten in Abbildung 11 zeigen, dass die Hydrolyse-Sonde und ihre eingesetzte Konzentration einen starken Einfluss auf die Sensitivität der qPCR-Methode haben (28, 74). So konnte bei Hydrolyse-Sondenkonzentrationen von 150 nM und 100 nM kein signifikanter Konzentrationsunterschied an humanen Genomen für den Referenzstandard Ref10E6 im Vergleich zu Ref mgDNA festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Hydrolyse-Sondenkonzentration von 50 nM ein signifikanter Unterschied bei der Konzentration an humanen Genomen zwischen diesen beiden Referenzstandards gezeigt werden (siehe rote Linie Abbildung 11). Folglich wurde erstmalig bei einer Hydrolyse-Sondenkonzentration von 50 nM das geforderte Quantifizierungslimit erreicht. Die Anwendung einer Hydrolyse-Sondenkonzentration von 50 nM zeigte zusätzlich eine, im Vergleich zu den anderen Konzentrationen von 100 nM und 150 nM, im Durchschnitt höhere Konzentration an haploiden Genomen bei dem Standardsample STD hgDNA und dem Referenzstandard Ref hgDNA. Für beide war, im Vergleich zu den bisherigen Experimenten, ein deutlicher signifikanter Unterschied in der Konzentration an haploiden Genomen im Vergleich zu dem um den Faktor zehn verdünnten Standardsample STD10E1 bzw. Referenzstandard Ref10E1 erkennbar. Beim Vergleich der Daten für die unterschiedlichen Chargen der Referenzstandards ist zu beachten, dass die neue Charge (new, 2018-07-12) durch eine Änderung in der Herstellung ein leicht anderes Konzentrationsverhältnis besitzt. Dies hat aber keinen Einfluss auf die Bewertung der Daten, da diese Charge an Referenzstandards ab Ref10E2 ein Verhältnis von humanen Genomen zu murinen Genomen von 1:110, 1:1100, usw. hat im Vergleich zu 1:100, 1:1000, usw. Der Grund hierfür ist, dass dies einer höheren Sensitivität und damit einem höheren Quantifizierungslimit entspricht. Alle weiteren Referenzstandards wurden anschließend mit dem Verhältnis 1:100, 1:1000, usw. hergestellt. Da das Experiment mit einer Hydrolyse-Sondenkonzentration von 50 nM (siehe auch Exp. 1 in Abbildung 12) erstmalig die Anforderungen an das benötigte Quantifizierungslimit erfüllte, wurde dieses Experiment zunächst für den Proof-of-Concept verwendet und von zwei weiteren Mitarbeitern reproduziert (siehe Abbildung 12). Des Weiteren wurden keine weiteren Hydrolyse-Sondenkonzentrationen, die höher als 150 nM sind, untersucht.

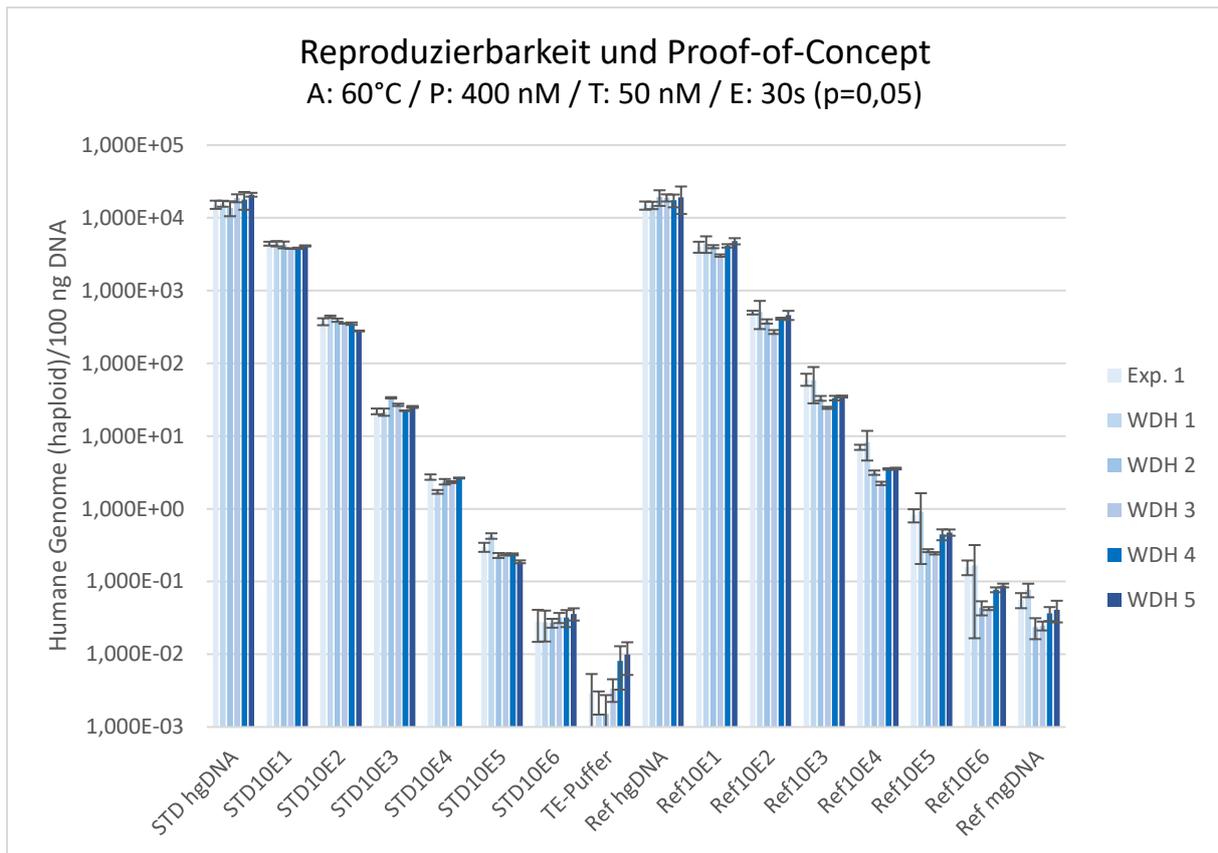


Abbildung 12 Konzentration an haploiden humanen Genomen für Standardsamples und Referenzstandards nach Anwendung des initialen qPCR-Protokolls mit 45 qPCR-Zyklen, 60°C Annealingtemperatur, 400 nM Primerkonzentration und 50 nM Hydrolyse-Sondenkonzentration für Experiment 1 (Exp.1) und die Wiederholungsexperimente (WDH) 1-5. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von fünf Replikaten (n=5) für die verschiedenen Proben dar. Für das Experiment WDH 3 stellen die Daten für TE-Puffer den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von drei Replikaten (n=3) dar; zwei Replikate waren negativ. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall für das Signifikanzniveau $p=0,05$ dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, TE-Puffer = Nichtzielkontrolle.

Tabelle 24 zeigt die Parameter zur Beurteilung der Eignung der Kalibrationskurven für Experiment 1 und die Wiederholungsexperimente 1-5.

Tabelle 24 Parameter zur Beurteilung der Eignung der Kalibrationskurven für Experiment 1 und die Wiederholungsexperimente 1-5 für die Reproduzierbarkeit und den Proof-of-Concept. Veränderte Parameter zwischen den Wiederholungsexperimenten waren das Pipettierschema, die verwendete Charge an Standardsamples und Referenzstandards sowie der Operator.

Parameter	Exp.1	WDH 1	WDH 2	WDH 3	WDH 4	WDH 5
Fehlerwert	0,0507	0,0675	0,0559	0,0379	0,0365	0,0496
Effizienz (%)	1,828 (91,4%)	1,825 (91,3%)	1,976 (98,8%)	2,006 (100,3%)	1,998 (99,9%)	2,032 (101,6%)
Geradensteigung	-3,817	-3,829	-3,381	-3,307	-3,327	-3,246
Y-Intercept	30,10	30,04	27,89	27,40	27,61	27,52
Pipettierschema	Alt ^a	Alt	Neu ^b	Neu	Neu	Neu
Charge Standardsamples und Referenzstandards	2018-07-12	2018-07-12	2018-07-12	2018-07-27	2018-07-27	2018-07-27

Operator (OP)	OP1	OP2	OP2	OP3	OP2	OP1
^a Initiales Pipettierschema siehe Kapitel 2.3.1. ^b Neues Pipettierschema beschrieben in Kapitel 2.3.2.						

Obwohl das Quantifizierungslimit bei Experiment 1 erreicht wurde, lag die Effizienz der qPCR in diesem Experiment nur bei 91,4% und die Steigung der Kalibrationskurve außerhalb der Spezifikation. Das Wiederholungsexperiment 1 bestätigte diese Werte und zeigte außerdem aufgrund zu hoher Standardabweichungen keinen signifikanten Unterschied in der Konzentration an haploiden humanen Genomen zwischen dem Referenzstandard Ref10E6 und der Backgroundkontrolle Ref mgDNA. Zur Verringerung der Standardabweichungen, der Verminderung von Fehlerpotenzialen beim Pipettieren durch das Vereinfachen der Pipettierschritte und der weiteren bzw. verstärkten Vermeidung von DNA-Kontaminationen wurde ab Wiederholungsexperiment 2 das Pipettierschema angepasst (88). Für alle nachfolgenden Experimente wurde nun das neue Pipettierschema, wie im finalen qPCR-Protokoll im Kapitel 2.3.2 beschrieben, angewendet. Das Wiederholungsexperiment 3 war die erste Durchführung von Operator OP3 und zeigte eine hohe Effizienz bei der Amplifikation des qPCR-Produkts und einen geeigneten Wert für die Geradensteigung und den Fehlerwert. Auch das geforderte Quantifizierungslimit konnte im Wiederholungsexperiment 3 reproduziert werden. Um den Einfluss der Herstellung der weiteren Charge von Referenzstandards, Charge 2018-07-27, und den Einfluss des für die Charge 2018-07-12 marginal veränderten Konzentrationsverhältnisses zu untersuchen, wurden anschließend die Experimente WDH 4-6 von drei verschiedenen Operatoren mit der Charge 2018-07-27 durchgeführt. Für diese drei Experimente lagen alle Parameter zur Beurteilung der Kalibrationskurven innerhalb der Spezifikation und auch das Quantifizierungslimit wurde erreicht. Des Weiteren wurde festgestellt, dass sowohl Experiment 1 als auch die Wiederholungsexperimente 1-5 konstante und vergleichbare Werte für die Standardsamples im Vergleich zu den Referenzstandards zeigen. Ein geringer aber erwarteter Einfluss bei der Verdünnung von hgDNA in mgDNA anstatt in TE-Puffer ist nur beim am stärksten verdünnten Referenzstandard Ref10E6 erkennbar. Deshalb wurden für die nachfolgenden Experimente, inklusive der Validierungsexperimente, die Referenzstandards zur Erstellung der Kalibrationskurven verwendet. Auf diese Weise kann der Einfluss der Matrixkomponente, mgDNA, bei den Biodistributionsproben so exakt wie möglich abgebildet werden. Abschließend konnte für die Wiederholungsexperimente 4-6 auch ein signifikanter Konzentrationsunterschied an humanen Genomen zwischen dem Referenzstandard Ref10E6 und der Backgroundkontrolle Ref mgDNA bei einem Signifikanzniveau von $p=0,01$ erreicht werden. Deshalb wurde dieses als Maßstab für die folgenden Experimente sowie für die Validierungsexperimente eingeführt. In den nächsten Experimenten wurde der Einfluss der Veränderung der Elongationszeit auf die qPCR-Performance getestet (siehe Abbildung 13 und Tabelle 25).

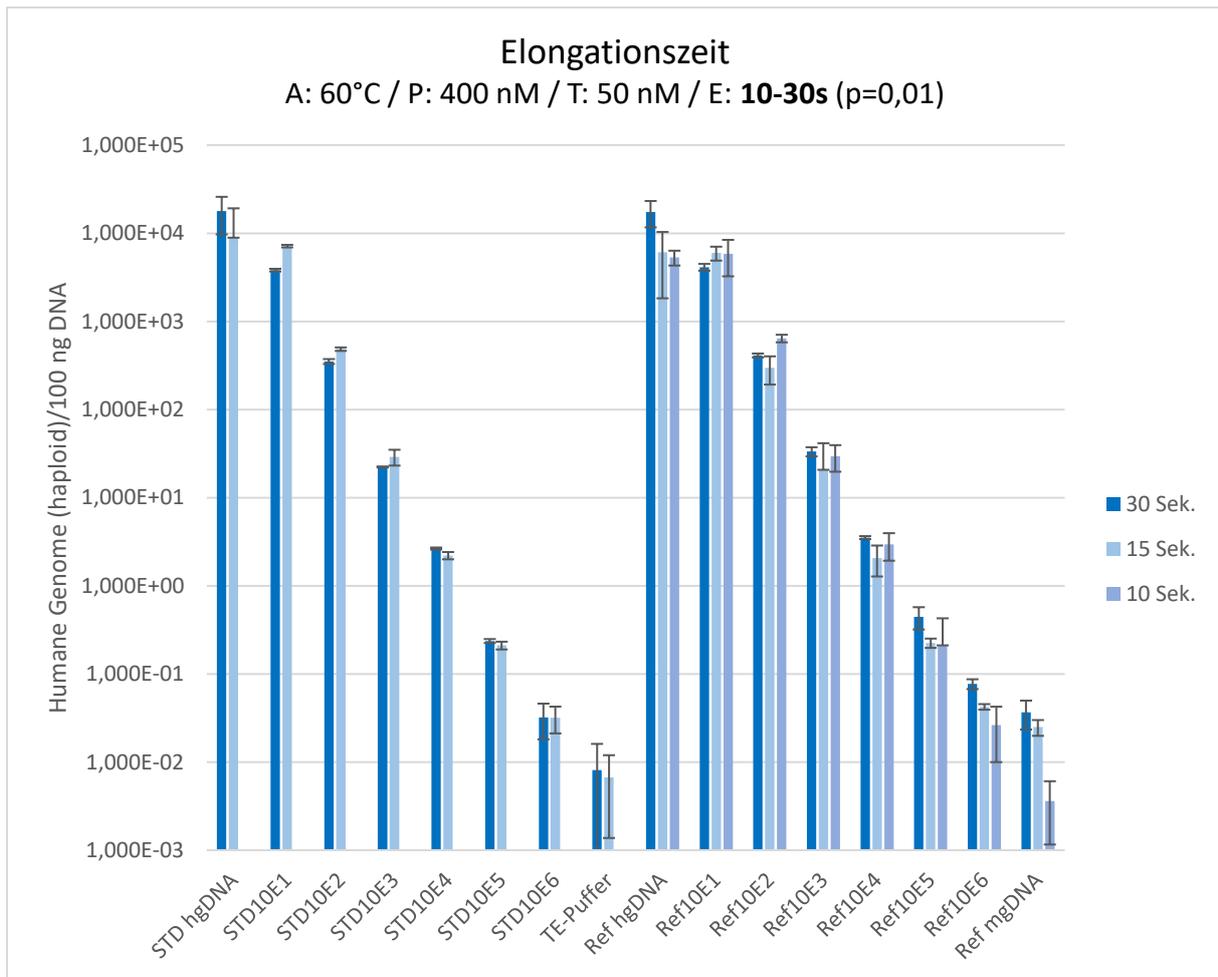


Abbildung 13 Konzentration an haploiden humanen Genomen für Standardsamples und Referenzstandards nach Anwendung des initialen qPCR-Protokolls mit 45 qPCR-Zyklen, 60°C Annealingtemperatur, 400 nM Primerkonzentration, 50 nM Hydrolyse-Sondenkonzentration und drei verschiedene Elongationszeiten. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von fünf Replikaten (n=5) für die verschiedenen Proben dar. Für das Experiment mit 10 Sek. Elongationszeit waren alle Replikate für TE-Puffer negativ. Dieses Experiment wurde nur mit Referenzstandards durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall für das Signifikanzniveau p=0,01 dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, TE-Puffer = Nichtzielkontrolle.

Tabelle 25 Parameter zur Beurteilung der Eignung der Kalibrationskurve für die Experimente mit drei verschiedenen Elongationszeiten.

Parameter	30 Sek. Elongation ^a	15 Sek. Elongation	10 Sek. Elongation
Fehlerwert	0,0365	0,1110	0,1270
Effizienz (%)	1,998 (99,9%)	2,153 (107,7%)	2,142 (107,1%)
Geradensteigung	-3,327	-3,003 ^b	-3,022 ^b
Y-Intercept	27,61	28,77	30,77

^aFür das Experiment mit 30 Sek. Elongationszeit wurden die Daten aus Wiederholungsexperiment 5 ausgewählt. ^bDie Werte für die Geradensteigung liegen außerhalb der Spezifikation.

Die Daten für die qPCR-Experimente mit verkürzter Elongationszeit zeigen eine deutliche Erhöhung der Effizienz bei der Vermehrung des Amplikons, einen deutlich erhöhten Fehlerwert und eine Geradensteigung, die außerhalb der Spezifikation liegt. Außerdem waren vor allem beim Experiment mit 10 Sek. Elongationszeit, im Vergleich zu dem Experiment mit 30 Sek. Elongationszeit, die Standardabweichungen für fast alle Referenzstandards erhöht. Das benötigte Quantifizierungslimit wurde bei allen Experimenten erreicht. Jedoch war die Nichtzielkontrolle nur bei einer Elongationszeit von 10 Sek. komplett negativ. Die Hauptgründe, warum für das finale qPCR-Protokoll die Elongationszeit auf 30 Sekunden festgelegt wurde, waren erstens die verringerte Konzentration an humanen Genomen bei dem Referenzstandard Ref hgDNA bei den Experimenten mit verkürzter Elongationszeit. Dies hatte zur Folge, dass kein signifikanter Konzentrationsunterschied an humanen Genomen zwischen Ref hgDNA und Ref10E1 gemessen wurde. Dies ist auch eine mögliche Ursache für die Nichterfüllung der Spezifikation für die Steigung der Kalibrationskurve. Zweitens waren die mehr als doppelt so hohen Fehlerwerte nicht akzeptabel. Ein weiterer Grund war außerdem die durchschnittliche Erhöhung der Cq-Werte für die Referenzstandards bei Verringerung der Elongationszeit. Besonders die Backgroundkontrolle zeigte, verbunden mit der erhöhten Standardabweichung, Cq-Werte, die zu nahe am Grenzbereich des qPCR-Cyclers lagen.

In den folgenden Experimenten wurde die Robustheit der qPCR-Methode hinsichtlich des potentiellen Einflusses bei der Erhöhung der Menge an TE-Puffer und des darin enthaltenen EDTAs im Mastermix im Vergleich zu qPCR-Wasser untersucht. Aus den während der Biodistributionsstudie entnommenen Mausorganen wird DNA extrahiert und anschließend in TE-Puffer gelöst. Nach Konzentrationsmessung und gegebenenfalls Verdünnung mit TE-Puffer sollte eine DNA-Konzentration von 100 ng/µl erreicht werden. Jedoch stellte sich heraus, dass diese Konzentration nicht bei allen Mausorganen erreicht werden konnte, woraufhin die untere Konzentrationsgrenze auf 50 ng/µl angepasst wurde. In diesem Fall wird in jedem Well der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 1 µl qPCR-Wasser durch 1 µl TE-Puffer ersetzt. Dies entspricht einer Verdopplung der Konzentration an EDTA. Folglich ist bei dem Experiment 1 µl TE die TE-Pufferkonzentration doppelt so hoch wie zuvor. Das Experiment H₂O wurde mit der Standardmastermixzusammensetzung aus dem initialen qPCR-Protokoll durchgeführt. Zur Untersuchung des worst-case-Szenarios, gezeigt im Experiment TE, wurde das komplette qPCR-Wasser durch TE-Puffer im Mastermix ersetzt (siehe Abbildung 14). EDTA kann als Chelatkomplexbildner Magnesiumionen binden und so die PCR-Effizienz beeinflussen oder die Synthese von DNA negativ beeinflussen (89).

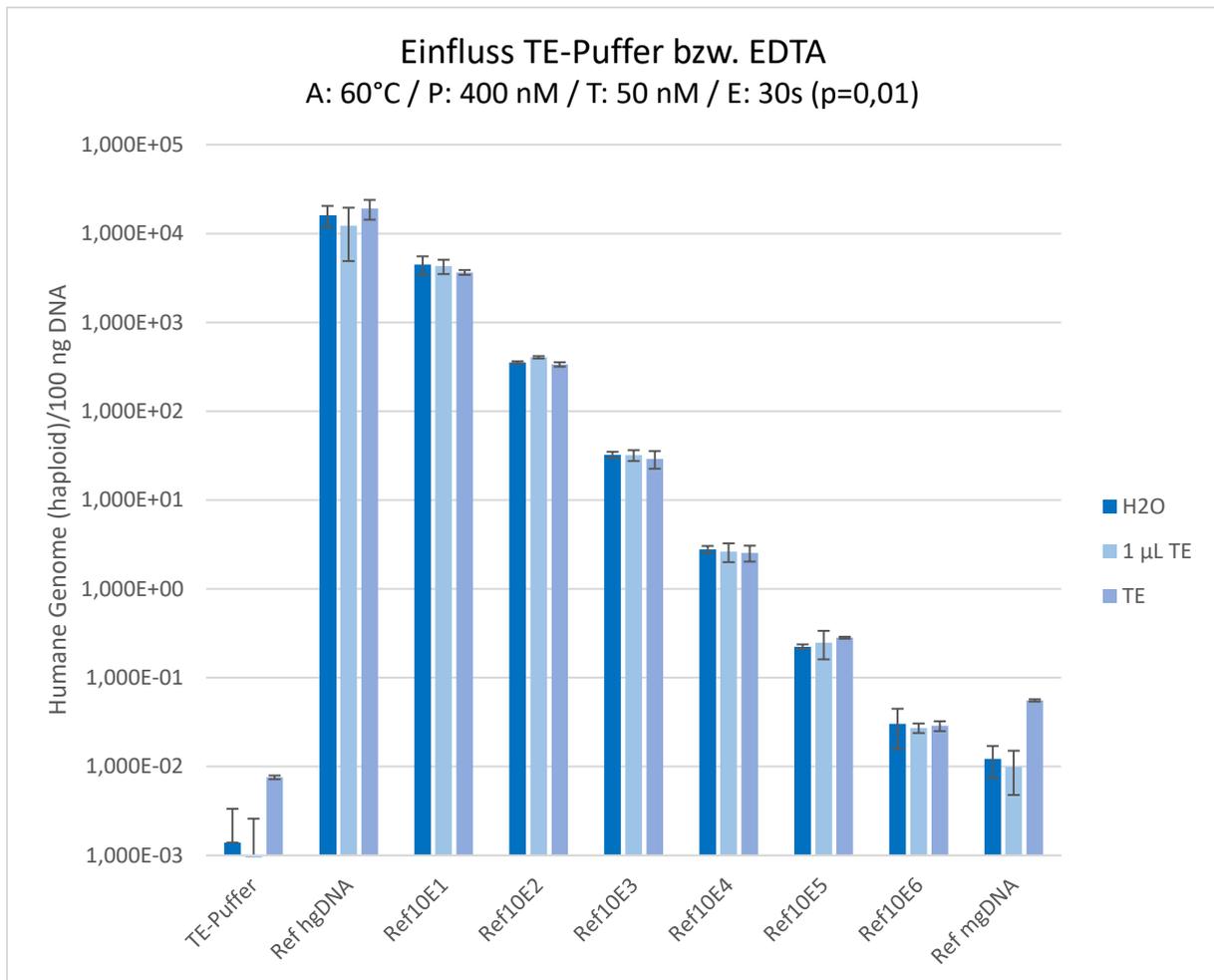


Abbildung 14 Konzentration an haploiden humanen Genomen für die Referenzstandards nach Anwendung des initialen qPCR-Protokolls mit 45 qPCR-Zyklen, 60°C Annealingtemperatur, 400 nM Primerkonzentration, 50 nM Hydrolyse-Sondenkonzentration und 30 Sekunden Elongationszeit. Die Mastermixzusammensetzung des initialen qPCR-Protokolls (H₂O) wurde verglichen mit der Mastermixzusammensetzung aus Experiment 1 µL TE, in dem die doppelte Konzentration an TE-Puffer eingesetzt wurde, und dem Experiment TE, bei dem das ganze qPCR-Wasser durch TE-Puffer ersetzt wurde. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von fünf Replikaten (n=5) für die verschiedenen Proben dar. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall für das Signifikanzniveau p=0,01 dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, TE-Puffer = Nichtzielkontrolle.

Durch die Erhöhung der TE-Pufferkonzentration kam es zu keiner Abweichung bei den Parametern für die Beurteilung der Kalibrationskurven. Grundsätzlich waren auch die Konzentrationen an humanen Genomen für die verschiedenen Referenzstandards vergleichbar. Die Ausnahme war hier der erhöhte Wert der Backgroundkontrolle Ref mgDNA bei dem Experiment TE, dessen Konzentration sogar die Konzentration von Ref10E6 überschritt. Obwohl kein Pipettierfehler oder sonstiger Handlingfehler identifiziert werden konnte, könnte es sich bei diesem Wert aber auch um einen Ausreißer handeln. Auffällig ist jedoch auch die signifikant höhere Konzentration an humanen Genomen der Nichtzielkontrolle beim Experiment TE im Vergleich zu den anderen beiden Experimenten. Die Verdopplung der Konzentration des TE-Puffers im Experiment 1 µL TE zeigte keine veränderten Konzentrationswerte an humanen Genomen für die Referenzstandards. Ebenso lagen alle Parameter

für die Bewertung der Kalibrationskurve innerhalb der Spezifikation. Zusammenfassend führt die notwendige Verdopplung der Konzentration an TE-Puffer im Mastermix zu gleichwertigen Ergebnissen wie das initiale qPCR-Protokoll mit der Standardzusammensetzung des Mastermixes. Als abschließende Maßnahme wurde definiert, dass, falls bei der DNA-Extraktion Konzentrationen unter 50 ng/μl gemessen werden, die DNA dieser Proben aufkonzentriert oder ein weiterer DNA-Isolierungsschritt durchgeführt werden muss.

Der nächste Parameter, der während der Methodenentwicklung untersucht wurde, war die Wiederfindungsrate bzw. eine System-Suitability-Kontrolle (SSC), siehe Herstellung Kapitel 2.3. Hier wurde, ebenso wie für die Untersuchung der Hydrolyse-Sondenstabilität, das finale qPCR-Protokoll angewendet, da zu diesem Zeitpunkt bereits alle hierfür notwendigen Parameter definiert waren. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

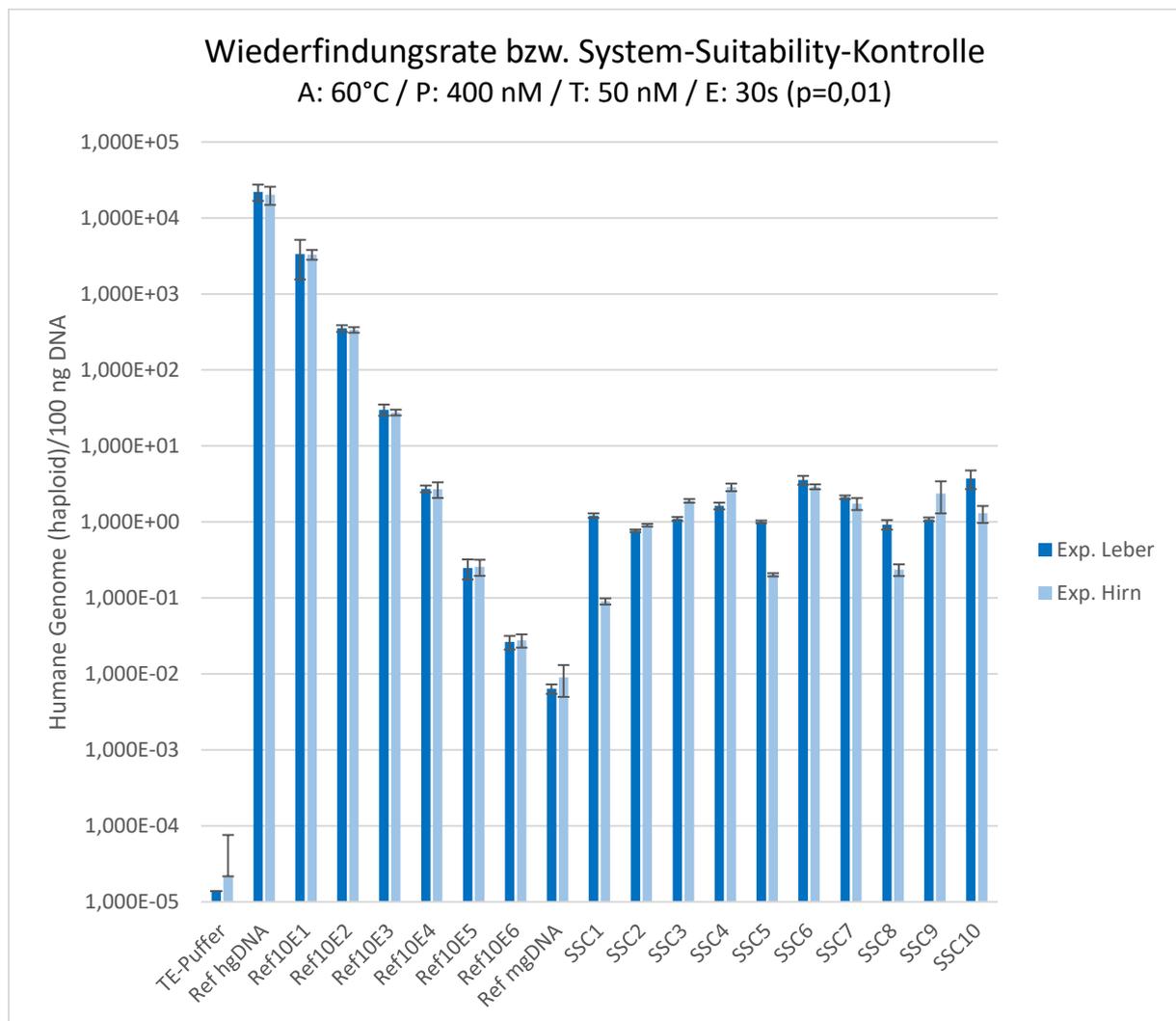


Abbildung 15 Konzentration an haploiden humanen Genomen für Referenzstandards und die SSC1-10 nach Anwendung des finalen qPCR-Protokolls. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von fünf Replikaten (n=5) für die verschiedenen Proben dar. Für das Experiment Leber stellen die Daten für TE-Puffer den Wert der haploiden Genomkonzentration von einem Replikate (n=1) dar; vier Replikate waren negativ. Für das Experiment Hirn stellen die Daten für TE-Puffer den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von vier Replikaten (n=4) dar; ein Replikate war negativ.

Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall für das Signifikanzniveau $p=0,01$ dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, TE-Puffer = Nichtzielkontrolle.

Die bestimmten Konzentrationsverhältnisse von humanen zu murinen Genomen für die Organe Leber und Hirn lagen im Durchschnitt von jeweils zehn Aufarbeitungen (SSC1-10) bei 1:17.900 für die Leber und 1:21.100 für das Hirn. Die Konzentrationswerte der einzelnen SSCs unterschieden sich stärker bei dem Experiment zur Untersuchung des Hirns als bei der Leber. Bei beiden Experimenten wurden die Spezifikationen zur Bewertung der Kalibrationskurven erfüllt. Durch das Anspiken von lyophilisiertem Organpulver mit tHA-BOECs konnte gezeigt werden, dass die vorgeschaltete Prozesskette ab der DNA-Isolierung grundsätzlich funktioniert. Für die Validierungsläufe wurde die SSC6, im Folgenden bezeichnet als SSC, als interne Kontrolle ausgewählt.

Obwohl Creane et al. (35) eine Stabilität der Hydrolyse-Sonde im Mastermix, der auf Eis gekühlt wird, von zwei Stunden angeben, sind keine Informationen zur Stabilität der Hydrolyse-Sonde gegenüber Lichtexposition und ungekühlten Arbeitsbedingungen vorhanden. Aus diesem Grund wurde eine qPCR-Analyse (Robustheitsexperiment 1) nach zweistündiger maximaler Lichtexposition und ohne Kühlung des fertigen Mastermixes zur Überprüfung der Stabilität der Hydrolyse-Sonde (worst-case-Szenariobedingungen) durchgeführt. Diese wurde verglichen mit der Durchführung einer qPCR-Analyse unter normalen Arbeitsbedingungen aber auch ohne Kühlung des fertigen Mastermixes (Robustheitsexperiment 2). Für das Robustheitsexperiment 1 unter worst-case-Szenariobedingungen wurde der Mastermix, der die Hydrolyse-Sonde enthielt, nach der Herstellung auf die Anzahl der benötigten DNA LoBind Tubes 1.5 ml aufgeteilt und für eineinhalb Stunden dem maximalen Licht ohne Kühlung ausgesetzt. Nach dieser Zeit wurden die DNA-Templates, d.h. die Referenzstandards, unter den gleichen Bedingungen hinzugefügt und in die LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 pipettiert, was ca. 35 Minuten dauerte. Im Vergleich dazu dauerte die Ausführung bei Robustheitsexperiment 2 genau eine Stunde. Zusätzlich wurde bei diesem Experiment der Einfluss einer geringen Änderung der Hydrolyse-Sondenkonzentration unterhalb der für den LightCycler® 480 Probes Master empfohlenen Konzentration von 50 nM auf die qPCR-Performance getestet. Da die Konzentration der Hydrolyse-Sonde, wie bereits gezeigt, einen starken Einfluss auf die Sensitivität der Methode hat, soll für diese ein Akzeptanzbereich bestimmt werden, um beispielsweise eventuelle Pipettierungenauigkeiten bewerten zu können. Beide Robustheitsexperimente wurden zeitlich nach der Bewertung der Validierungsexperimente definiert und durchgeführt. Aus diesem Grund wurden hier die gleichen Anforderungen an die Genauigkeit und die Präzision der Referenzstandards angewendet wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Die Ergebnisse von Robustheitsexperiment 1 und 2 sind in Abbildung 16 und in Tabelle 26 zu finden.

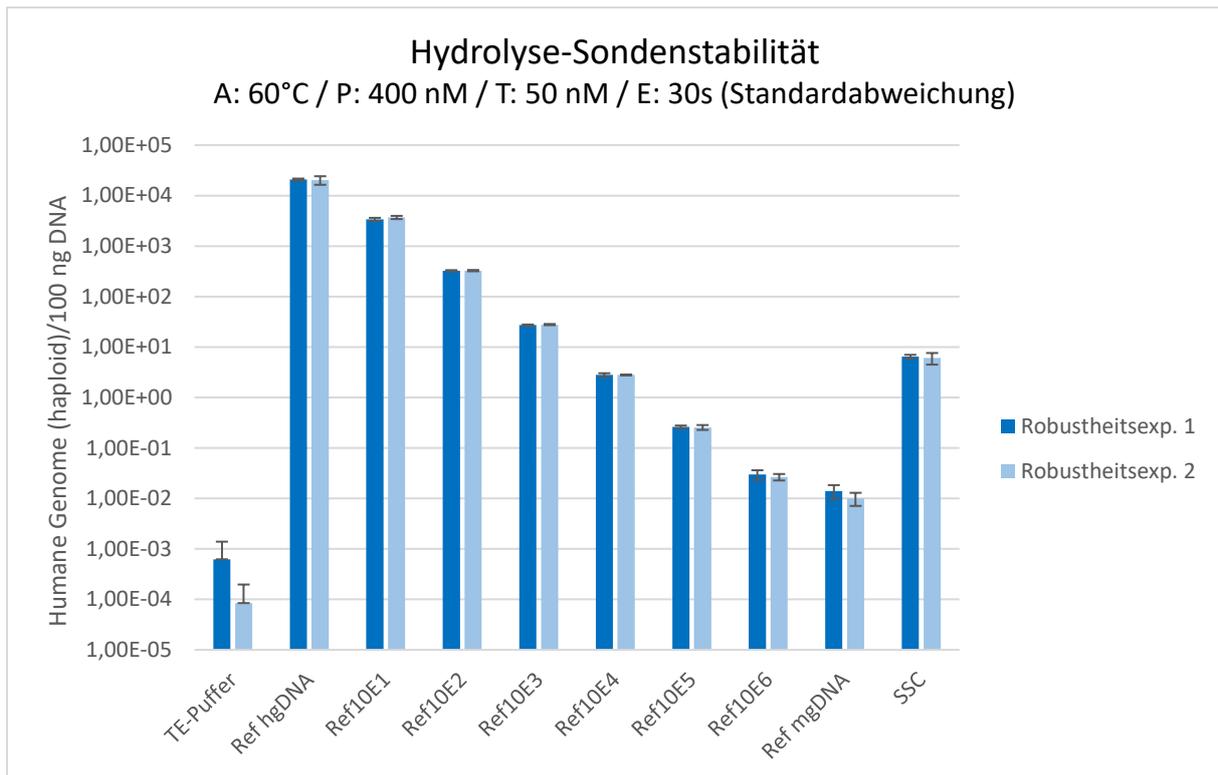


Abbildung 16 Konzentration an haploiden humanen Genomen für Referenzstandards und die SSC nach Anwendung des finalen qPCR-Protokolls für die Robustheitsexperimente 1 und 2. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von fünf Replikaten (n=5) für die verschiedenen Proben dar. Für das Robustheitsexperiment 1 stellen die Daten für Ref mgDNA den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von vier Replikaten (n=4) und für TE-Puffer den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von drei Replikaten (n=3) dar; ein Ref mgDNA und zwei TE-Puffer Replikate waren vom qPCR-Cycler als uncertain gekennzeichnet. Für das Robustheitsexperiment 2 stellen die Daten für Ref mgDNA und die SSC den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von vier Replikaten (n=4) dar, für Ref hgDNA den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von drei Replikaten (n=3) und für TE-Puffer den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von zwei Replikaten (n=2); drei TE-Puffer Replikate waren negativ. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, TE-Puffer = Nichtzielkontrolle.

Tabelle 26 Spezifikationen und Werte für die Intraassay-Genauigkeit und -Präzision für die Referenzstandards der Robustheitsexperimente 1 und 2.

Intraassay-Genauigkeit und -Präzision ^a								
Spezifikationen		Ref hgDNA	Ref10E1	Ref10E2	Ref10E3	Ref10E4	Ref10E5	Ref10E6
%Nominalwert	Genauigkeit	±15%	±15%	±15%	±15%	±15%	±15%	±20%
VK	Präzision	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 20%
Robustheitsexperiment 1	Genauigkeit	75,37%	122,25%	116,97%	98,45%	101,92%	94,61%	107,49%
	Präzision	4,46%	7,41%	3,17%	2,72%	7,46%	6,35%	21,93% ^c
Robustheitsexperiment 2	Genauigkeit	73,42% ^b	133,89%	118,20%	100,69%	101,05%	92,59%	96,21%
	Präzision	19,27% ^b	7,29%	3,01%	2,67%	2,21%	11,13%	14,63%

^aDie Intraassay-Genauigkeits- und -Präzisionswerte wurden mit fünf Replikaten für jedes Experiment berechnet (n=5). ^bDie Intraassay-Genauigkeits- und -Präzisionswerte wurden mit drei Replikaten für diese Proben

berechnet (n=3). ^cDie Werte für die Intraassay-Präzision für den Referenzstandard Ref10E6, der innerhalb des Arbeitsbereichs der qPCR-Methode liegt, lag außerhalb der Spezifikation.

Die Parameter zur Beurteilung der Kalibrationskurve für Robustheitsexperiment 1 lagen innerhalb der Spezifikation und auch die Konzentrationen an humanen Genomen für die Referenzstandards zeigten kaum Abweichungen zu den vorherigen Experimenten. Jedoch wurden für die Backgroundkontrolle und die Nichtzielkontrolle insgesamt drei Werte vom qPCR-Cycler als „uncertain“ gekennzeichnet, was bei dieser Methode bisher nicht vorkam und bedeutet, dass kein eindeutiger C_q-Wert bestimmt werden konnte. Zusätzlich ist die Konzentration an humanen Genomen im TE-Puffer ungewöhnlich hoch, z.B. im Vergleich zu den Validierungsexperimenten (siehe Kapitel 3.3.2). Dieser Vergleich zeigt außerdem, dass bei Robustheitsexperiment 1 die Spezifikation für die Methodenpräzision für den Referenzstandard Ref10E6 nicht eingehalten wurde. Diese Spezifikation wurde für alle vier Validierungsläufe erfüllt. Unter normalen Umständen dauert das Vorbereiten des Mastermixes und das Pipettieren einer vollständigen LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 nicht länger als eine Stunde. Dieser Pipettierprozess sollte grundsätzlich nicht unterbrochen werden, z.B. um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Aufgrund der zuvor nicht definierten Stabilität der Hydrolyse-Sonde wurden die Arbeitslösungen der Hydrolyse-Sonde und alle Lösungen, die bereits die Hydrolyse-Sonde enthielten, während des Pipettierens standardmäßig auf Eis und im Dunkeln gelagert. Bei Robustheitsexperiment 2 lagen alle Parameter innerhalb der Spezifikation, insbesondere auch die Intraassay-Präzision. Dementsprechend hatte auch die leicht veränderte Konzentration der Hydrolyse-Sonde im Mastermix keinen Einfluss auf die qPCR-Performance. Folglich ist die Hydrolyse-Sonde unter normalen Bedingungen und dem Abschluss des Pipettierens unter einer Stunde ausreichend stabil, sodass keine Kühlung und keine lichtgeschützte Lagerung der Proben nötig sind. Bei einer längeren Bearbeitungsdauer trifft dies allerdings nicht zu. Hier muss weiterhin eine gekühlte und lichtgeschützte Lagerung der Proben angewendet werden, ansonsten kann vor allem die Beurteilung der Proben mit geringen Mengen an Zielnukleotidsequenzen, Ref10E6 und Ref mgDNA, eingeschränkt sein. Außerdem gilt dann für die qPCR-Methode nicht der gleiche Arbeitsbereich, der durch die Validierungsexperimente definiert wurde.

Abschließend sind die Experimente beschrieben, die durchgeführt wurden, um die Ursache und den Einfluss des Signals zu untersuchen, das teilweise in der Nichtzielkontrolle vorkommt. Das Auftreten dieses Signals, z.B. durch eine potentiell vorhandene Kontamination während des Pipettierprozesses oder die Bildung eines unspezifischen qPCR-Produkts, wurde bereits seit Beginn der Methodenentwicklung beobachtet und prozessbegleitend untersucht. Außerdem wurde das Reinigungsverfahren mit DNA away und die Vorbeugemaßnahmen für den Operator zur Verringerung von zufälligen Kontaminationen mit hgDNA regelmäßig angepasst und verbessert. Trotzdem ist es

wichtig, die Ursache für das gemessene Signal in der Nichtzielkontrolle und den Einfluss auf die Performance der qPCR-Methode genauer zu untersuchen und zu bewerten. Hierzu wurden zuerst zwei Experimente, Negativkontrolle 1 und 2, durchgeführt. Die für diese beiden Experimente eingesetzten Proben und die hierdurch adressierten Ursachen sind in Tabelle 27 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

Tabelle 27 Übersicht über die in den Negativkontrolllexperimenten 1 und 2 eingesetzten Reagenzien, deren Zusammensetzung, Abkürzung, Einsatz und die hierdurch adressierte Ursache sowie gegebenenfalls weitere Erläuterungen.

Reagenzien-zusammensetzung (Abkürzung)	Einsatz	Adressierte Ursache und Erläuterungen
Wasser, PCR grade (H ₂ O) + Standardmastermix	Nichtzielkontrolle	<ul style="list-style-type: none"> Adventive/zufällige Kontamination mit DNA durch den Analysenprozess
TE-Puffer (TE alt) + Standardmastermix	Nichtzielkontrolle, Anwendung einer bereits benutzten TE-Puffer-Flasche und einer zurückliegenden Aliquotierung	<ul style="list-style-type: none"> Adventive/zufällige Kontamination mit DNA durch den Analysenprozess
TE-Puffer (TE neu) + Standardmastermix	Nichtzielkontrolle, Anwendung einer unbenutzten TE-Puffer-Flasche und neue Aliquotierung	<ul style="list-style-type: none"> Adventive/zufällige Kontamination mit DNA durch den Analysenprozess Kontamination durch die erstmalige Reagenzienaliquotierung Wirksamkeit der angepassten DNA-Dekontaminationsmaßnahmen
TE-Puffer + LightCycler® 480 Probes Master, keine weiteren Komponenten (TE + Master)	Interferenzkontrolle für den LightCycler® 480 Probes Master	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfung von Interferenzen durch den LightCycler® 480 Probes Master <p>→ Theoretisch ist die Entstehung eines Fluoreszenzsignals nicht möglich.</p>
Vorwärts- und Rückwärtsprimer + Hydrolyse-Sonde, keine weiteren Komponenten (Primer + H-Sonde)	Degradationskontrolle	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfung der Entstehung eines Fluoreszenzsignals durch Abbau der Hydrolyse-Sonde unter Anwendung des qPCR-Protokolls
STD hgDNA + Standardmastermix (STD hgDNA)	Positivkontrolle	<ul style="list-style-type: none"> Kontrolle zur Beurteilung der Eignung des Experiments
TE-Puffer + Standardmastermix aber kein Rückwärtsprimer (∅ R-Primer)	Degradationskontrolle und Nichtzielkontrolle	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfung des Herstellungsprozesses für den Vorwärtsprimer auf eventuelle adventive/zufällige Kontamination mit DNA Adventive/zufällige Kontamination mit DNA durch den Analysenprozess

		→ Amplifikation des DNA-Stranges durch 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Polymerase möglich
TE-Puffer + Standardmastermix aber kein Vorwärtsprimer (∅ V-Primer)	Degradationskontrolle	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfung der Entstehung eines Fluoreszenzsignals durch Abbau der Hydrolyse-Sonde unter Anwendung des qPCR-Protokolls → Bindung der Hydrolyse-Sonde an die neu amplifizierten DNA-Stränge nicht möglich
TE-Puffer + Standardmastermix aber kein Vorwärtsprimer und Rückwärtsprimer (∅ Primer)	Degradationskontrolle	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfung der Entstehung eines Fluoreszenzsignals durch Abbau der Hydrolyse-Sonde unter Anwendung des qPCR-Protokolls

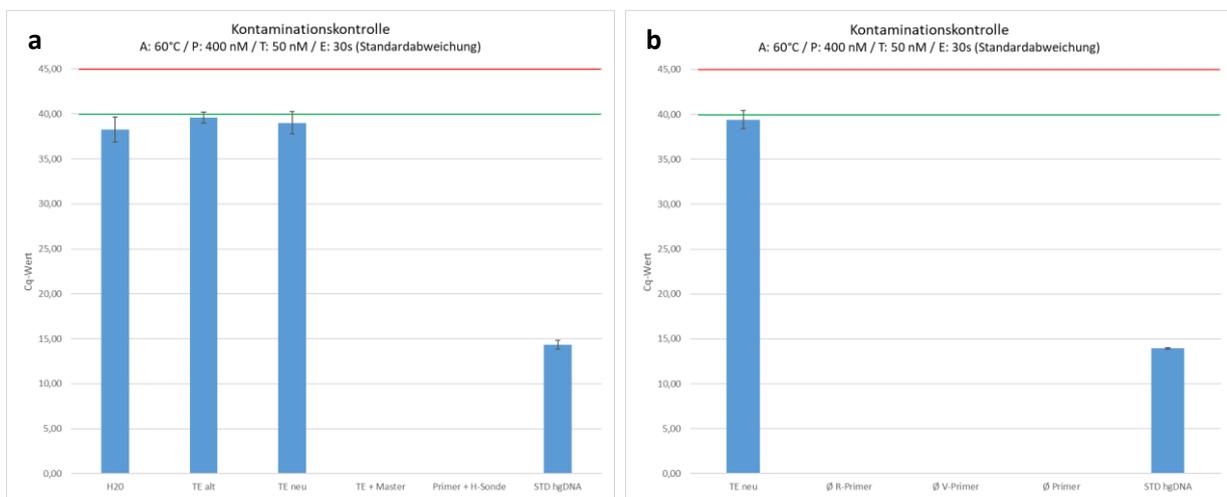


Abbildung 17 Cq-Werte nach Anwendung des finalen qPCR-Protokolls für die Negativkontrolllexperimente 1 (a) und 2 (b). Die Daten stellen den Mittelwert der Cq-Werte von fünf Replikaten (n=5) für die verschiedenen Proben dar. Die Proben TE + Master, Primer + H-Sonde, ∅ R-Primer, ∅ V-Primer und ∅ Primer waren negativ. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit.

Die Daten der Negativkontrolllexperimente zeigen, dass nur dann Cq-Werte bestimmt, also ein Fluoreszenzsignal gemessen werden kann, wenn alle Komponenten des Mastermixes funktionsfähig sind. Deshalb kann eine von der Polymerase unabhängige Degradation der Hydrolyse-Sonde als Ursache für die Entstehung der gemessenen Fluoreszenzsignale ausgeschlossen werden. Außerdem kommen Interferenzen, verursacht durch den LightCycler® 480 Probes Master, und die Herstellung der Arbeitslösung für den Vorwärtsprimer als Ursache nicht infrage. Die Anwendung und Aliquotierung einer noch unangebrochenen Flasche der gleichen Charge TE-Puffer zeigte keine Änderungen und es konnte weiterhin in allen Nichtzielkontrollen ein Cq-Wert gemessen werden. Ergänzend wurden die Amplifikationskurven der einzelnen Replikate der Nichtzielkontrollen von Negativkontrolllexperiment 1 und beispielhaft von Validierungsexperiment 3 betrachtet und bewertet (siehe Abbildung 18).

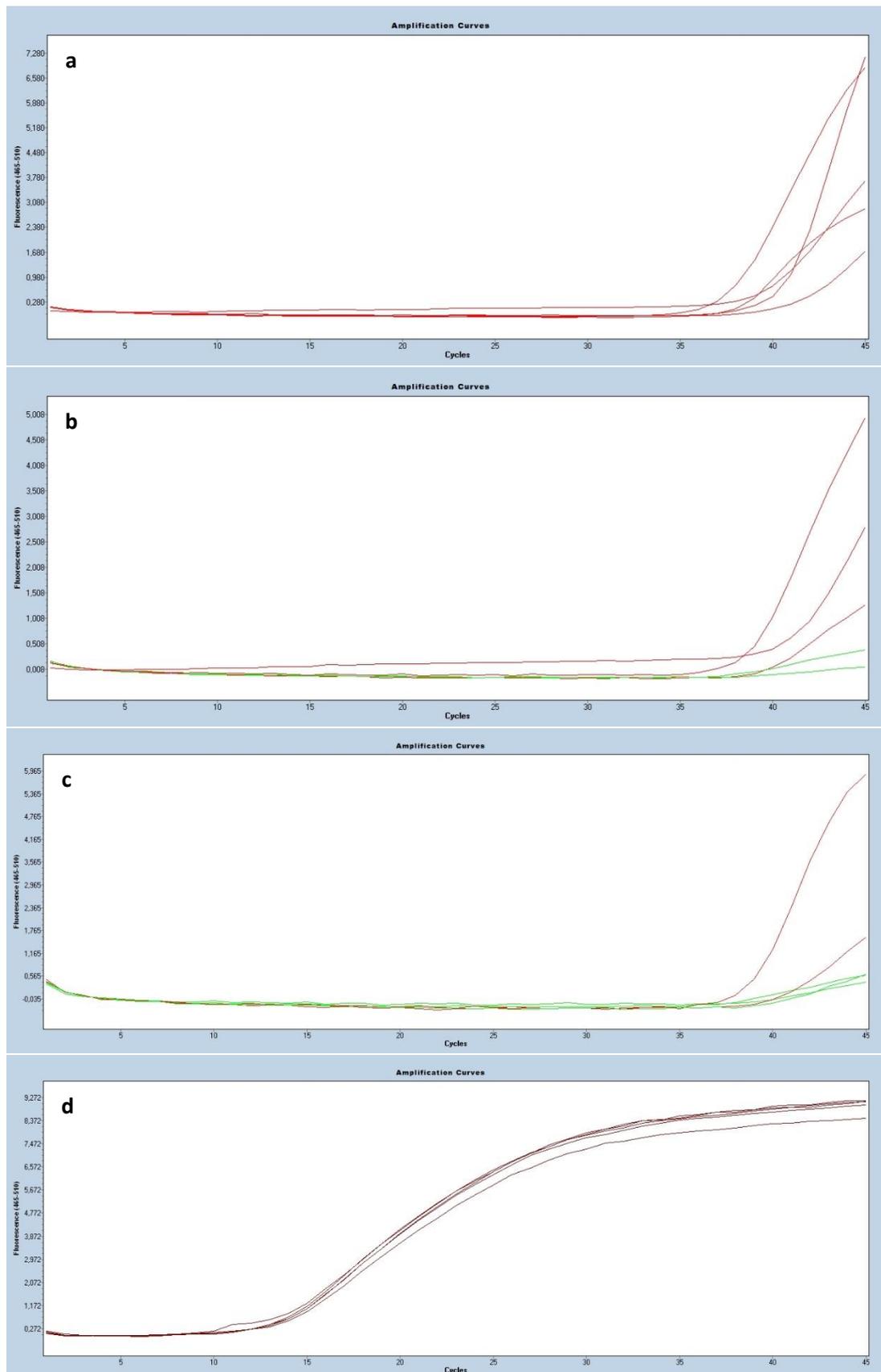
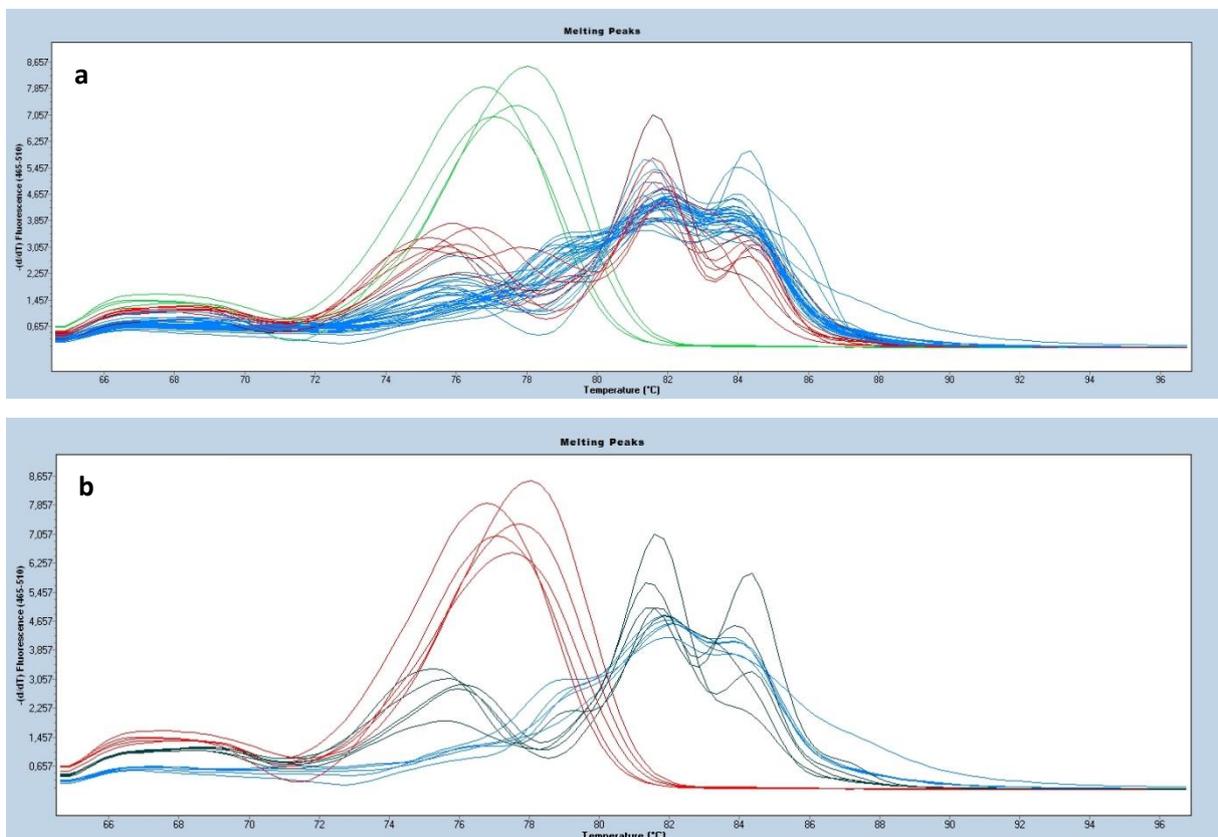


Abbildung 18 Amplifikationskurven aus den Experimenten Negativkontrolle 1 und aus Validierungsexperiment 3. Gezeigt sind die Amplifikationskurven für die Proben TE neu (a) und TE alt (b) aus dem Negativkontrolllexperiment 1 und für die Proben TE-Puffer (c) und Ref hgDNA (d) aus Validierungsexperiment 3. Jede Amplifikationskurve entspricht einem von insgesamt fünf Replikaten. Die grünen Linien deuten auf negative und die roten Linien auf positive Replikate hin.

Amplifikationskurven mit einem steilen und exponentiellen Anstieg am Ende können auf eine Kontamination der Proben mit geringen Mengen an hgDNA hindeuten. Die Amplifikationskurven der Nichtzielkontrollen lassen aber kein klares Muster für Kontaminationen erkennen, sondern das Auftreten von sowohl negativen als auch positiven Replikaten deutet eher auf zufällige Kontaminationen hin. Um dies genauer bewerten zu können, ist es wichtig, die Struktur des bzw. der potentiellen qPCR-Amplikons zu untersuchen. Hierfür wurde das finale qPCR-Protokoll angewendet und dabei mit SYBR Green I anstelle der Hydrolyse-Sonde eine Schmelzkurvenanalyse zur Charakterisierung des bzw. der Amplikons durchgeführt. Untersucht wurden hierbei in mehreren Experimenten die Referenzstandards Ref hgDNA, Ref10E1-Ref10E6, die Backgroundkontrolle Ref mgDNA und die Nichtzielkontrolle. Zwei repräsentative Experimente, genannt TE-Puffer 1 und 2, sind in Abbildung 19 dargestellt.



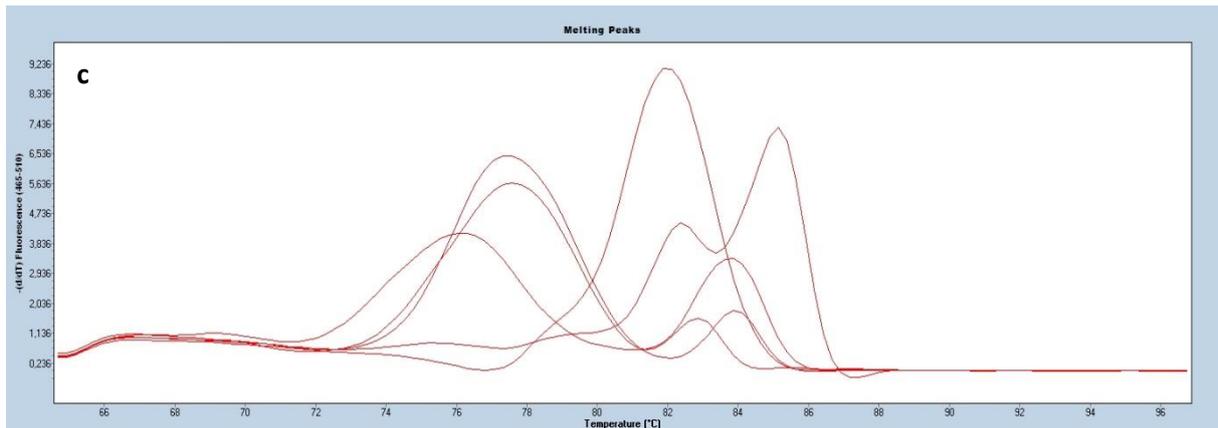


Abbildung 19 Schmelzkurvenanalyse nach Verwendung des finalen qPCR-Protokolls unter Anwendung von SYBR Green I zur Detektion. Für die Schmelzkurven der Proben Ref hgDNA, Ref10E1-Ref10E6, Ref mgDNA und TE-Puffer 1 (n=5) wurden vom qPCR-Cycler verschiedene mögliche Amplikons (grün, rot, blau) angezeigt (a). Außerdem sind die distinkten Schmelzkurven der Proben TE-Puffer 1 (rot), Ref hgDNA (blau) und Ref mgDNA (schwarz) (n=5) aus dem gleichen Experiment einzeln gezeigt (b). Die Schmelzkurven der Nichtzielkontrolle TE-Puffer 2 (n=5) aus einem weiteren Experiment (c) sind ebenfalls abgebildet.

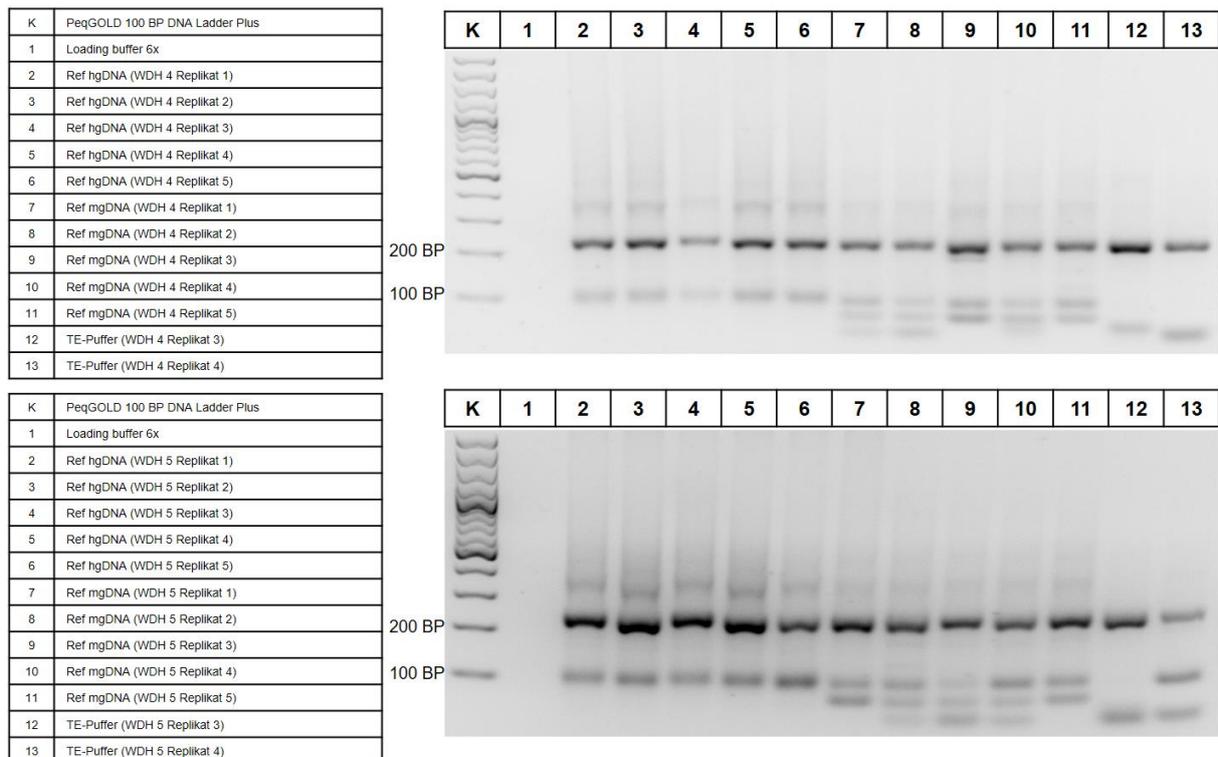
Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse für TE-Puffer 1 und 2 deuten auf Unterschiede bei den entstandenen Amplikons bzw. der Amplikonstruktur hin. In Abbildung 19 (b) (rot) ist für TE-Puffer 1 ein Schmelztemperaturbereich (Tm1-2) von 76,77°C bis 78,44°C zu erkennen. Dieses Signal mit dem niedrigsten Schmelztemperaturintervall weist auf noch vorhandene bzw. nicht umgesetzte Primer hin und ist typischerweise bei dem Referenzstandard Ref hgDNA nicht oder kaum mehr vorhanden. Die hohe Konzentration an hgDNA, dem Ziel der Primer, in diesem Referenzstandard führt zum Verbrauch bzw. zur Bindung von fast allen Primern. Vorhandene kurze Nukleotidsequenzen, wie die der Primer, führen zu niedrigeren Schmelztemperaturen (Tm) als längere Nukleotidsequenzen, z.B. die des bzw. der Amplikons mit mehr als 90 Basenpaaren. Für TE-Puffer 1 waren alle Replikate negativ und es wurden keine Cq-Werte durch den qPCR-Cycler bestimmt. Auch die Schmelzkurvenanalyse weist darauf hin, dass keine Primer verbraucht wurden und kein Amplikon entstanden ist, d.h. es ist keine zufällige Kontamination mit hgDNA vorhanden. Dies kam unter gleichen Bedingungen bei der Methodenentwicklung bei Verwendung der Hydrolyse-Sonde eher selten vor. Eine Erklärung hierfür ist eine mögliche Verringerung der Sensitivität der Methode bei der Anwendung von SYBR Green I. Für TE-Puffer 2 hingegen wurde ein durchschnittlicher Cq-Wert von 37,12 bestimmt und es wurden, neben der Schmelztemperatur der Primer von ca. 77°C, weitere Schmelztemperaturen (Tm2-4) gemessen. Außerdem zeigen die Schmelzkurven von zwei Replikaten mit Peaks bei ca. 83°C und 85°C (siehe Abbildung 19 (c)) Ähnlichkeiten mit den Peaks des Referenzstandards Ref hgDNA und der Backgroundkontrolle Ref mgDNA. Dies kann darauf hindeuten, dass unterschiedliche Replikate der Nichtzielkontrolle, z.B. während des Pipettierprozesses, mit verschiedenen Mengen an adventiver bzw. zufälliger hgDNA kontaminiert wurden. Die gemessenen Schmelztemperaturen für Ref hgDNA, Ref mgDNA und TE-Puffer 1 und 2 sind in Tabelle 28 gezeigt.

Tabelle 28 Schmelztemperaturen der Proben Ref hgDNA, Ref mgDNA und TE-Puffer 1 und 2.

Probe	$\bar{\Delta}Tm1^a$	$\bar{\Delta}Tm2^a$	$\bar{\Delta}Tm3^a$	$\bar{\Delta}Tm4^a$
Ref hgDNA		80,70	83,36	86,77 ^d
Ref mgDNA	75,64	81,51	84,22	86,93 ^d
TE-Puffer 1	76,77	78,44 ^c		
TE-Puffer 2	77,07 ^b	79,03 ^d	83,02	85,09 ^d

^aDie durchschnittlichen Schmelztemperaturen Tm1-4 wurden mit fünf Replikaten (n=5) für jede Probe bestimmt. ^bDie durchschnittliche Schmelztemperatur wurde mit drei Replikaten (n=3) bestimmt. ^cDie durchschnittliche Schmelztemperatur wurde mit zwei Replikaten (n=2) bestimmt. ^dDie Schmelztemperatur beinhaltet eine Messung (n=1).

Das Vorhandensein mehrerer Schmelztemperaturen und vor allem die Schmelztemperaturen Tm2 und Tm3, die in einem Bereich von 79,03°C bis 81,51°C bzw. 83,02°C bis 84,22 °C liegen, deuten auf das Vorhandensein von mindestens zwei unterschiedlichen Amplikons hin. Dies zeigt auch Abbildung 19 (a). Hier wurden für die Schmelztemperaturkurven der Referenzstandards, der Backgroundkontrolle und der Nichtzielkontrolle vom qPCR-Cycler automatisch drei mögliche Amplikons angezeigt. Die Schmelztemperatur Tm4 kam nur vereinzelt vor und könnte auf längere Nukleotidsequenzen hindeuten. Das Vorkommen von zwei Amplikons bei der Durchführung des qPCR-Protokolls mit der Hydrolyse-Sonde wurde durch eine Gelelektrophorese bestätigt (siehe Abbildung 20).

**Abbildung 20** Ergebnisse der Gelelektrophorese der einzelnen Replikate der Proben Ref hgDNA, Ref mgDNA und TE-Puffer aus den Experimenten WDH 4 und WDH 5. Es wurden jeweils die einzelnen Replikate der entsprechenden Proben aufgetragen. K = Kontrolle und BP = Basenpaare.

Hier wurde beispielsweise die Größe der Amplikons für Proben aus den Experimenten WDH 4 und 5 untersucht. Für die Gelelektrophorese wurden speziell die TE-Puffer-Replikate mit den niedrigsten Cq-Werten ausgewählt, um zu überprüfen, ob ein oder mehrere Amplikons gebildet wurden und eventuell eine Kontamination vorhanden war. Die Ergebnisse zeigen, dass in diesen TE-Puffer-Replikaten und auch in den Replikaten der Proben Ref hgDNA und Ref mgDNA jeweils zwei Amplikons mit einer Größe von ca. 100 und 230 Basenpaaren vorhanden waren. Betrachtet man die bestimmten durchschnittlichen Konzentrationswerte in den Nichtzielkontrollen vom Start der Methodenentwicklung bis zum Abschluss der Validierungsexperimente, ist klar erkennbar, dass die durchschnittliche Konzentration an humanen Genomen deutlich abgenommen hat. So lag die durchschnittliche Konzentration der Nichtzielkontrolle bei den Validierungsexperimenten im Bereich von $1,00 \times 10^{-4}$ bis $1,00 \times 10^{-5}$ (siehe Kapitel 3.3.2). Im Vergleich dazu wurde vor allem am Anfang der Methodenentwicklung eine durchschnittliche Konzentration an humanen haploiden Genomen von ca. $1,00 \times 10^{-2}$ gemessen. Bei den Validierungsexperimenten wurden in der Nichtzielkontrolle nur drei Cq-Werte zwischen 38,00 und 39,00 bestimmt, alle anderen Cq-Werte lagen über 39,00. Insgesamt waren mehr als die Hälfte aller Cq-Werte negativ oder es wurde ein Cq-Wert von 40 angegeben (11/19), dem Grenzbereich des qPCR-Cyclers. Festzustellen ist aber zusätzlich, dass sich die Validierungsexperimente hinsichtlich der Konzentration an humanen Genomen in der Nichtzielkontrolle bzw. der Anzahl an negativen Replikaten unterscheiden. Da jedoch die Konzentration an humanen Genomen in der Nichtzielkontrolle signifikant verringert werden konnte und die Spezifikationen für alle Validierungsexperimente erfüllt waren, besteht kein negativer Einfluss auf die Validität der Daten durch ein mögliches Vorhandensein sehr geringer und zufälliger Kontamination mit hgDNA.

3.3.2 Methodvalidierung

Das Ziel der Methodvalidierung ist es, nachzuweisen, dass die analytische Methode die Anforderungen an die vorgesehene Anwendung erfüllt. Die allgemeinen Anforderungen an die Methodvalidierung sowie die notwendigen bzw. zutreffenden Validierungscharakteristika, die für die vorgesehene Verwendung relevant sind, sind in den bereits genannten Richtlinien der EMA und des ICH beschrieben (30, 31). Trotzdem müssen bei der Definition der Validierungsparameter und der dazugehörigen Spezifikationen die individuellen Charakteristika und Besonderheiten der analytischen Methode - zusätzlich zu der vorgesehenen und speziellen Anwendung - berücksichtigt werden. Der Einsatzzweck der hier beschriebenen analytischen Methode ist die Untersuchung der Biodistribution für zellbasierte ATMPs in nicht-klinischen Sicherheitsstudien. Dies beinhaltet sowohl frühe präklinische als auch spätere und GLP-konforme Sicherheitsstudien. Zu den für eine qPCR-basierte Analysenmethode zu evaluierenden Validierungsparametern gehören die Robustheit, die Spezifität, die Linearität, der Arbeitsbereich, die Genauigkeit, die Präzision und das Quantifizierungslimit. In

anderen Fällen kann es sinnvoll und notwendig sein, das Quantifizierungslimit und das Detektionslimit zu bestimmen (31, 32). Die Spezifität der ausgewählten Primer und der Hydrolyse-Sonde wurde bereits durch Creane et al. (35) nachgewiesen. Außerdem wurde diese durch den Vergleich der Primersequenzen mit hAlu-Sequenzen, die in der NCBI GenBank Datenbank veröffentlicht sind, unter Anwendung des BLAST-Algorithmus bestätigt. Creane et al. wiesen die spezifische Amplifikation von kommerziell erhältlicher hgDNA mit den publizierten hAlu-Primern nach, indem sie hgDNA, die in verschiedenen Hintergrundmatrizes - DNA isoliert aus Organen von Mäusen, Ratten und Hasen - verdünnt war, analysierten und die Ergebnisse mit reinen Proben, die nur Maus-, Ratten- oder Hasen-DNA enthielten, verglichen. Des Weiteren untersuchten sie sechs verschiedene Verdünnungen von hgDNA in Maus-, Ratten- oder Hasen-DNA und verglichen die bestimmten Cq-Werte mit denen aus äquivalenten Verdünnungen von hgDNA ohne Maus-, Ratten- oder Hasen-DNA als Hintergrundmatrix. Ihre Analyse unterschiedlicher Organe und Gewebe, nämlich Oberschenkel, Wade, Herz, Lunge, Hirn, Leber, Niere und Milz von Kontrollmäusen zeigt die Spezifität der ausgewählten Primer und der Hydrolyse-Sonde für unterschiedliche Gewebe von Balb/c nude-Mäusen. Gleichmaßen zeigt die Untersuchung von Lunge, Herz, Leber, Milz, Niere, Keimdrüsen, Knochen mit Knochenmark und Hirn von NOD/SCID/gamma(C)(null)-Kontrollmäusen (siehe Kapitel 3.4.3, Abbildung 25) die Spezifität für die hier ausgewählten Organe und das hier angewendete Mausmodell. Die Konzentration an humanen Genomen in den Proben, die von verschiedenen Organen der Kontrollmäuse isoliert wurden, wurde verglichen mit der Konzentration an Genomen in Proben mit der gleichen Verdünnung von kommerziell erhältlicher mgDNA, der Backgroundkontrolle. Die Konzentration an Genomen in allen Proben der Organe und Gewebe der Kontrollmäuse war statistisch nicht signifikant höher als die Konzentration der Backgroundkontrolle. Abschließend wurde die SSC für den Nachweis der Eignung der gesamten Prozesskette und für die Abschätzung der durchschnittlichen Wiederfindungsrate untersucht. Die Daten zeigen, dass die Prozesskette grundsätzlich funktioniert und es konnte eine Wiederfindungsrate von durchschnittlich 21,94% angegeben werden.

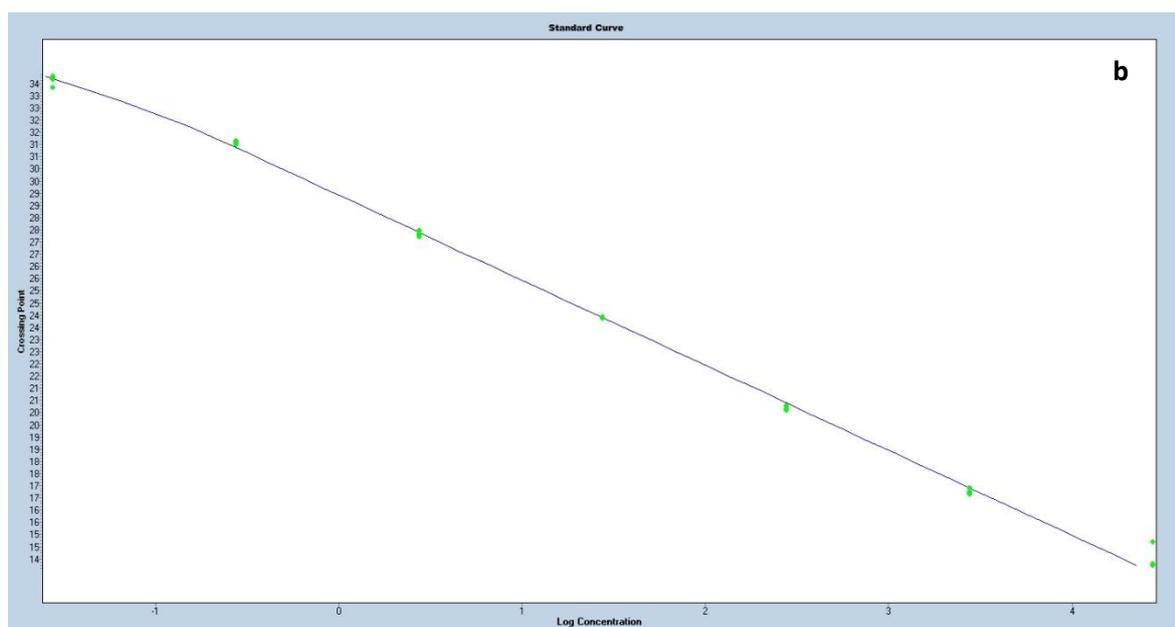
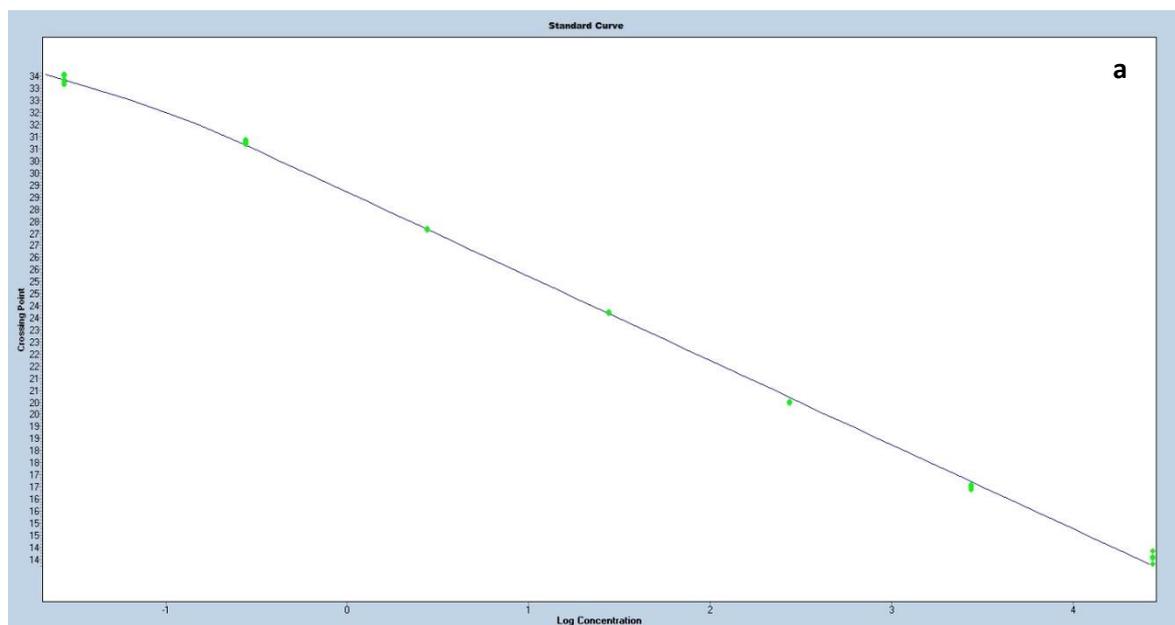
Die Validierungsparameter Linearität, Genauigkeit, Präzision, Arbeitsbereich und Quantifizierungslimit wurden gleichzeitig durch Anwendung der Validierungsmatrix untersucht. Die Validierungsparameter wurden für die Referenzstandards Ref hgDNA und Ref10E1-Ref10E6 bestimmt. Tabelle 29 zeigt die Spezifikationen und die Ergebnisse für die Linearitätsbestimmung für die vier Validierungsexperimente.

Tabelle 29 Spezifikationen und Ergebnisse der Linearitätsbestimmung.

	Fehlerwert	Effizienz	Geradensteigung	Y-Intercept
Spezifikationen	≤ 0,0500	90,0 – 110,0%	-3,100 – 3,580	

Validierungsexperiment 1	0,0190	96,8%	-3,486	28,70
Validierungsexperiment 2	0,0216	96,7%	-3,490	28,92
Validierungsexperiment 3	0,0244	99,4%	-3,352	28,33
Validierungsexperiment 4	0,0109	97,4%	-3,454	28.15

Die Spezifikationen für die Linearität der Methode waren bei allen Validierungsexperimenten erfüllt. Die Diagramme der Kalibrationskurven für die Validierungsexperimente 1-4 gehören ebenfalls zum Datenpaket der Linearitätsbestimmung und sind in Abbildung 21 gezeigt.



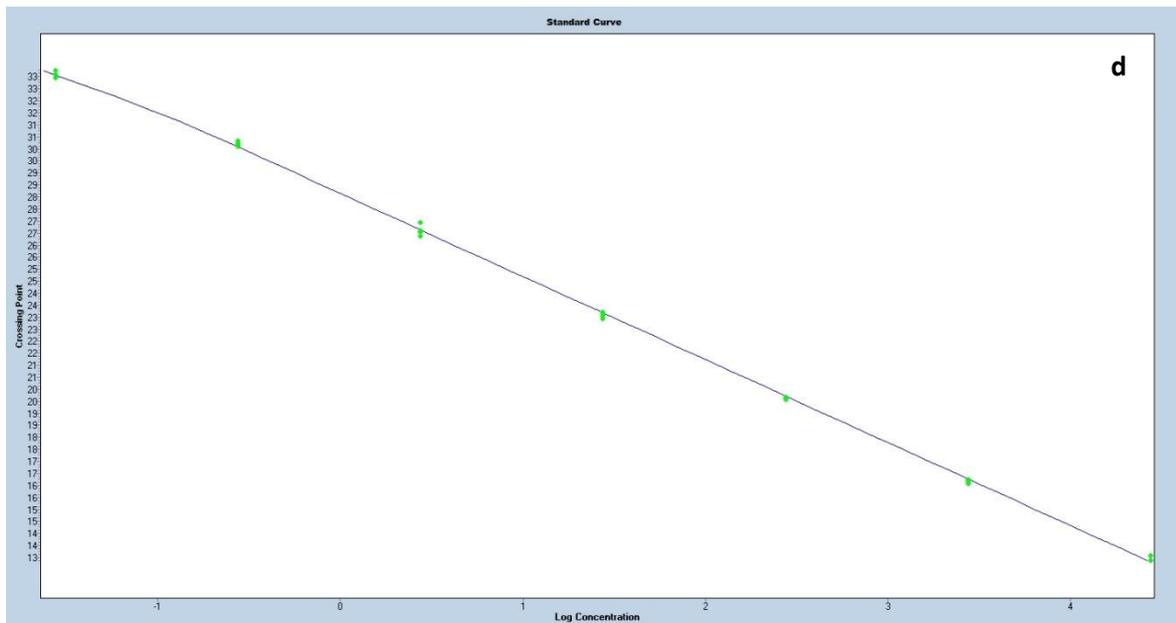
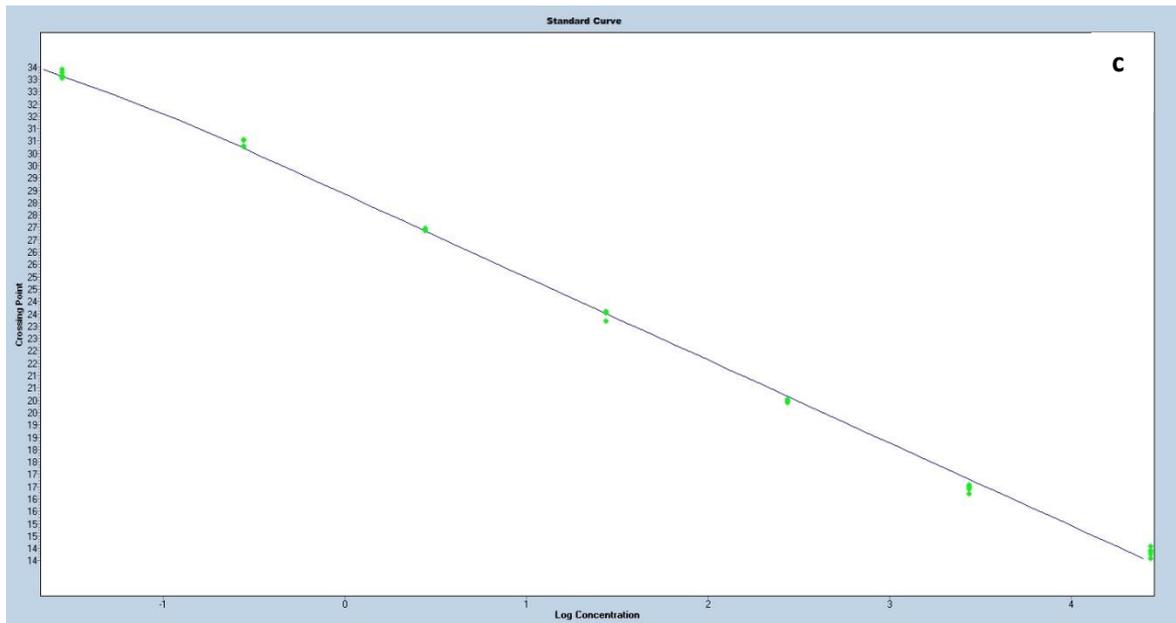


Abbildung 21 Kalibrationskurven für die Validierungsexperimente 1 (a), 2 (b), 3 (c) und 4 (d) erstellt aus den Referenzstandards Ref hgDNA und Ref10E1-Ref10E6.

Die Werte für die Intraassay-Genauigkeit und -Präzision der qPCR-Methode wurden für jedes Validierungsexperiment einzeln bestimmt. Die Berechnung beinhaltet die Konzentrationswerte von fünf Replikaten für jeden Referenzstandard. Die Interassay-Genauigkeits- und -Präzisionswerte hingegen beinhalten alle fünf Replikate der Referenzstandards aus allen Validierungsexperimenten, d.h. insgesamt 20 Replikate. Tabelle 30 zeigt die Ergebnisse und die dazugehörigen Spezifikationen für die Intra- und Interassay-Genauigkeits- und -Präzisionsbestimmung.

Tabelle 30 Spezifikationen und Ergebnisse der Intra- und Interassay-Genauigkeits- und -Präzisionsbestimmung.

Intraassay-Genauigkeit und -Präzision^a								
Spezifikationen		Ref hgDNA	Ref10E1	Ref10E2	Ref10E3	Ref10E4	Ref10E5	Ref10E6
%Nominalwert	Genauigkeit	±15%	±15%	±15%	±15%	±15%	±15%	±20%
VK ^e	Präzision	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 15%	≤ 20%
Validierungs- experiment 1	Genauigkeit	80,29%	115,52%	114,65%	99,32%	99,68%	92,30%	99,46%
	Präzision	12,99%	4,92%	2,10%	1,97%	1,83%	4,56%	18,61%
Validierungs- experiment 2	Genauigkeit	70,53% ^b	113,71%	115,66%	99,53%	102,64%	88,18%	107,20%
	Präzision	26,06% ^b	6,62%	4,83%	1,95%	6,66%	4,36%	19,45%
Validierungs- experiment 3	Genauigkeit	76,96%	129,62%	115,16%	101,49%	96,64%	89,77%	95,77%
	Präzision	12,65%	9,71%	3,77%	12,17%	2,88%	10,25%	12,66%
Validierungs- experiment 4	Genauigkeit	92,77% ^c	109,68% ^b	109,08%	105,90%	102,64%	91,50%	101,63%
	Präzision	10,20% ^c	4,79% ^b	2,47%	7,09%	13,68%	5,60%	10,86%
Interassay-Genauigkeit und -Präzision^d								
Validierungsex- perimente 1-4	Genauigkeit	78,37%	117,52%	113,64%	101,56%	100,40%	90,44%	101,02%
	Präzision	16,82%	9,29%	4,00%	7,16%	7,73%	6,34%	15,28%
Die Intraassay-Genauigkeits- und -Präzisionswerte wurden mit ^a fünf Replikaten (n=5), ^b vier Replikaten (n=4) bzw. ^c zwei Replikaten (n=2) für jedes Validierungsexperiment berechnet. ^d Die Werte für die Interassay-Genauigkeit und -Präzision wurden von allen Replikaten aus den vier Validierungsexperimenten für jeden Referenzstandard berechnet. ^e Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert in Prozent.								

Für den Referenzstandard mit der niedrigsten Konzentration an humanen Genomen gelten für die Spezifikationen der Genauigkeit und Präzision der Methode weniger strenge Vorgaben (30, 31). Aus diesem Grund wurden für den Referenzstandard Ref10E6 unterschiedliche Spezifikationen im Vergleich zu den anderen Referenzstandards definiert. Die Konzentrationen an humanen haploiden Genomen und die Standardabweichungen für alle Referenzstandards, bestimmt in den vier Validierungsexperimenten, sind in Abbildung 22 gezeigt. Die Ergebnisse der Validierungsexperimente zeigen, dass für das Konzentrationsintervall von $1:1 \times 10^3$ bis $1:1 \times 10^6$ humanen Genomen verdünnt in murinen Genomen die qPCR-Methode ausreichend linear, präzise und genau ist. Damit stellt dieses Konzentrationsintervall den Arbeitsbereich der Methode dar (30, 31). Die Referenzstandards innerhalb des Konzentrationsintervalls von $1:1 \times 10^1$ bis $1:1 \times 10^2$ humanen Genomen gegenüber Mausgenomen (Ref10E1 und Ref10E2) konnten ebenso mit ausreichender Präzision bestimmt werden. Jedoch wurde in Validierungsexperiment 2 die Spezifikation für die Genauigkeit bei Referenzstandard Ref10E2 sehr knapp nicht erfüllt. Bei dem Referenzstandard Ref10E1 wurde die Spezifikation für die Genauigkeit in

den Validierungsexperimenten 1 und 3 nicht erfüllt und auch die Spezifikation für die Interassay-Genauigkeit wurde nicht eingehalten. Bei der Messung des Referenzstandards Ref hgDNA wurden sowohl die Spezifikation für Intra- und Interassay-Genauigkeit als auch für Intra- und Interassay-Präzision nicht erfüllt. Im Gegensatz dazu wurden für den Referenzstandard mit der niedrigsten Konzentration an humanen Genomen (Ref10E6) beide Spezifikationen erfüllt. Damit ist das Quantifizierungslimit bei Anwendung der finalen qPCR-Methode mindestens ein humanes haploides Genom unter 1×10^6 haploiden murinen Genomen. Um dies eindeutig nachzuweisen wurde ein statistisch signifikanter Unterschied der Genomkonzentration zwischen Ref10E6 und der Backgroundkontrolle als Spezifikation für das Quantifizierungslimit definiert. Um die Hypothese zu testen, dass der Referenzstandard Ref10E6 und die Backgroundkontrolle statistisch signifikant unterschiedliche Durchschnittskonzentrationen an haploiden Genomen haben, wurde ein Welch t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p=0,01$ festgelegt.

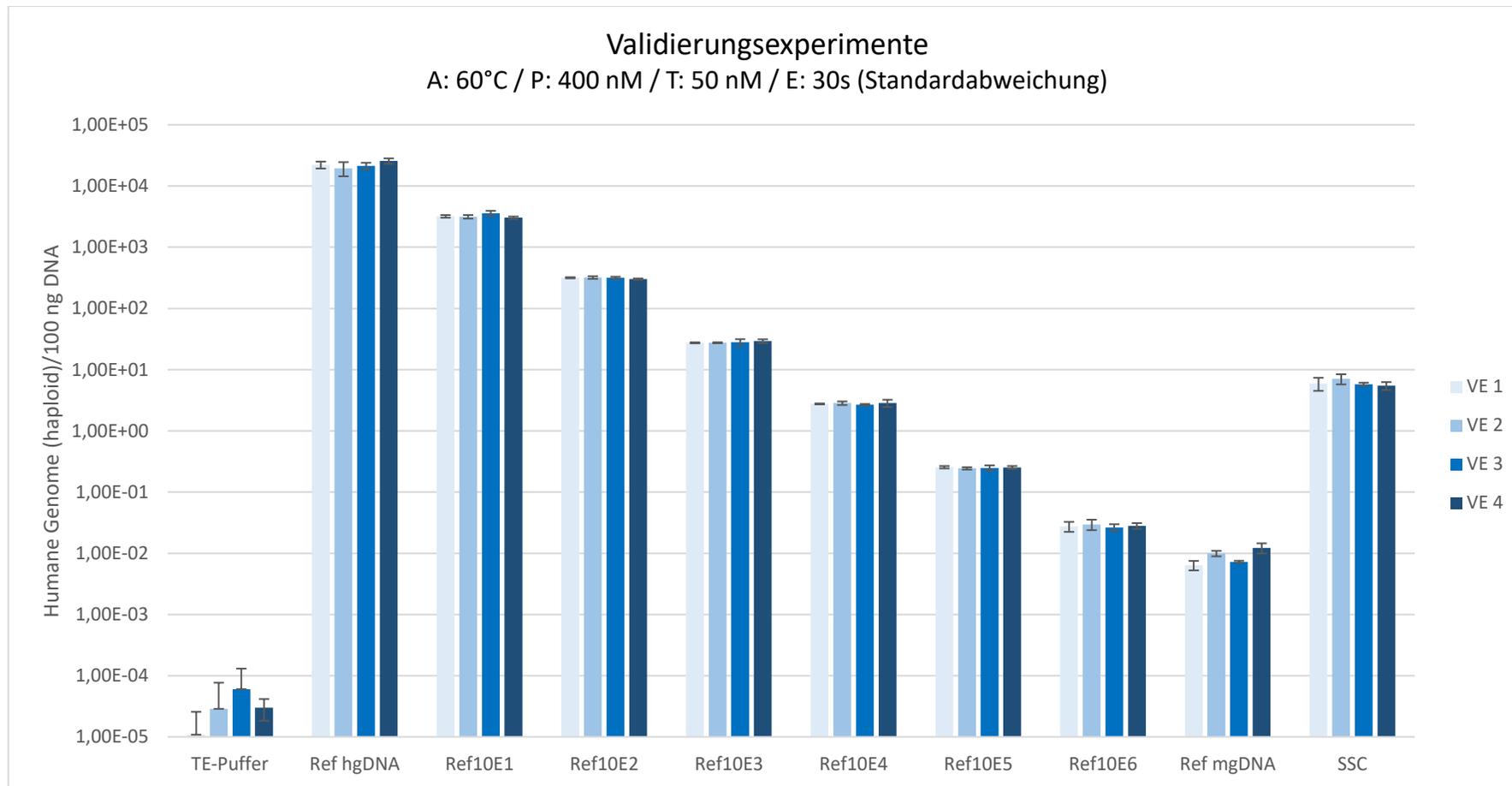


Abbildung 22 Konzentration an haploiden humanen Genomen für Referenzstandards und die SSC nach Anwendung des finalen qPCR-Protokolls für die Validierungsexperimente 1-4. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von fünf Replikaten (n=5) für die verschiedenen Proben dar. Für Validierungsexperiment 1 stellen die Daten für Ref mgDNA den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von vier Replikaten (n=4) dar und für TE-Puffer den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von drei Replikaten (n=3); zwei Replikate waren negativ. Für Validierungsexperiment 2 stellen die Daten für Ref hgDNA, Ref mgDNA und TE-Puffer den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von vier Replikaten (n=4) dar; ein TE-Puffer Replikate war negativ. Für Validierungsexperiment 3 stellen die Daten für Ref mgDNA den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von vier Replikaten (n=4) dar und für TE-Puffer den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von zwei Replikaten (n=2); drei Replikate waren negativ. Für Validierungsexperiment 4 stellen die Daten für Ref10E1, Ref mgDNA und SSC den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von vier Replikaten (n=4) dar und für Ref hgDNA den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von zwei Replikaten (n=2). Die Daten für TE-Puffer stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von vier Replikaten (n=4) dar; ein Replikate war negativ. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. A = Annealingtemperatur, P = Primerkonzentration, T = Hydrolyse-Sondenkonzentration, E = Elongationszeit, TE-Puffer = Nichtzielkontrolle.

Wie in Tabelle 31 zu sehen, wurde die Spezifikation für den Validierungsparameter Quantifizierungslimit in allen Validierungsexperimenten eingehalten. Zuvor wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt und es wurden Normal Q-Q Plots vorbereitet, um die ausreichende Normalverteilung der Daten zu beweisen. Zusätzlich wurde die Annahme der Varianzhomogenität durch den Levene-Test überprüft und nicht erfüllt (siehe Anhang).

Tabelle 31 Spezifikationen und Ergebnisse der Bestimmung des Quantifizierungslimits.

	Ref10E6 ^a		Ref mgDNA ^b		
	Konz.	SA	Konz.	SA	Welch t-Test
Spezifikation					p-Wert < 0,01
Validierungsexperiment 1	2,75E-02	5,12E-03	6,39E-03	1,13E-03	t(4,480)=8,954; p=,0005
Validierungsexperiment 2	2,96E-02	5,77E-03	9,94E-03	1,01E-03	t(4,307)=7,497; p=,001
Validierungsexperiment 3	2,65E-02	3,35E-03	7,25E-03	3,01E-04	t(4,080)=12,756; p=,0002
Validierungsexperiment 4	2,81E-02	3,05E-03	1,22E-02	2,29E-03	t(6,994)=8,893; p=,00005
Die Daten zeigen die Durchschnittswerte für die haploide Genomkonzentration (Konz.) und die Standardabweichung (SA) für ^a fünf Replikate (n=5) und für ^b vier Replikate (n=4).					

Zusammenfassend wurden die Spezifikationen für die Validierungsparameter Spezifität, Linearität und Quantifizierungslimit erfüllt. Der Validierungsparameter Arbeitsbereich wird durch die Parameter Genauigkeit, Präzision und Linearität festgelegt und entspricht dem Konzentrationsintervall von 1:1x10³ bis 1:1x10⁶ humanen Genomen verdünnt in murinen Genomen.

3.4 Biodistributionsstudie für die intravenöse Verabreichung von tHA-BOECs

Für die Durchführung der worst-case-Szenario-Biodistributionsstudie sind nach der Vorbereitung der tHA-BOECs und der i.v.-Applikation in die Schwanzvene der Mäuse die folgenden verschiedenen Teilschritte notwendig:

- Organentnahme
- Organaufbereitung, DNA-Isolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung
- Analyse der Biodistributionsproben mittels qPCR und statistische Datenauswertung

Die Daten der worst-case-Szenario-Biodistributionsstudie (siehe Abbildung 23 und 24) wurden bereits veröffentlicht und entsprechen den dort gezeigten Daten (86).

3.4.1 Organentnahme

Die Entnahme der Organe war für alle Mäuse (M1-M15) und für fast alle acht Organe (Lunge, Herz, Leber, Milz, Niere, Keimdrüsen, Knochen mit Knochenmark und Hirn) erfolgreich (siehe Tabelle 32). Eine Ausnahme war das Herz von M11 aus der Studiengruppe BD Experiment 7d. Ein Fehler bei der Entnahme der Blutprobe aus dem Herzen dieser Maus führte dazu, dass dieses nicht mehr für die Biodistributionsstudie verwendet werden konnte.

Tabelle 32 Übersicht der für die Biodistributionsstudie entnommenen Mausorgane. ✓=Entnahme erfolgreich, x=Entnahme nicht erfolgreich.

Maus	Lunge	Herz	Leber	Milz	Niere	Keimdrüsen	Knochen mit Knochenmark	Hirn
M1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M11	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M12	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

3.4.2 Organaufbereitung, DNA-Isolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung

Die definierten Spezifikationen, Ausgangskonzentration der DNA-Lösung ≥ 50 ng/ μ l und Absorptionsverhältnis A260 / A280 nm $\geq 1,8$, zur Gewährleistung der Qualität der bereitgestellten Biodistributionsproben wurden überprüft. Alle Proben, für die diese Spezifikationen nicht eingehalten wurden und eine weitere DNA-Isolierung oder eine Aufkonzentration der Lösung nicht möglich war,

wurden aus der Biodistributionsstudie ausgeschlossen. Folgende Biodistributionsproben waren hiervon betroffen:

- Maus 2: Keimdrüsen
- Maus 6: Herz und Keimdrüsen
- Maus 7 Knochen mit Knochenmark

Für alle anderen Biodistributionsproben waren die Spezifikationen erfüllt und diese wurden für die Analyse mittels qPCR freigegeben.

3.4.3 Analyse mittels qPCR und statistische Datenauswertung

Für die Bestimmung der Konzentration an humanen Genomen in den Biodistributionsproben wurde das finale qPCR-Protokoll angewendet. Alle Proben mit einer statistisch signifikant nicht unterschiedlichen oder einer statistisch signifikant niedrigeren Konzentration an humanen Genomen als die Backgroundkontrolle wurden als negativ gewertet. Dies bedeutet schließlich, dass keine Genome humanen Ursprungs in diesen Organen nachgewiesen werden konnten, wenn man ein Quantifizierungslimit von einem humanen Genom in 1.000.000 Mausgenomen voraussetzt. Im Gegensatz dazu wurden alle Biodistributionsproben als positiv definiert, wenn sie eine statistisch signifikant höhere Konzentration an humanen Genomen aufwiesen als die Backgroundkontrolle. Das heißt folglich, dass humane Zellen in den jeweiligen Proben vorhanden waren. Um die Hypothese zu testen, dass die Biodistributionsproben der verschiedenen Organe aus den beiden Studiengruppen, BD Experiment 24h und 7d, und die Backgroundkontrolle statistisch signifikant unterschiedliche mittlere bzw. durchschnittliche Ränge hinsichtlich der Genomkonzentration beinhalten, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Da die Verteilung der Daten für die Genomkonzentration nicht ausreichend normal war, konnte kein parametrischer Statistiktest durchgeführt werden. Beim t-Test für unabhängige Stichproben beispielsweise werden - im Gegensatz zum Mann-Whitney-U-Test - keine mittleren Ränge, sondern Mittelwerte verglichen. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte im Durchschnitt, dass die Genomkonzentration, die in den Organen Hirn, Herz, Leber und Lunge (mittlerer Rang=8, n=5) für die Studiengruppe BD Experiment 24h bestimmt wurde, signifikant höher ist als die Konzentration der Backgroundkontrolle (mittlerer Rang=3, n=5), $U(n=10)=0$, $p=,008$. Zur Bestimmung der Effektstärke wurde der r-Wert berechnet, welcher 0,83 ergab, was einem starken Effekt entspricht. Für die Biodistributionsproben der weiteren Organe, Knochen mit Knochenmark, Niere, Milz und Keimdrüsen aus der Studiengruppe BD Experiment 24h konnten keine humanen Genome nachgewiesen werden. Die Genomkonzentration der Biodistributionsproben in der Studiengruppe BD Experiment 7d überschritt für kein Organ die Konzentration der Backgroundkontrolle statistisch signifikant. Dieses Ergebnis zeigt, dass nach sieben Tagen keine humanen Zellen in den verschiedenen Mausorganen

nachweisbar sind. Abbildung 23 zeigt die Daten für alle Organe der Studiengruppen BD Experiment 24h (a) und BD Experiment 7h (b).

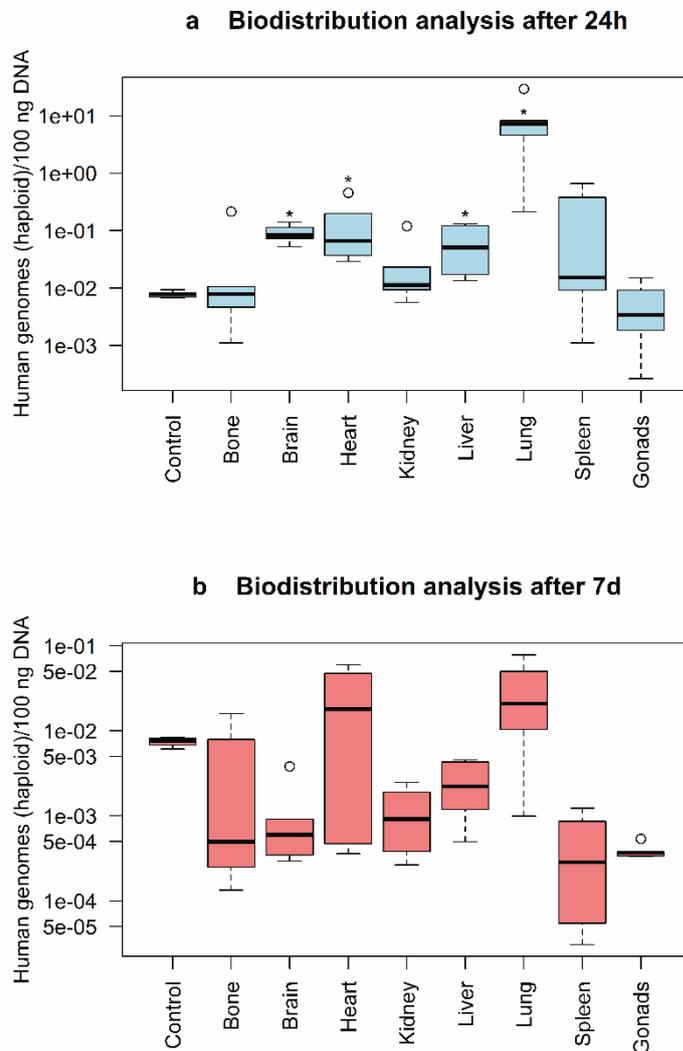


Abbildung 23 Bestimmung der Konzentration an humanen haploiden Genomen in acht verschiedenen Mausorganen nach 24 Stunden (a) und nach sieben Tagen (b). Eine Dosis von 2×10^6 tHA-BOECs wurde i.v. in die Schwanzvene von NOD/SCID/gamma(C)(null)-Mäusen injiziert. Die qPCR wurde mit fünf Replikaten pro Experiment durchgeführt. Die Konzentration an humanen haploiden Genomen in 100 ng DNA, die in den Organen Knochen mit Knochenmark, Hirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Milz und Keimdrüsen bestimmt wurde, ist als Boxplot, bestehend aus fünf verschiedenen Mäusen, gezeigt (n=5). Für die Organe Herz in der Studiengruppe BD Experiment 7d und Keimdrüsen in der Studiengruppe BD Experiment 24h ist der Boxplot für vier verschiedene Mäuse gezeigt (n=4). Die Whisker repräsentieren die minimalen und maximalen Werte und die hervorgehobene horizontale Linie stellt den Median dar. Die Kreise zeigen Ausreißer an. Die Genomkonzentration der Biodistributionsproben Hirn, Herz, Leber und Lunge, die nach 24 Stunden bestimmt wurde, war signifikant höher als die Konzentration der Backgroundkontrolle (Control) (*p=,008). Nach Bittorf et al. [86].

Tabelle 33 zeigt zusätzlich für alle Proben, in denen humane Zellen nachgewiesen werden konnten, das berechnete Verhältnis von humanen zu murinen Zellen im jeweiligen Mausorgan und den entsprechenden Prozentsatz an humanen Zellen.

Tabelle 33 Verhältnis von humanen zu murinen Zellen in den Mausorganen Lunge, Herz, Hirn und Leber nach 24 Stunden und entsprechender Prozentsatz an humanen Zellen.

Organ	Verhältnis humane zu murine Zellen	Prozentsatz humane Zellen
Lunge	1:2.783,49	0,036%
Herz	1:175.755,93	0,00057%
Hirn	1:298.497,42	0,00034%
Leber	1:412.674,92	0,00024%

Des Weiteren wurde die Hypothese, dass die Biodistributionsproben der Organe, die in der Studiengruppe BD Experiment 24h positiv getestet wurden, und die gleichen Organe der Studiengruppe BD Experiment 7d statistisch signifikant unterschiedliche mittlere Ränge hinsichtlich der Genomkonzentration haben, mit einem Mann-Whitney-U-Test geprüft. Der Grund hierfür war die Untersuchung der Persistenz der tHA-BOECs nach sieben Tagen. Die Konzentration an humanen Genomen, die in den Organen Hirn und Leber nach 24 Stunden (mittlerer Rang=8, n=5) bestimmt wurde, überschritt die Konzentration, die in diesen Organen nach sieben Tagen bestimmt wurde (mittlerer Rang=3, n=5) signifikant, $U(n=10)=0$, $p=,008$, mit einer starken Effektstärke $r=0,83$. Gleichmaßen war die Konzentration, die nach 24 Stunden in der Lunge (mittlerer Rang=7, n=5) bestimmt wurde, signifikant höher als die nach sieben Tagen in der Lunge bestimmte Konzentration (mittlerer Rang=2,5; n=4), $U(n=9)=0$, $p=,016$. Es wurde eine starke Effektstärke mit einem r-Wert von 0,82 berechnet. Im Gegensatz dazu waren die Genomkonzentrationen, die in beiden Studiengruppen BD Experiment 24h (mittlerer Rang=6,4; n=5) und BD Experiment 7d (mittlerer Rang=3,25; n=4) im Herzen gefunden wurden, nicht statistisch signifikant unterschiedlich, $U(n=9)=3$, $p=,111$. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 grafisch dargestellt.

Biodistribution comparison after 24h and 7d

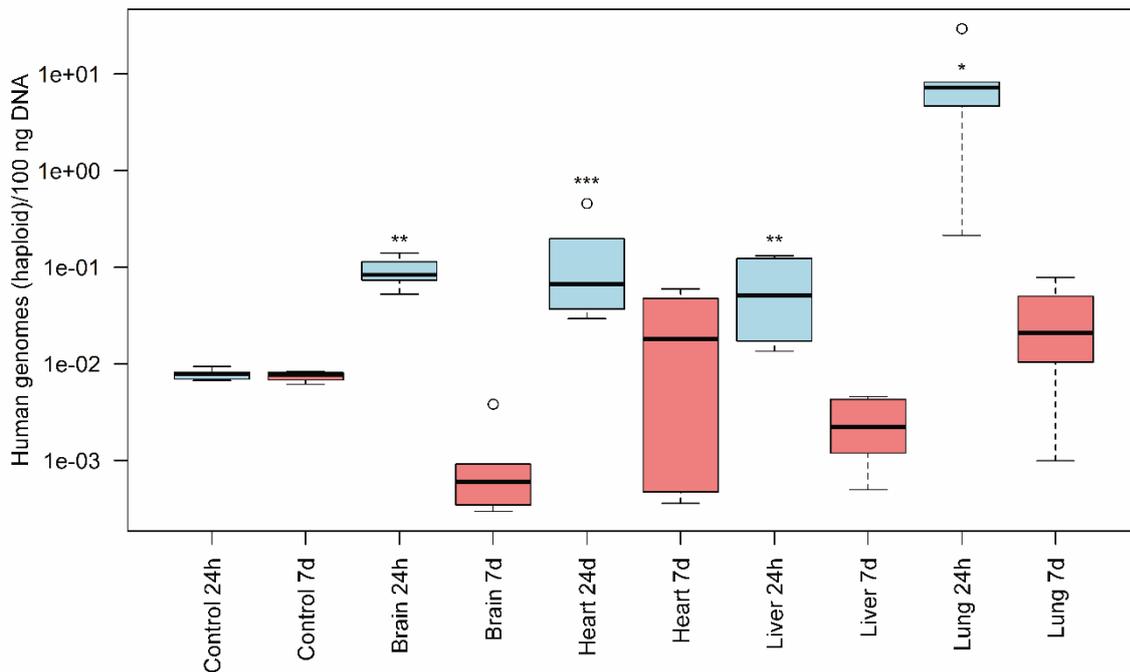


Abbildung 24 Detaillierter Vergleich der bestimmten Konzentrationen an humanen haploiden Genomen in den Organen Hirn, Herz, Leber und Lunge nach 24 Stunden und nach sieben Tagen. Eine Dosis von 2×10^6 tHA-BOECs wurde i.v. in die Schwanzvene von NOD/SCID/gamma(C)(null)-Mäusen injiziert. Die qPCR wurde mit fünf Replikaten pro Experiment durchgeführt. Die Konzentration an humanen haploiden Genomen in 100 ng DNA, die in den Organen Hirn, Herz, Leber und Lunge an beiden Zeitpunkten bestimmt wurde, ist als Boxplot, bestehend aus fünf verschiedenen Mäusen, gezeigt (n=5). Für das Herz in der Studiengruppe BD Experiment 7d ist der Boxplot für vier verschiedene Mäuse gezeigt (n=4). Die Whisker repräsentieren die minimalen und maximalen Werte und die hervorgehobene horizontale Linie stellt den Median dar. Die Kreise zeigen Ausreißer an und Control steht für die Backgroundkontrolle. Die Genomkonzentration der Biodistributionsproben Lunge (*p=,016), Hirn und Leber (**p=,008), die nach 24 Stunden bestimmt wurde, war signifikant höher als die Konzentration derselben Organe, die nach sieben Tagen bestimmt wurde. Die Genomkonzentration der Biodistributionsprobe Herz (**p=,111), die nach 24 Stunden bestimmt wurde, war nicht signifikant höher als die Konzentration der Biodistributionsprobe Herz, die nach sieben Tagen bestimmt wurde. Nach Bittorf et al. [86].

Die Vermeidung von Kreuzkontaminationen und damit die Eignung der Durchführung der vorgelagerten Prozesse, Organentnahme, Organaufbereitung, DNA-Isolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung, vor der Analyse der Biodistributionsproben mittels qPCR, wurde durch die Analyse derselben Organe von Kontrollmäusen sichergestellt. Kontrollmäuse erhielten keine tHA-BOECs, sondern das entsprechende Volumen an Saline. Bei der Analyse der Organe der Kontrollmäuse auf Abwesenheit von humaner genomischer DNA wurden keine Konzentrationen an humanen Genomen bestimmt, die statistisch signifikant höher waren als die Konzentration der Backgroundkontrolle (siehe Abbildung 25). Auch wenn die Konzentration an haploiden humanen Genomen für die Biodistributionsprobe Herz der Kontrollmäuse (mittlerer Rang=6, n=3) durchschnittlich höher war, ergab sich bei Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests kein statistisch signifikanter Unterschied zur Backgroundkontrolle (mittlerer Rang=3,6; n=5), $U(n=8)=3$, $p=,250$.

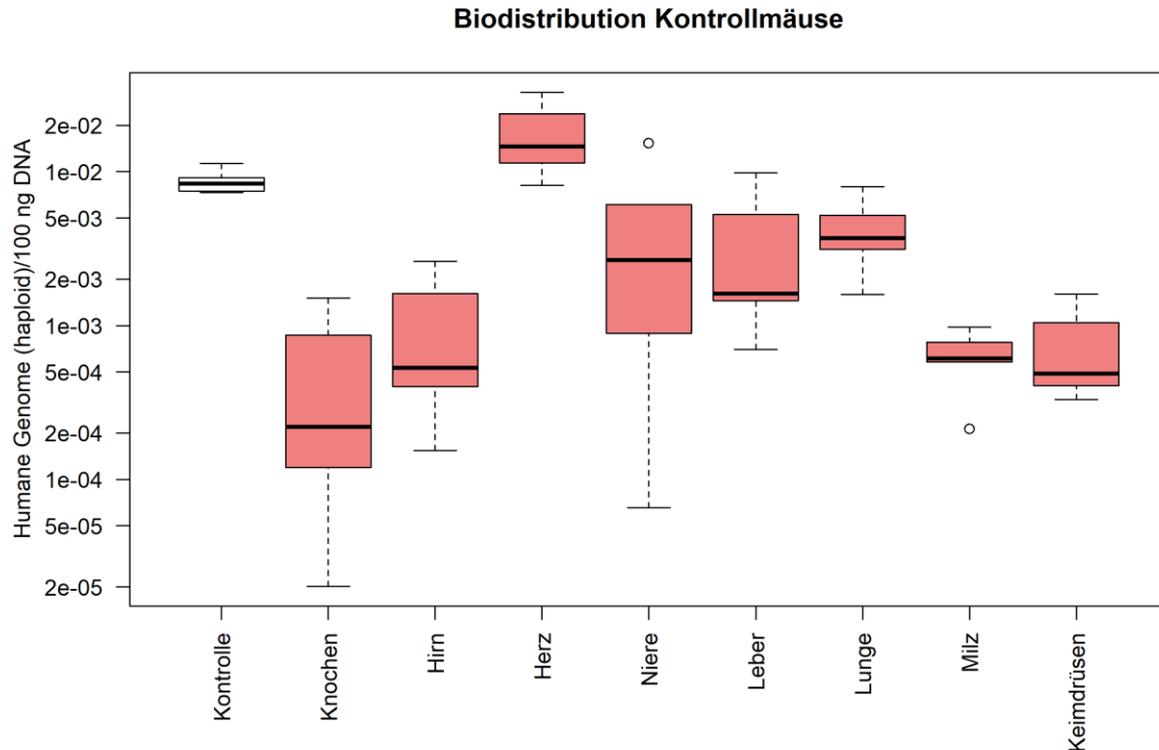


Abbildung 25 Bestimmung der Konzentration an humanen haploiden Genomen in acht verschiedenen Mausorganen der Kontrollmäuse. Eine für 2×10^6 tHA-BOECs volumenäquivalente Dosis an Saline wurde i.v. in die Schwanzvene von NOD/SCID/gamma(C)(null)-Mäusen injiziert. Die qPCR wurde mit fünf Replikaten pro Experiment durchgeführt. Die Konzentration an humanen haploiden Genomen in 100 ng DNA, die in den Organen Hirn, Niere, Leber, Lunge und Milz bestimmt wurde, ist als Boxplot, bestehend aus fünf verschiedenen Mäusen, gezeigt (n=5). Für die Organe Knochen mit Knochenmark und Herz ist der Boxplot für drei verschiedene Mäuse gezeigt (n=3) und für die Keimdrüse für vier verschiedene Mäuse (n=4). Die Whisker repräsentieren die minimalen und maximalen Werte und die hervorgehobene horizontale Linie stellt den Median dar. Die Kreise zeigen Ausreißer an und Kontrolle steht für die Backgroundkontrolle.

Die Bedingungen, ob eine qPCR-Analyse der Biodistributionsproben wiederholt werden muss, wurden anhand der bei diesen Analysen eingesetzten Kontrollproben geprüft. Die Ergebnisse der Überprüfung der Kontrollproben sind in Tabelle 34 und in Abbildung 26 gezeigt.

Tabelle 34 Ergebnisse der Überprüfung der Kontrollproben für Ref10E3 und TE-Puffer für die verschiedenen qPCR-Analysen der Experimente M1-M15 an den 15 verschiedenen Mäusen. Berechnet wurden die Intraassay-Genauigkeits- und -Präzisionswerte von Ref10E3 und ΔCq von TE-Puffer und der Backgroundkontrolle.

Experiment	Genauigkeit ^a	Präzision ^a	ΔCq^b TE-Puffer ^d und Ref mgDNA
Spezifikation	Ref10E3: %Nominaler Wert: $\pm 15\%$	Ref10E3: VK $\leq 15\%$	ΔCq zwischen der Backgroundkontrolle Ref mgDNA und TE-Puffer ≥ 2 .
M1	98,74%	8,75%	5 Replikate negativ ^c
M2	97,15%	12,98%	$\Delta 2,96$; 4 Replikate negativ
M3	101,78%	7,29%	$\Delta 3,04$; 2 Replikate negativ
M4	99,53%	6,26%	$\Delta 2,25^c$

M5	100,47%	6,68%	$\Delta 3,10^c$
M6	98,88%	13,53%	$\Delta 2,06$
M7	101,41%	4,80%	$\Delta 3,11$; 1 Replikat negativ
M8	101,05%	2,73%	$\Delta 3,86$; 4 Replikate negativ
M9	93,53%	12,17%	$\Delta 3,62$; 3 Replikate negativ
M10	101,85%	8,40%	$\Delta 4,25$; 4 Replikate negativ ^c
M11	97,51%	4,88%	$\Delta 4,49$; 2 Replikate negativ
M12	99,60%	2,43%	$\Delta 3,25$; 2 Replikate negativ
M13	103,73%	10,98%	$\Delta 2,12^c$
M14	95,92%	12,03%	$\Delta 3,57$; 4 Replikate negativ
M15	100,69%	11,72%	$\Delta 4,40$; 3 Replikate negativ

^aDie Intraassay-Genauigkeits- und -Präzisionswerte wurden mit fünf Replikaten für jedes Experiment berechnet (n=5). Für die Berechnung von ΔCq wurden die Mittelwerte für Ref mgDNA mit ^bfünf Replikaten (n=5) bzw. ^cvier Replikaten (n=4) verwendet. ^dFür TE-Puffer wurde ebenfalls der Mittelwert verwendet und die Anzahl an negativen Replikaten angegeben.

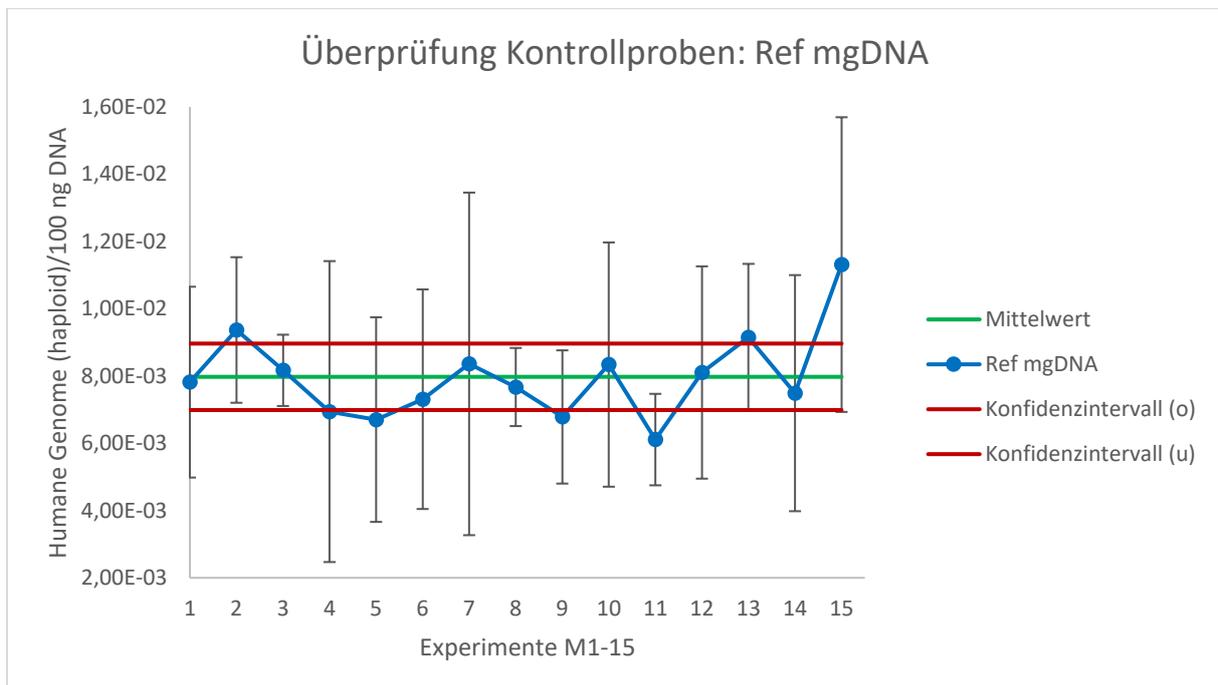


Abbildung 26 Konzentration an haploiden humanen Genomen für die Kontrollprobe Ref mgDNA, die Backgroundkontrolle, für die Biodistributionsexperimente M1-M15. Die Daten stellen den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von fünf Replikaten (n=5) und für M1, M4, M5, M10 und M13 den Mittelwert der haploiden Genomkonzentration von vier Replikaten (n=4) für Ref mgDNA aus den verschiedenen Experimenten dar. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall für das Signifikanzniveau $p=0,01$ dar. Die grüne Linie stellt den Mittelwert (n=15) aus allen Biodistributionsexperimenten M1-M15 dar und die roten Linien markieren das zugehörige obere (o) und untere (u) Konfidenzintervall.

Die Akzeptanzkriterien für alle Kontrollproben der Experimente M1-M15 wurden eingehalten. Aus diesem Grund wurde keine qPCR-Analyse wiederholt.

4. Diskussion

4.1 Umsetzung von GMP-Anforderungen an Rohstoffe im ATMP-

Herstellungsprozess

Bevor ein Arzneimittel als Mittel mit Eigenschaften zur Heilung oder Linderung oder zur Verhütung menschlicher Krankheiten entsprechend § 2 des Arzneimittelgesetzes hergestellt und angewendet werden darf, muss für dieses die Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nachgewiesen werden. Dies gilt auch für Arzneimittel, die aufgrund ihrer Zusammensetzung als Arzneimittel für neuartige Therapien, ATMPs, klassifiziert sind. Im Vergleich zu klassischen Pharmazeutika, wie z.B. Tabletten mit einer niedermolekularen Verbindung als Wirkstoff, gelten jedoch andere Richtlinien und die Voraussetzungen sowie die Parameter für die Sicherstellung der Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit sind unterschiedlich (8). So sind z.B. Anforderungen an die Qualität von zellbasierten Arzneimitteln, die durch Anwendung eines viralen Vektors genetisch modifiziert wurden, um so eine therapeutische Wirkung zu erzielen, in spezifischen Richtlinien der EMA beschrieben (10, 12). Autologe BOECs, isoliert aus dem Blut von Patienten mit schwerer Hämophilie A, gehören zu der Arzneimittelklasse der ATMPs. Durch die genetische Modifikation mit einem lentiviralen Vektor werden diese schließlich als GTMP klassifiziert (2). Die Anforderungen und Empfehlungen dieser spezifischen Richtlinien sollen bereits während der frühen Arzneimittelentwicklung für die Herstellung, Qualitätskontrolle und die Durchführung der präklinischen Studien der tHA-BOECs berücksichtigt werden. Das Ziel ist hier der zu diesem Zeitpunkt bestmögliche Nachweis der Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit des ATMPs vor einer ersten klinischen Anwendung. Einen wichtigen Aspekt bei der Herstellung von zellbasierten Arzneimitteln stellen hierbei die verwendeten Rohstoffe dar. Diese umfassen zum Beispiel Zellkulturmedien für die Zellexpansion oder biologische Enzyme zum Ablösen von Zellen von Plastikoberflächen. Diese Rohstoffe haben, wie bereits erläutert, einen direkten Einfluss auf die Qualität und Sicherheit der Zellen. Für die Isolation und Expansion von BOECs werden u.a. verschiedene Wachstumsfaktoren oder weitere Mediumsupplemente verwendet, die einen starken Einfluss auf das Proliferationsverhalten und die phänotypische Stabilität der Zellen haben bzw. haben können (90, 91). Außerdem besteht vor allem bei der Verwendung von biologischen Mediumsupplementen ein Risiko für mikrobiologische oder virale Kontaminationen (92, 93). Aus diesem Grund fordert das Europäische Arzneibuch und auch der GMP-Leitfaden für ATMPs die Anwendung eines risikobasierten Ansatzes für die Auswahl und den Einsatz von Rohstoffen im

Herstellungsprozess des ATMPs (8, 63). Folglich wurden alle Rohstoffe, die bei der Isolation, Expansion und dem Auftauen und Einfrieren von BOECs benötigt werden, in einen risikobasierten Ansatz eingegliedert und diesem entsprechend bewertet. Für die Durchführung des risikobasierten Ansatzes wurde ein Template erstellt. Der Vorteil davon ist, dass es sehr leicht auf die speziellen Anforderungen des jeweiligen Rohstoffs angepasst werden kann, wobei aber alle grundsätzlich geltenden Anforderungen enthalten sind bzw. enthalten bleiben. Für Rohstoffe, die in einem Herstellungsprozess entsprechend den GMP-Anforderungen eingesetzt werden, gelten grundlegende Anforderungen für die Herstellung und die Qualitätskontrolle beim Rohstoffhersteller, welche unabhängig von der Art des Rohstoffes abgefragt werden. Ähnliches gilt für den Einsatz des Rohstoffs im eigenen ATMP Herstellungsprozess. Ein wichtiger Punkt ist hier beispielsweise, ob und wie lange der Rohstoff in direktem Kontakt mit dem Arzneimittel steht. Solche Aspekte werden standardmäßig abgefragt und haben schließlich einen Einfluss auf die weiteren zu definierenden Maßnahmen. Bestehen darüber hinaus für den Rohstoff besondere Anforderungen, zum Beispiel hinsichtlich Virussicherheit, wie bei der Anwendung von gepooltem humanem Thrombozytenkonzentrat, werden diese separat ermittelt, abgefragt und bewertet. Dies ermöglicht es, dass schnell und effizient alle Anforderungen an verschiedene Rohstoffe ermittelt und der bisherige Stand im Herstellungsprozess aufgezeigt werden kann. Die Gegenüberstellung der Anforderungen und des aktuellen Standes vereinfacht anschließend das Identifizieren von Risiken und das Treffen von adäquaten Maßnahmen, um diese Risiken zu minimieren. Die erstellte Vorlage kann auch direkt für andere GMP-Herstellungsprozesse oder für Prozesse, die sich noch in einer frühen Entwicklungsphase befinden, angewendet werden. Der Vorteil des risikobasierten Ansatzes ist, dass direkt nur diejenigen Rohstoffe eingesetzt oder getestet werden, die aufgrund der Patientensicherheit bei einer Weiterentwicklung des Prozesses vom Laborprozess zur GMP-Herstellung geeignet sind. Müssen kritische Rohstoffe oder auch andere kritische Prozessschritte in einem GMP-Herstellungsprozess geändert werden, muss eine Vergleichsstudie zwischen den in beiden Prozessen hergestellten Arzneimitteln durchgeführt werden (10). Hierbei kann es dazu kommen, falls die beiden Arzneimittel in ihren Eigenschaften nicht oder teilweise nicht miteinander vergleichbar sind, dass neue und zusätzliche Daten zum Nachweis für die Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit für das mit dem geänderten Herstellungsprozess hergestellte Arzneimittel erhoben werden müssen (94). Hierdurch kann die Entwicklung und Translation des Arzneimittels verlangsamt werden und es können weitere Kosten für den Arzneimittelentwickler entstehen. Abschließend ist festzuhalten, dass die eingesetzten Rohstoffe schon sehr früh einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung von zellbasierten ATMPs haben, da Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit direkt davon abhängen. Außerdem ist die Anwendung eines risikobasierten Ansatzes wichtig für die Erfüllung von behördlichen Anforderungen, die an die für die Herstellung des ATMPs eingesetzten Rohstoffe gestellt werden.

4.2 Isolierung, Expansion und Qualitätskontrolle von tHA-BOECs

Die ersten Schritte beim Herstellungsprozess der tHA-BOECs waren die Isolierung und die Expansion von BOECs entsprechend dem Protokoll von Ormiston et al. (56). Anschließend fand eine genetische Modifikation der Zellen mit einem lentiviralen Vektor und eine zweite Expansion der erhaltenen tHA-BOECs bis zum Erreichen des zuvor definierten PD-Intervalls statt. Da jedoch die Isolierung, die Expansion, die Qualitätskontrolle und die Injektion der Zellen an unterschiedlichen Standorten durchgeführt wurden, waren zusätzliche Kryokonservierungs- und Transportprozesse nötig. Diese zusätzlichen Prozessschritte können einen Einfluss auf die Qualität der tHA-BOECs haben. Deshalb muss deren Einfluss beachtet und bewertet werden, insbesondere dann, wenn diese zu einem späteren Zeitpunkt in einem nicht dezentralisierten Herstellungsprozess nicht mehr durchgeführt werden. Dies trifft vor allem auf die Kryokonservierung von Zellen zu. Als Spezifikation für die Viabilität der tHA-BOECs nach Kryokonservierung und erneutem Auftauen wurde ein Wert entsprechend den Erfahrungswerten mit diesem Zelltyp von größer 70% definiert. Der Prozessschritt der Kryokonservierung kann im Allgemeinen, aber auch bei anderen Zelltypen, einen negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben (95). In diesem Zusammenhang ist auch das Erreichen der zuvor definierten Menge an tHA-BOECs, die für einen therapeutischen Effekt notwendig sind, ein weiterer Punkt, der zu beachten ist. Durch die Kryokonservierungs- und Transportschritte kann sich die Zellzahl verringern, sodass durchschnittlich mehr PDs benötigt werden, um die notwendige Menge an therapeutischen Zellen zu erhalten, wie dies im Gegensatz dazu bei Nichtdurchführung dieser zusätzlichen Prozessschritte der Fall wäre. Bei der Expansion der BOECs war also besonders zu beachten, dass einerseits genügend Zellen aus den erhaltenen Ausgangszellen hergestellt werden und diese andererseits nach der zweiten Expansion in einem spezifischen und zuvor definierten PD- und PDT-Intervall liegen. Dieses Intervall ist besonders wichtig, um eine Vergleichbarkeit herzustellen zwischen den Daten des präklinischen Zellprodukts, die mit diesen Produktchargen erhoben wurden, mit Daten, die zu einem späteren Zeitpunkt erhoben werden (10, 12). Die Spezifikation für das Alter der tHA-BOECs mit relativ hohen PDs von 30 bis 40 kommt zustande, wenn man die Expansion der Zellen bis zum Erreichen einer theoretischen Zellzahl für eine klinische Anwendung beim Patienten mit einbezieht. Im Gegensatz dazu würde die Durchführung der worst-case-Szenario-Biodistributionsstudie und auch die Durchführung von Proof-of-Concept-Studien im Mausmodell die Anwendung von Zellen mit deutlich niedrigeren PDs erlauben, da hier deutlich weniger Zellen für das Erreichen eines therapeutischen Effekts nötig wären. Demzufolge sind Vorteile bei der Anwendung von BOECs, dass diese eine hohe Expansionskapazität, eine relativ konstante Wachstumsrate - kontrolliert durch die Überprüfung der PDT - und einen stabilen Phänotyp über einen längeren Zeitraum während der Expansion aufweisen (55, 56). Trotzdem kann es vor allem bei sehr hohen PDs zu phänotypischen Veränderungen kommen (53, 54). Hier kann z.B. eine Verunreinigung der

Zellpopulation durch die Transition von einem endothelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp vorkommen (96). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Identität und die Reinheit des zellbasierten ATMPs während und insbesondere am Ende der Expansion zu überprüfen. In der wissenschaftlichen Literatur werden hierfür die Überprüfung der Endothelzellspezifischen Pflastersteinmorphologie im Lichtmikroskop und die Überprüfung der Expression von verschiedenen Endothelzellspezifischen und nicht Endothelzellspezifischen Zellmarkern beschrieben (54-56, 97). Konsequenterweise ist grundsätzlich schon sehr früh die Entwicklung und Durchführung einer geeigneten Qualitätskontrollstrategie, die die spezifischen Aspekte des jeweiligen ATMPs unter Anwendung des risikobasierten Ansatzes berücksichtigt, ein besonders wichtiger Aspekt. Für die ATMPs bzw. die Chargen des ATMPs, die während den präklinischen Studien oder später in ersten klinischen Prüfungen eingesetzt werden, sind hier zwei Punkte besonders relevant. Erstens muss sichergestellt werden, dass nur Chargen des ATMPs eingesetzt werden, für die die geforderten Spezifikationen für Qualität, Wirksamkeit und Sicherheit durch die Überprüfung mit analytischen Methoden erfüllt wurden. Zusätzlich zu den bisher genannten und zu überprüfenden Parametern ist hier z.B. noch die Durchführung eines Tests zur Sicherstellung der Abwesenheit von Mykoplasma-Kontaminationen wichtig. Mykoplasmen sind die häufigste Kontaminationsquelle bei Zellkulturprozessen im Labor und diese können einen starken Einfluss auf die Proliferationsrate, die Genexpression oder auch auf die Zellmorphologie haben (98, 99). Eine solche Kontamination könnte also die Ergebnisse einer präklinischen Prüfung und deren Interpretation verfälschen, sollte diese vorher nicht entdeckt werden. Analog müssen für tHA-BOECs und im Allgemeinen für ATMPs, die in einem aseptischen Prozess hergestellt werden, analytische Methoden zur Überprüfung der mikrobiologischen Sicherheit und des Auftretens von Kontaminationen mit Bakterienendotoxinen durchgeführt werden. Diese sind, wie auch die Überprüfung der Abwesenheit von Mykoplasma-Kontaminationen, bei der Herstellung von ATMPs für die Anwendung beim Patienten durch das Europäische Arzneibuch vorgeschrieben (67, 68, 71, 100). Deshalb wurden diese bereits bei der Qualitätskontrolle nach der Herstellung der präklinischen Chargen des ATMPs durchgeführt. Zweitens muss bei der Auswahl der eingesetzten analytischen Methoden für die Qualitätskontrolle einer präklinischen Charge des ATMPs bereits beachtet und nachgewiesen werden, dass diese Methoden für den vorgesehenen Einsatzzweck geeignet und ausreichend sensitiv sind. Des Weiteren sollten diese Analysenmethoden hinreichend definiert und beschrieben sein, so dass die zu diesem Zeitpunkt erhobenen Daten zum Beispiel mit Daten aus späteren Vergleichsstudien abgeglichen werden können (10, 101). Vor der Anwendung einer analytischen Methode für die Qualitätskontrolle eines ATMPs, das in einer klinischen Prüfung der Phase I verwendet werden soll, muss die Methode, sofern diese der Sicherstellung der Patientensicherheit dient, hingegen nach Stand der Technik validiert sein (8, 31). Hierbei kann jedoch schrittweise vorgegangen werden, so dass für erste klinische Prüfungen der Phase I zunächst nur die

analytischen Methoden für die mikrobiologische Überprüfung des ATMPs und weitere Methoden zur Sicherstellung der Patientensicherheit validiert werden müssen (8). Die Ergebnisse der Qualitätskontrolle der verwendeten Charge der tHA-BOECs für die präklinische Biodistributionsstudie lagen alle, mit Ausnahme der Viabilität nach dem Auftauen der Zellen, innerhalb der zuvor definierten Spezifikationen. Die Viabilität nach dem Auftauen wurde anschließend bei drei weiteren QC-Vials vor der Anwendung in UPO getestet, wobei sich die Ergebnisse innerhalb der Spezifikation befanden. Daraufhin konnten die tHA-BOECs für die Anwendung in der Biodistributionsstudie freigegeben werden, da alle Kriterien hinsichtlich Qualität, Wirksamkeit und Sicherheit erfüllt waren.

4.3 Methodenentwicklung und Methodvalidierung

Die qPCR-Methode, die für die Untersuchung des Biodistributionsprofils eines zellbasierten Arzneimittels angewendet wird, muss für den vorgesehenen Verwendungszweck geeignet sein und den regulatorischen Anforderungen entsprechen. Dies ist wichtig, um sicherzustellen, dass verlässliche Daten generiert werden, die z.B. für die Beantragung einer klinischen Prüfung herangezogen werden können. Hierfür wird eine gründlich charakterisierte und möglichst vollständig validierte Analysenmethode benötigt (30). Außerdem müssen ausreichend Informationen zu den angewendeten experimentellen Methoden und der Probenvorbereitung, in diesem Fall besteht diese aus Organaufbereitung, DNA-Isolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung, bereitgestellt werden. Ansonsten können die erhobenen Daten nicht sinnvoll interpretiert, eingeordnet und keine validen Aussagen zum toxikokinetischen Sicherheitsprofil des ATMPs getroffen werden (29). Die Methodvalidierung schließt hierbei die Robustheit der Methode mit ein. Diese soll bereits während der Methodenentwicklung mit in Betracht gezogen werden, da hierdurch direkt diejenigen Methodenparameter identifiziert und fokussiert werden können, die einen Einfluss auf die Performance der Methode haben (31). Bei einer qPCR-basierten Methode gehören hierzu beispielsweise die Konzentration der Primer und der Sonde, die Annealingtemperatur und die Elongationszeit. Diese Parameter können einen großen Einfluss auf die Sensitivität, Genauigkeit und Präzision der Methode haben (29). Am Anfang der Methodenentwicklung wurde bei der Untersuchung dieser Parameter zuerst besonderer Wert auf die Sensitivität der Methode gelegt. Der Grund hierfür war, dass die Erfüllung des Quantifizierungslimits von mindestens einem humanen Genom in einem Überschuss von 1×10^6 Mausgenomen eine wichtige Anforderung an die qPCR-Methode ist. Die Daten zeigen hier, dass verschiedene Parameter einen unterschiedlich großen Einfluss auf die Sensitivität der Methode haben. Die Konzentration der Primer z.B. hat, im Vergleich zur Konzentration der Hydrolyse-Sonde, nur einen sehr geringen Einfluss auf die Sensitivität und hier könnten theoretisch gewisse Konzentrationsabweichungen toleriert werden. Am Anfang der Methodenentwicklung ist normalerweise - noch vor der Untersuchung der Sensitivität - insbesondere die Spezifität der Methode

entscheidend. Dies trifft besonders auf qPCR-basierte Methoden zu, da die Spezifität hauptsächlich von den ausgewählten Primer- und Sondensequenzen abhängig ist (26, 28). Der erste Schritt bei der Entwicklung einer qPCR-basierten Methode ist also das Design von geeigneten Primern und zum Beispiel einer Sonde im Falle, dass keine SYBR Green-basierte Methode durchgeführt wird (14). Da die Sequenzen der Primer und der Hydrolyse-Sonde, die bei der hier beschriebenen qPCR-Methode zur Anwendung kamen, aber bereits publiziert waren und ihre Spezifität bekannt ist (35), konnte zu diesem Zeitpunkt direkt mit der Überprüfung der geforderten Sensitivität begonnen werden. Speziell für die Biodistributionsstudie wurde die Spezifität der qPCR-Methode aber zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich nach Abschluss der Validierung, für das hier angewendete NOD/SCID/gamma(C)(null)-Mausmodell und die acht untersuchten Organe gezeigt. Der Grund hierfür war, dass Creane et al. sowohl ein anderes Mausmodell anwendeten als auch unterschiedliche Organe untersuchten (35).

Während der Evaluierung des Methodenparameters Hydrolyse-Sondenkonzentration, nach der Untersuchung der Annealingtemperatur und der Primerkonzentration, wurde zum ersten Mal die Spezifikation für die Sensitivität der Methode erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde dann die Entscheidung getroffen, dieses Ergebnis zunächst unter Anwendung verschiedener Reagenzienchargen und mit der Durchführung durch unterschiedliche Operatoren zu reproduzieren, bevor weitere Parameter untersucht werden. Diese Experimente dienten im weiteren Verlauf auch zur Anpassung bzw. Festlegung der Spezifikationen für die Validierungsexperimente, da diese bereits einen ähnlichen Versuchsaufbau hatten. Ein Beispiel hierfür war die Anpassung der Spezifikation für den Fehlerwert der Kalibrationskurve. Im Anschluss wurden, mit Ausnahme der Elongationszeit, Parameter für die qPCR-Methode untersucht, die aufgrund der Probenvorbereitung oder der praktischen Durchführung der qPCR-Methode von Bedeutung waren. Während der Durchführung der DNA-Isolierung fiel beispielsweise auf, dass vor allem bei kleineren Mausorganen wie den Keimdrüsen die geforderten DNA-Konzentrationen der für die qPCR-Methode einzusetzenden Lösungen teilweise nicht erreicht werden konnten. Aus diesem Grund mussten stärker verdünnte Lösungen eingesetzt werden, die schlussendlich eine größere Menge an EDTA, einem Chelatkomplexbildner der einen negativen Einfluss auf die Effizienz der qPCR-Methode haben kann, enthielten (89). Deshalb wurde während der Methodenentwicklung die Robustheit der qPCR-Methode gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen an EDTA untersucht.

Als nächstes und als alle geforderten Parameter zunächst definiert waren, wurde für die qPCR-basierte Analysenmethode eine vollständige Methodvalidierung entsprechend den Richtlinien der EMA und des ICH durchgeführt (30, 31). Des Weiteren wurden die Anforderungen der Monographie des Europäischen Arzneibuchs eingehalten, welche spezifische Richtlinien für die Validierung von qualitativen oder quantitativen PCR-Methoden enthält (32). Die Daten der qPCR-Validierung zeigen, dass die Konzentration an humanen Genomen in einem Überschuss an murinen Genomen mit

ausreichender und hoher Genauigkeit, Präzision und Linearität innerhalb des Konzentrationsintervalls von $1:1 \times 10^3$ bis $1:1 \times 10^6$ bestimmt werden kann. Innerhalb dieses Konzentrationsintervalls wurden alle definierten Akzeptanzkriterien erfüllt und damit stellt dieses den Arbeitsbereich der qPCR-Methode dar. Für die Referenzstandards mit höheren Ausgangskonzentrationen an humaner genomischer DNA, Ref10E1 und Ref10E2, wurden die Akzeptanzkriterien für die Genauigkeit der qPCR-Methode ganz knapp nicht erfüllt. Bei der Analyse von unverdünnter humaner genomischer DNA, Ref hgDNA, wurden die Akzeptanzkriterien sowohl für die Genauigkeit als auch für die Präzision nicht erreicht. Außerdem wurde bei der Analyse dieses Referenzstandards im Durchschnitt eine höhere Standardabweichung festgestellt. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die hohe initiale Ausgangskonzentration an humaner genomischer DNA in diesen Referenzstandards. Diese kann zu inhibitorischen Effekten oder zur Verhinderung einer akkuraten DNA-Amplifikation führen (27). Um jedoch den Herstellungsprozess oder die Langzeitstabilität der Referenzstandards als mögliche Ursache für die abweichenden Genauigkeits- und Präzisionswerte auszuschließen, wurden bei der Methodvalidierung zwei verschiedene Chargen an Referenzstandards, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellt wurden, verwendet. Diese wurden außerdem von zwei verschiedenen Operatoren anhand des gleichen Herstellungsprotokolls hergestellt. Eine Charge dieser Referenzstandards war zum Zeitpunkt der Validierung bereits älter als fünf Monate und die bestimmten Konzentrationen an humanen Genomen dennoch sehr konstant. Hier ist zusätzlich noch der Herstellungsprozess der Referenzstandards im Detail zu betrachten. Eine Charge an Referenzstandards, Ref hgDNA, Ref10E1-Ref10E6 und Ref mgDNA, wird immer innerhalb eines durchgängigen und standardisierten Herstellungsprozesses ausgehend von reiner humaner und reiner muriner genomischer DNA hergestellt. Dieser Prozess beginnt mit der seriellen Verdünnung von reiner humaner genomischer DNA (Ref hgDNA). Anschließend werden die stärker verdünnten Referenzstandards aus diesen Ausgangslösungen hergestellt. Folglich hätte ein Fehler am Anfang des Herstellungsprozesses, z.B. bei der Verdünnung des Referenzstandards Ref10E2, Auswirkungen auf alle weiteren und stärker verdünnten Referenzstandards. Dieser systematische Fehler würde durch die dreimalige Überprüfung jeder neuen Charge an Referenzstandards vor deren Anwendung mit hoher Wahrscheinlichkeit entdeckt werden. Da jedoch für die geringer konzentrierten Referenzstandards die Akzeptanzkriterien für Genauigkeit und Präzision erfüllt waren, kann diese mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Bei der Beurteilung der Daten der Methodvalidierung für den Arbeitsbereich hinsichtlich der Eignung der Methode bei bestimmungsgemäßer Anwendung ist von Bedeutung, dass durch die präklinische Biodistributionsstudie eine potentielle klinische Situation so gut wie möglich abgebildet werden soll (10). Deshalb wurden auch die bei den Tierexperimenten eingesetzten Zellzahlen anhand der später beim Patienten theoretisch benötigten Zellzahlen berechnet. Bei der worst-case-Szenario-Biodistributionsstudie wurde dementsprechend zur Bestimmung der Verteilung, Persistenz und

Eliminierung der tHA-BOECs im Mausmodell die i.v.-Applikation der Zellen mit einer Einmaldosis von 2×10^6 tHA-BOECs durchgeführt. Hierbei ist der Arbeitsbereich der qPCR-Methode, das Konzentrationsintervall von $1:1 \times 10^3$ bis $1:1 \times 10^6$ humaner gegenüber muriner Genome, ausreichend. Da bei der geplanten klinischen Anwendung der tHA-BOECs ein Medizinprodukt, das subkutan angewendet werden und als Zellträger dienen soll, vorgesehen ist, ist die zu erwartende Verteilung der tHA-BOECs bei gleichen Zelldosen deutlich geringer als bei der Anwendung der i.v.-Applikation zum Erreichen der maximalen systemischen Exposition. Des Weiteren werden bei der i.v.-Applikation von BOECs oder auch bei der Anwendung von anderen Applikationswegen generell keine Konzentrationen von humanen Genomen in den Mausorganen erwartet, die höher als das Konzentrationsverhältnis $1:1 \times 10^3$ sind. Der Grund hierfür ist die grundsätzlich geringe zu erwartende Deposition von BOECs oder deren Vorläuferzellen in gesunden Organen im Mausmodell (102, 103). Diese Aussage wird unterstützt durch zuvor veröffentlichte Daten zur Untersuchung des Biodistributionsverhaltens von BOECs. Diese Daten deuten auf eher geringe Konzentrationen an humanen Zellen in Mausorganen nach i.v.-Applikation oder bei der Anwendung von z.B. Zellträgerstrukturen hin (13, 62). Jedoch war das Ziel bei der Methodvalidierung zuerst den gesamten Quantifizierungsbereich abzudecken, um anschließend das Intervall zwischen der maximalen und minimalen quantifizierbaren Konzentration an humanen Genomen in einem Überschuss von Mausgenomen zu bestimmen. Dies ist auch der Grund für die Anwendung des Referenzstandards Ref hgDNA für die Kalibrationskurve, obwohl die Daten der Methodenentwicklung bereits andeuteten, dass hierbei die Spezifikationen für die Genauigkeit und die Präzision höchstwahrscheinlich nicht eingehalten werden können. Im Gegensatz dazu wurden die Spezifikationen für die Genauigkeit und die Präzision bei den Referenzstandards Ref10E1 und Ref10E2 nur sehr knapp nicht erfüllt. Hier wurde, entsprechend den Daten aus der Methodenentwicklung, erwartet, dass diese Spezifikationen eingehalten werden können, da bei der Validierung ein standardisiertes Vorgehen und eine besser charakterisierte Methode vorlagen.

Bei der Untersuchung der Systemeignung und der Wiederfindungsrate (SSC) trat interessanterweise ein ähnliches Phänomen auf, wie es bereits von Funakoshi et al. (14) beschrieben wurde. Beim Anspiken von gefriergetrocknetem Organpulver mit tHA-BOECs oder im Fall von Funakoshi et al. beim Transplantieren einer definierten Menge an MSCs in die Niere von Mäusen wurden nach Durchführung der Probenvorbereitung bei der Analyse mittels qPCR geringere Zellkonzentrationen bestimmt, als erwartet. Beispielsweise war diese Konzentration an humanen Genomen beim Anspiken von Organpulver der Leber mit tHA-BOECs im Vergleich zu der erwarteten und berechneten Konzentration an gespikten humanen Genomen nur 21,94%. Eine mögliche Ursache hierfür, welche auch Funakoshi et al. nennen, ist der potentielle Verlust von humaner genomischer DNA während der DNA-Extraktion (14). Weitere mögliche Gründe können die an sich relativ hohe Variabilität der Zellzählung bei der Herstellung der SSC oder die praktische Durchführung beim Anspiken des Organpulvers mit tHA-BOECs

sein. Wie bereits erwähnt, ist die Bestimmung der Sensitivität bzw. des Quantifizierungslimits der Methode gefordert (31). Dabei muss die Sensitivität der Methode hoch genug sein und zur Erfüllung der regulatorischen Anforderungen dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik entsprechen (12). Jedoch ist die Bestimmung des aktuellen Stands von Wissenschaft und Technik nicht trivial, da der Vergleich der Sensitivitäten zwischen verschiedenen publizierten Methoden aus mehreren Gründen schwierig ist. Zu diesen Gründen gehören bei der Untersuchung der Biodistribution von Zellen u.a. folgende:

- Anwendung verschiedener Analysemethoden, z.B. qPCR oder Durchflusszytometrie
- unterschiedliche Definition und Berechnung des Quantifizierungslimits
- fehlende oder nicht veröffentlichte Werte für Genauigkeit, Präzision und Linearität der Methode
- andere Handhabung und unterschiedliche Erstellung und Berechnung von Kalibrationskurven

Analysiert und vergleicht man zum Beispiel die Sensitivitäten von bisher veröffentlichten qPCR-Methoden, die auf dem Nachweis von hAlu-Repeatsequenzen (15, 35, 39, 59) oder anderen humanen Sequenzen (37, 38) beruhen, könnte man ein Quantifizierungslimit von einem humanen Genom in 1×10^6 Mausgenomen als aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik zugrunde legen. Deshalb wurde der Nachweis dieses Quantifizierungslimits als Ziel bei der Methodvalidierung definiert und dessen Einhaltung konnte bei Anwendung unterschiedlicher experimenteller Bedingungen in den vier Validierungsexperimenten nachgewiesen werden.

Für die finale Beurteilung der Eignung der qPCR-Methode ist die Bewertung des teilweisen Auftretens eines positiven Signals in der Nichtzielkontrolle während der Methodenentwicklung und auch der Methodvalidierung ein wichtiger Punkt. Ein Grund für das Auftreten eines solchen Signals kann z.B. eine unvorhergesehene und unspezifische Reaktion zwischen den Primern und der Hydrolyse-Sonde, vor allem bei hohen qPCR-Zyklen, sein (14, 35). Ein weiterer Grund könnte das Einbringen einer zufälligen Kontamination mit humaner genomischer DNA durch den Operator sein (32). Deshalb wurden sowohl bei der Methodenentwicklung als auch bei der Methodvalidierung verschiedene Methoden benutzt, um die Ursache dieses Signals genauer zu untersuchen. Zu diesen gehörten neben der Durchführung der qPCR-Methode mit variierenden Mastermixzusammensetzungen die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse und einer Gelelektrophorese mit verschiedenen Referenzstandards und Kontrollproben zur Untersuchung der Struktur des entstehenden Amplikons. Interessanterweise zeigten diese Experimente, dass im Vergleich zu den veröffentlichten Daten von Creane et al. zwei unterschiedliche Amplikons entstehen (35). Eine Erklärung hierfür ist, dass die angewendeten hAlu-Zielsequenzen repetitiv sind und lediglich eine Konsensussequenz darstellen, so dass mehr als nur eine Amplikonstruktur entstehen kann (14, 36, 39). Auch konnte gezeigt werden,

dass die entstandenen Amplikonstrukturen aus den Referenzstandards, z.B. Ref hgDNA und Ref mgDNA, größtenteils identisch sind mit denen, die in der Nichtzielkontrolle, für die ein positives Signal angezeigt wurde, nachgewiesen wurden. Dies deutet eher auf das zufällige Einbringen einer Kontamination, z.B. bei manuellen Pipettierprozessen oder bei der Verwendung der Referenzstandards durch den Operator, hin. Darüber hinaus ist aber eine klare Abnahme der Häufigkeit und des Durchschnittswerts an humanen Genomen in der Nichtzielkontrolle von der Methodenentwicklung bis zur Methodvalidierung erkennbar. Hierfür können insbesondere zwei verschiedene Aspekte ursächlich sein. Erstens wurden die Reaktionsbedingungen und die Parameter der qPCR-Methode bis zur Methodvalidierung noch optimiert. Zweitens wurde innerhalb dieses Zeitraums die praktische Durchführung der qPCR-Methode, inklusive des Reinigungskonzeptes vor und nach der Durchführung der manuellen Pipettierprozesse, optimiert und standardisiert. Bei den Validierungsexperimenten war die durchschnittliche Konzentration an humanen Genomen in der Nichtzielkontrolle extrem gering, so dass hier ein Einfluss auf die Performance der qPCR-Methode als sehr niedrig eingestuft wurde. Jedoch konnte durch diese beiden Maßnahmen das Auftreten eines positiven Signals in der Nichtzielkontrolle nicht vollständig verhindert werden. Der nächste Schritt, um diesem Ziel näher zu kommen, wäre die Implementierung eines Raumkonzeptes entsprechend der Monographie 2.6.21 des Europäischen Arzneibuchs (32). Dabei werden bestimmte Prozessschritte nur in definierten und abgeschlossenen Bereichen durchgeführt. Beispielsweise wird die Herstellung aller DNA-Template freien Reagenzien in einem separierten Raum oder unter Anwendung einer eigenen Werkbank durchgeführt. Gleiches gilt entsprechend für Reagenzien, die das DNA-Template oder, nach der Durchführung der qPCR, das Amplikon enthalten. Zum Zeitpunkt der Validierung der Methode konnte ein solches Raumkonzept aus organisatorischen Gründen noch nicht umgesetzt werden. Nach der abschließenden Bewertung aller Daten der Entwicklung und Validierung der qPCR-Methode wurde diese als geeignet eingestuft und für die Anwendung zur Untersuchung der Biodistribution von humanen Zellen in Mausorganen freigegeben.

4.4 Worst-case-Szenario-Biodistributionsstudie mit tHA-BOECs im Mausmodell

Das Ziel der Biodistributionsstudie war, zu bestimmen, ob und gegebenenfalls wie viele tHA-BOECs sich bei einer i.v.-Injektion einer Einmaldosis von 2×10^6 Zellen in verschiedenen Mausorganen verteilen und dort persistieren oder eliminiert werden. Hierzu wurden acht Mausorgane, nämlich Lunge, Herz, Leber, Milz, Niere, Keimdrüsen, Knochen mit Knochenmark und das Hirn, ausgewählt und es wurden zwei Untersuchungszeitpunkte, 24 Stunden und sieben Tage nach Injektion der Zellen, für die Entnahme der Organe definiert. Innerhalb des präklinischen Studienprogramms wurde die Biodistributionsstudie als worst-case-Szenario-Studie durchgeführt. Das heißt, um die maximale systemische Verfügbarkeit bzw. die maximalen Level an tHA-BOECs in den verschiedenen Organen zu erreichen, wurde die i.v.-

Applikation der Zellen angewendet. Im Gegensatz dazu ist bei der geplanten klinischen Applikationsform die subkutane Verabreichung der tHA-BOECs in Kombination mit einem Medizinprodukt vorgesehen. Da bei der Verabreichung der Zellen in Kombination mit einem Medizinprodukt jedoch die Möglichkeit besteht, dass das Medizinprodukt beschädigt wird oder Zellen das intakte Medizinprodukt bei Kontakt zum Blutkreislauf der Patienten verlassen können, wurde zunächst das worst-case-Szenario untersucht. Obwohl die Auftrittswahrscheinlichkeit, insbesondere von Punkt eins, der zu einer spontanen und erhöhten Konzentration an tHA-BOECs im Blutkreislauf der Patienten führen könnte, als sehr gering eingeschätzt wird, sind diese Daten dennoch wichtig für das toxikokinetische Sicherheitsprofil des ATMPs (12). Die verabreichte Dosis von 2×10^6 tHA-BOECs wurde entsprechend der Dosis, die für die präklinischen Proof-of-Concept-Studien angewendet wurde, festgelegt. Hierdurch soll das Auftreten eines solchen worst-case-Szenarios in einer späteren potentiellen klinischen Situation möglichst genau abgebildet werden (6).

Der erste Prozessschritt bei der Biodistributionsstudie war, nach der Injektion der tHA-BOECs, die Entnahme der acht Organe. Bei der Entnahme dieser Organe traten keine Schwierigkeiten auf. Lediglich die Entnahme einer Blutprobe aus dem Herzen der Mäuse für einen unabhängigen Versuch führte dazu, dass das Herz einer Maus nicht mehr für die Studie verwendet werden konnte. Bei den darauffolgenden Prozessschritten, der Probenvorbereitung, Organaufbereitung, DNA-Isolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung war es wichtig, die benötigten Qualitätsanforderungen und Spezifikationen an die Biodistributionsproben sowie an die zu verwendenden Materialien und Reagenzien im Vorfeld zu definieren. Hierzu gehörte u.a. die Auswahl und Festlegung der geeigneten DNA-Isolationsmethode, die gegebenenfalls in Kombination mit einem geeigneten kommerziell erhältlichen Kitsystem durchgeführt werden kann (32). Hier stehen eine ganze Reihe unterschiedlicher Methoden und Systeme zur Verfügung und es muss zum einen auf die Integrität, Reinheit und Quantität der isolierten DNA und zum anderen auf die Isolationsgeschwindigkeit sowie die Kosten Wert gelegt werden. Basierend auf einer ausführlichen Literaturrecherche waren diese Vorgaben u.a. für das DNeasy Blood & Tissue Kit erfüllt. Für dieses Kitsystem wird, nach Durchführung des DNA-Isolierungsprozesses, der Erhalt intakter und reiner DNA beschrieben. Zusätzlich sind bereits für die Isolierung der DNA aus verschiedenen Organen standardisierte Protokolle vorhanden (81, 104, 105). Dies ermöglicht eine unkomplizierte und schnelle Etablierung der Methode. Von größter Bedeutung ist jedoch die Reinheit der isolierten DNA, um die Eignung der Biodistributionsproben, die mittels qPCR analysiert werden sollen, zu gewährleisten und eine potentielle Inhibition der qPCR zu verhindern. Überprüft wird diese durch das Absorptionsverhältnis A_{260} / A_{280} nm, wobei Werte von unter 1,8 auf eine Kontamination, z.B. mit Phenol, oder auf Probleme bei der Durchführung des Extraktionsprozesses selbst hindeuten können (106). Phenol ist ein PCR-Inhibitor und kann die PCR-Amplifikationseffizienz herabsetzen oder zu einer Verschiebung der Cq-Werte bei der qPCR-Analyse

führen (89, 107). Die DNA-Isolierung mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit war größtenteils problemlos. Methodische Schwierigkeiten ergaben sich lediglich bei der Isolierung der DNA aus den Keimdrüsen, da hier wenig Ausgangsmaterial vorhanden war. Wenn die DNA-Konzentration der nach der Isolierung erhaltenen Lösung zu gering war, konnte kein weiterer Isolierungsprozess mehr durchgeführt werden. Ein weiterer wichtiger Punkt, der alle Prozessschritte der Probenvorbereitung betrifft, ist die korrekte Lagerung der jeweils erhaltenen Proben. Auch wenn DNA selbst bei langandauernder Lagerung grundsätzlich stabil ist, können beispielsweise bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen die Qualität und Reinheit verändert und verschlechtert werden (108). Um dies zu verhindern und eine Gleichbehandlung der Proben zu gewährleisten, wurden alle Biodistributionsproben sequentiell bearbeitet, startend mit den Proben der Kontrollmäuse zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen. Der jeweils nachgeschaltete Prozess wurde erst gestartet, nachdem alle Proben vollständig abgearbeitet waren. Nach der Einstellung einer definierten DNA-Konzentration für alle Proben wurde die validierte qPCR-Methode angewendet, um anschließend die Biodistribution der tHA-BOECs zu analysieren.

Die Biodistribution von BOECs wurde bereits von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht und meistens wurde hierbei ein Mausmodell verwendet (13, 22, 109). Jedoch ist es weiterhin schwierig eine eindeutige Aussage über das Biodistributionsprofil von BOECs nach i.v.-Injektion oder auch bei Anwendung anderer Applikationsarten zu machen. Die Gründe hierfür sind, dass von unterschiedlichen Forschungsgruppen verschiedene Methoden und Protokolle genutzt wurden. Die angewendeten Analysemethoden umfassen u.a. Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie oder qPCR. Hierbei können zum Beispiel verschiedene Sensitivitäten bei gleichen und vor allem auch bei verschiedenen Analysemethoden zugrunde liegen oder die Sensitivität bzw. das Quantifizierungslimit wurden nicht untersucht oder es wurden keine Informationen hierzu veröffentlicht (29). Die Studienprotokolle für die Untersuchung der Biodistribution von BOECs unterscheiden sich z.B. durch verschiedene Untersuchungs- bzw. Entnahmezeitpunkte, Zelldosen, Mausmodelle oder durch die Herkunft der Zellen, beispielsweise humane oder murine BOECs (13, 21-23). Zusammenfassend ist ein Vergleich bzw. eine Beurteilung des Biodistributionsverhaltens von BOECs durch eine Literaturrecherche schwierig. Außerdem wurden bisher noch keine Daten von BOECs, die aus dem Blut von Patienten mit der schweren Form der Hämophilie A isoliert wurden, erhoben oder veröffentlicht. Diese Biodistributionsdaten sind eine Voraussetzung für die Translation eines zellbasierten Arzneimittels vor der ersten Anwendung in einer klinischen Prüfung der Phase I. Des Weiteren ist es aufgrund der Einzigartigkeit und der spezifischen Charakteristika eines jeden ATMPs - oder in diesem Falle GTMPs - nicht ausreichend, sich auf die Biodistributionsdaten von ähnlichen Produkten zu verlassen. Dies wird üblicherweise auch nicht von den regulatorischen Behörden akzeptiert (6). GTMPs können sich zum Beispiel durch den Herstellungsprozess, das angewendete Vektorsystem, die

verabreichte Zelldosis und die Applikationsroute unterscheiden, um nur einige Beispiele zu nennen. Deshalb war die Untersuchung des Biodistributionsprofils nach i.v.-Applikation der tHA-BOECs der nächste logische Schritt innerhalb des präklinischen Studienprogramms.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Biodistributionsprofils zeigen eine hohe Konzentration an tHA-BOECs in der Lunge 24 Stunden nach i.v.-Applikation. Damit bestätigt dies die Theorie, dass sich BOECs nach systemischer Applikation zunächst in der Lunge anlagern und anreichern (13, 21). Dementsprechend wurde auch die für beide Untersuchungszeitpunkte durchschnittlich höchste Konzentration an tHA-BOECs in der Lunge gefunden, mit einer signifikant höheren Konzentration an Zellen zum Zeitpunkt 24 Stunden im Vergleich zu den anderen positiven Organen, Hirn, Herz und Leber. Beispielsweise war die Konzentration an Zellen, die nach 24 Stunden in der Lunge gefunden wurde, 63-mal höher als die Konzentration im Herzen, das Organ mit der zweithöchsten Durchschnittskonzentration. Die Forschungsgruppe von Milbauer et al. (13) untersuchten u.a. die Biodistribution von humanen BOECs drei Stunden nach i.v.-Injektion und detektierten mittels qPCR eine signifikant höhere Konzentration an BOECs in der Lunge im Vergleich zu allen anderen untersuchten Organen. Jedoch konnten sie zum Untersuchungszeitpunkt 24 Stunden keine signifikant unterschiedlichen Konzentrationen an BOECs in allen verschiedenen Organen, inklusive der Lunge, feststellen. Ein weiterer Unterschied war, dass keine tHA-BOECs 24 Stunden und sieben Tage nach i.v.-Applikation in den Organen Niere, Milz, Keimdrüsen und Knochen mit Knochenmark nachgewiesen wurden. Die veröffentlichten Daten von Milbauer et al. (13) zeigen im Gegensatz dazu, dass BOECs in allen isolierten Mausorganen auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachgewiesen werden konnten. Andererseits zeigen sowohl die Daten von Milbauer et al. (13) und Somani et al. (109) als auch die Daten zur Untersuchung der tHA-BOECs eine sukzessive Konzentrationsabnahme von Zellen in fast allen Organen unter Berücksichtigung von verschiedenen früheren und späteren Untersuchungszeitpunkten. Für diese sukzessive Konzentrationsabnahme können verschiedene Ursachen, die von unterschiedlichen Prozessen beeinflusst werden, verantwortlich sein. Diese Prozesse, in Kombination mit dem Design der Biodistributionsstudie, sind wichtig für das Verständnis und die Bewertung des toxikokinetischen Sicherheitsprofils, insbesondere wenn man die systemische Verabreichung von tHA-BOECs mit der subkutanen Anwendung in Kombination mit einem Medizinprodukt vergleicht. Der erste Prozess ist die initiale i.v.-Injektion der Zellsuspension und die anschließende Zirkulation der BOECs im Blutstrom der Mäuse. Die Konzentration an im Blutstrom zirkulierenden BOECs und folglich die Konzentration in den verschiedenen Organen ist hierbei erwartungsgemäß am frühesten Untersuchungszeitpunkt am höchsten (21, 23). Ein Grund dafür könnte sein, dass alle Mausorgane direkt nach der Entnahme eingefroren werden, während diese immer noch Blut mit einer wahrscheinlich höheren Konzentration an zirkulierenden BOECs im Vergleich zu einem späteren Entnahmezeitpunkt enthalten. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit,

dass ein Teil der zirkulierenden BOECs oder auch BOECs, die bereits in ein Organ oder Gewebe eingewachsen oder migriert sind, absterben und nicht mehr mittels qPCR nachgewiesen werden können (13, 109). Der Abbau toter Zellen durch Caspasen und DNAsen beginnt beinahe direkt nach der Phagozytose. Deshalb ist die verlässliche Quantifizierung von humaner genomischer DNA, die aus toten Zellen isoliert wurde, sehr unwahrscheinlich. Außerdem weisen die Daten von anderen Forschungsgruppen daraufhin, dass eine hAlu-basierte qPCR-Methode DNA fast ausschließlich von lebenden Zellen amplifiziert (35, 36). Ein weiterer Prozess ist die erwartete Verringerung bzw. der beschleunigte Abbau der lebenden Population an BOECs durch natürliche Killerzellen oder Makrophagen des Empfängers. Das Ausmaß dieser Verringerung hängt hierbei natürlich vom Grad der immunologischen Dysfunktion des ausgewählten Mausmodells ab (13, 110). Für die Verabreichung von humanen Zellen gelten NOD/SCID/gamma(C)(null)-Mäuse als geeignetes Mausmodell, da diese hohe Engraftmentraten von humanen Zellen erlauben. Dies ist aufgrund von mehreren immunologischen Dysfunktionen, z.B. T-Zell-, B-Zell- und natürliche Killerzellinkompetenz, möglich (16). Ein vierter Prozess ist die Migration von zirkulierenden BOECs oder von BOECs, die bereits in verschiedene Gewebe eingewachsen sind. Migration von Endothelzellen ist essenziell für die Angiogenese, aber abhängig von der Situation, den interzellularen Signalen und den Umgebungssignalen, können diese auch während der Vaskulogenese migrieren (111). Folglich könnten BOECs in andere Gewebe migrieren und deshalb in den untersuchten Organen nicht mehr nachweisbar oder in einer geringeren Konzentration vorhanden sein. Jedoch ist der Einfluss dieser Prozesse von der Applikationsform abhängig. So sollte die Konzentration an tHA-BOECs in den Organen nach Verabreichung in das Medizinprodukt im Vergleich zur i.v.-Injektion niedriger sein, da nur ein geringer Teil der Zellen in den Blutstrom gelangen sollte.

Interessanterweise wurde bei der Untersuchung der Biodistribution die durchschnittlich dritthöchste Konzentration an humanen Genomen im Hirn der Mäuse bestimmt. Dies stellt einen Kontrast zu bisher veröffentlichten Daten dar, bei denen ebenfalls qPCR als Analysenmethode verwendet wurde (13). Interessante Fragen in diesem Zusammenhang sind, ob tHA-BOECs in die Blut-Hirn-Schranke migrieren, eingelagert werden oder diese sogar überqueren können (112). Letzteres Verhalten wurde bereits für modifizierte Zellen und für Zellen mit einer anderen Herkunft, z.B. mit einer Makrophagenherkunft, beschrieben (113). Betrachtet man die Organentnahme und die Möglichkeit, dass mit dem Hirn ebenso Teile der Blut-Hirn-Schranke, welche eventuell eingelagerte humane Zellen oder Zellfragmente enthalten, entnommen werden, kann dies ein Grund für die Detektion von humanen Genomen in dieser Probe darstellen. Im Vergleich zu qPCR-basierten Analysenmethoden konnten durch die Anwendung von zum Beispiel Fluoreszenzmikroskopie oder durch die Detektion über Radioaktivität keine oder nur sehr geringe Mengen an speziell markierten BOECs im Hirn nachgewiesen werden (22, 24, 102). Für die Beantwortung dieser Fragestellung könnte der Einsatz von humanen *in-vitro* Modellen

der Blut-Hirn-Schranke oder die Anwendung von histologischen Analysenmethoden helfen (114). Der Einsatz von histologischen Analysen zur Bestätigung der qPCR-Ergebnisse für die untersuchten Organe hätte den Vorteil, dass im Vergleich zur qPCR lebende Zellen statt DNA detektiert und hinsichtlich ihrer Viabilität bewertet werden könnten (39).

Auffällig ist außerdem, dass - im Vergleich zu anderen Forschungsgruppen - keine tHA-BOECs im Knochen mit Knochenmark gefunden wurden (13, 21, 22). Im Gegensatz zu deren Protokollen wurde hier jedoch das Knochenmark nicht vom Knochen separiert, sondern als eine gemeinsame Probe untersucht. Im Studienprotokoll war die Entnahme des Femurs vorgeschrieben und das Knochenmark wurde nicht entfernt (115). Da endotheliale Vorläuferzellen vom Knochenmark abstammen (57) und BOECs verschiedenen Ursprungs unter Anwendung verschiedener Analysenmethoden bereits von unterschiedlichen Forschungsgruppen im Knochenmark nachgewiesen werden konnten, scheint es sehr wahrscheinlich, dass wiederverabreichte tHA-BOECs ebenso im Knochenmark nachgewiesen werden können (13, 21-23). Die Analyse einer kombinierten Probe aus Knochen und Knochenmark, anstatt einer reinen Knochenmarksprobe, kann der Grund gewesen sein, warum keine humanen Genome bestimmt werden konnten. Wahrscheinlich fiel die Konzentration an humanen Genomen damit unter das Quantifizierungslimit.

5. Schlussfolgerung

Abschließend ist nochmals die Wichtigkeit der Daten zum Biodistributionsprofil der tHA-BOECs hervorzuheben. Diese liefern wichtige Erkenntnisse zum toxikokinetischen Sicherheitsprofil des ATMPs und sind somit essentiell für die Bewertung der Patientensicherheit vor einer ersten klinischen Anwendung. Um die Validität dieser Daten sicherzustellen, wurde eine sehr sensitive, präzise und genaue Analysenmethode verwendet. Diese qPCR-basierte Methode wurde außerdem zur Erfüllung der regulatorischen Anforderungen auch schon für spätere GLP-konforme Sicherheitsstudien entsprechend den Richtlinien des ICHs und der EMA validiert. Bei der Validierung wurde die Spezifität, Robustheit, Genauigkeit, Präzision, Linearität, der Arbeitsbereich und das Quantifizierungslimit der Methode anhand definierter Spezifikationen überprüft. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die qPCR-Methode zur Untersuchung von humanen Zellen in verschiedenen Mausorganen alle Spezifikationen erfüllt und dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik entspricht. Der nächste Schritt bei der Entwicklung und Translation des zellbasierten ATMPs wäre nun die GLP-konforme Untersuchung der Biodistribution im Mausmodell mit der geplanten klinischen Applikationsform. Vorgesehen ist hier die subkutane Verabreichung der tHA-BOECs in Verbindung mit einem Medizinprodukt. Diese Daten - in Verbindung mit den Daten der hier beschriebenen worst-case-Szenario-Biodistributionsstudie -

ermöglichen eine umfangreichere und genauere Bewertung des toxikokinetischen Sicherheitsprofils des zellbasierten Arzneimittels und folglich der Sicherheit für den Patienten.

6. Referenzen

1. Verordnung (EG) Nr. 1394/2007 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 13. November 2007 über Arzneimittel für neuartige Therapien und zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 (ABl. EU. L 324 vom 10.12.2007, S. 121). . <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1394&from=de>. Accessed 04 February 2020.
2. European Medicines Agency (2015). Reflection paper on classification of advanced therapy medicinal products (EMA/CAT/600280/2010 rev.1). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/06/WC500187744.pdf: Accessed 04 February 2020.
3. Ancans J. Cell therapy medicinal product regulatory framework in Europe and its application for MSC-based therapy development. *Front Immunol.* 2012;3:253.
4. VERORDNUNG (EU) 2017/745 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 5. April 2017 über Medizinprodukte, zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG, der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 und der Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 und zur Aufhebung der Richtlinien 90/385/EWG und 93/42/EWG des Rates <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0745&from=DE>. Accessed 04 February 2020.
5. Funk MB, Frech M, Spranger R, Keller-Stanislawski B. [Safety monitoring of cell-based medicinal products (CBMPs)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2015;58(11-12):1239-46.
6. European Medicines Agency (2008). Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003942.pdf. Accessed 04 November 2019.
7. Paul-Ehrlich-Institut Innovationsbüros (2012). Arzneimittel für neuartige Therapien ATMP - Advanced Therapy Medicinal Products Regulatorische Anforderungen und praktische Hinweise. https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/regulation/beratung/innovationsbuero/broschuere-atmp.pdf?__blob=publicationFile&v=4. Accessed 04 February 2020.
8. European Commission (2017). Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2017_11_22_guidelines_gmp_for_atmps.pdf. Accessed 04 November 2019.
9. Ten Ham RMT, Hoekman J, Hovels AM, Broekmans AW, Leufkens HGM, Klungel OH. Challenges in Advanced Therapy Medicinal Product Development: A Survey among Companies in Europe. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;11:121-30.
10. European Medicines Agency (2019). Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically_en.pdf. Accessed 04 November 2019.
11. Lehmann J, Schulz RM, Sanzenbacher R. [Strategic considerations on the design and choice of animal models for non-clinical investigations of cell-based medicinal products]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2015;58(11-12):1215-24.
12. European Medicines Agency (2018). Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (EMA/CAT/80183/2014).

https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf. Accessed 04 November 2019.

13. Milbauer LC, Enenstein JA, Roney M, Solovey A, Bodempudi V, Nichols TC, et al. Blood outgrowth endothelial cell migration and trapping in vivo: a window into gene therapy. *Transl Res.* 2009;153(4):179-89.
14. Funakoshi K, Bagheri M, Zhou M, Suzuki R, Abe H, Akashi H. Highly sensitive and specific Alu-based quantification of human cells among rodent cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):13202.
15. McBride C, Gaupp D, Phinney DG. Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real-time PCR. *Cytotherapy.* 2003;5(1):7-18.
16. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood.* 2002;100(9):3175-82.
17. Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Faulkner L, Raut S, Gupta S. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):935-45.
18. Sensebe L, Fleury-Cappellesso S. Biodistribution of mesenchymal stem/stromal cells in a preclinical setting. *Stem Cells Int.* 2013;2013:678063.
19. Shim G, Lee S, Han J, Kim G, Jin H, Miao W, et al. Pharmacokinetics and in vivo fate of intra-articularly transplanted human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2015;24(9):1124-32.
20. Zscharnack M, Krause C, Aust G, Thummler C, Peinemann F, Keller T, et al. Preclinical good laboratory practice-compliant safety study to evaluate biodistribution and tumorigenicity of a cartilage advanced therapy medicinal product (ATMP). *J Transl Med.* 2015;13:160.
21. Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C, et al. Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. *Stem Cells.* 2007;25(10):2660-9.
22. Smits PA, Kleppe LS, Witt TA, Mueske CS, Vile RG, Simari RD. Distribution of circulation-derived endothelial progenitors following systemic delivery. *Endothelium.* 2007;14(1):1-5.
23. Lin Y, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood.* 2002;99(2):457-62.
24. Reyes B, Coca MI, Codinach M, Lopez-Lucas MD, Del Mazo-Barbara A, Caminal M, et al. Assessment of biodistribution using mesenchymal stromal cells: Algorithm for study design and challenges in detection methodologies. *Cytotherapy.* 2017;19(9):1060-9.
25. Salvadori M, Cesari N, Murgia A, Puccini P, Riccardi B, Dominici M. Dissecting the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of MSCs to Overcome Limitations in Their Clinical Translation. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;14:1-15.
26. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif.* 2017;14:19-28.
27. Hedman J, Radstrom P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. *Methods Mol Biol.* 2013;943:17-48.
28. Rodriguez A, Rodriguez M, Cordoba JJ, Andrade MJ. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol Biol.* 2015;1275:31-56.
29. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22.
30. European Medicines Agency (2011). Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**).
https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Accessed 04 November 2019.
31. ICH Expert Working Group (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf. Accessed 04 November 2019.
32. Council of Europe (2008). Nucleic acid amplification techniques. European Pharmacopoeia, 9th Ed. Council of Europe, Strasbourg, 07/2014:20621.

33. Food and Drug Administration (2013). Guidance for Industry Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products (FDA-2012-D-1038). <https://www.fda.gov/media/87564/download>. Accessed 04 November 2019.
34. Food and Drug Administration (2006). Guidance for Industry Gene Therapy Clinical Trials - Observing Subjects for Delayed Adverse Events (2005D-0310). <https://www.fda.gov/media/72225/download>. Accessed 04 November 2019.
35. Creane M, Howard L, O'Brien T, Coleman CM. Biodistribution and retention of locally administered human mesenchymal stromal cells: Quantitative polymerase chain reaction-based detection of human DNA in murine organs. *Cytherapy*. 2017;19(3):384-94.
36. Schneider T, Osl F, Friess T, Stockinger H, Scheuer WV. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR--an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(7):571-82.
37. Becker M, Nitsche A, Neumann C, Aumann J, Junghahn I, Fichtner I. Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br J Cancer*. 2002;87(11):1328-35.
38. Song P, Xie Z, Guo L, Wang C, Xie W, Wu Y. Human genome-specific real-time PCR method for sensitive detection and reproducible quantitation of human cells in mice. *Stem Cell Rev*. 2012;8(4):1155-62.
39. Prigent J, Herrero A, Ambroise J, Smets F, Deblandre GA, Sokal EM. Human Progenitor Cell Quantification After Xenotransplantation in Rat and Mouse Models by a Sensitive qPCR Assay. *Cell Transplant*. 2015;24(8):1639-52.
40. Hazendonk H, van Moort I, Mathot RAA, Fijnvandraat K, Leebeek FWG, Collins PW, et al. Setting the stage for individualized therapy in hemophilia: What role can pharmacokinetics play? *Blood Rev*. 2018;32(4):265-71.
41. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet*. 2016;388(10040):187-97.
42. Rosendaal FR, Briet E. The increasing prevalence of haemophilia. *Thromb Haemost*. 1990;63(1):145.
43. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med*. 2001;344(23):1773-9.
44. Fischer K, Collins P, Bjorkman S, Blanchette V, Oh M, Fritsch S, et al. Trends in bleeding patterns during prophylaxis for severe haemophilia: observations from a series of prospective clinical trials. *Haemophilia*. 2011;17(3):433-8.
45. White GC, 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, 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(3):560.
46. Kruse-Jarres R, Kempton CL, Baudo F, Collins PW, Knoebl P, Leissinger CA, et al. Acquired hemophilia A: Updated review of evidence and treatment guidance. *Am J Hematol*. 2017;92(7):695-705.
47. Iorio A, Iserman E, Blanchette V, Dolan G, Escuriola Ettingshausen C, Hermans C, et al. Target plasma factor levels for personalized treatment in haemophilia: a Delphi consensus statement. *Haemophilia*. 2017;23(3):e170-e9.
48. Astermark J. Immune tolerance induction in patients with hemophilia A. *Thromb Res*. 2011;127 Suppl 1:S6-9.
49. Cannavo A, Valsecchi C, Garagiola I, Palla R, Mannucci PM, Rosendaal FR, et al. Nonneutralizing antibodies against factor VIII and risk of inhibitor development in severe hemophilia A. *Blood*. 2017;129(10):1245-50.
50. Ling G, Nathwani AC, Tuddenham EGD. Recent advances in developing specific therapies for haemophilia. *Br J Haematol*. 2018;181(2):161-72.
51. Evens H, Chuah MK, VandenDriessche T. Haemophilia gene therapy: From trailblazer to gamechanger. *Haemophilia*. 2018;24 Suppl 6:50-9.

52. Polderdijk SG, Adams TE, Ivanciu L, Camire RM, Baglin TP, Huntington JA. Design and characterization of an APC-specific serpin for the treatment of hemophilia. *Blood*. 2017;129(1):105-13.
53. Kolbe M, Dohle E, Katerla D, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(5):877-86.
54. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000;105(1):71-7.
55. Martin-Ramirez J, Hofman M, van den Biggelaar M, Hebbel RP, Voorberg J. Establishment of outgrowth endothelial cells from peripheral blood. *Nat Protoc*. 2012;7(9):1709-15.
56. Ormiston ML, Toshner MR, Kiskin FN, Huang CJ, Groves E, Morrell NW, et al. Generation and Culture of Blood Outgrowth Endothelial Cells from Human Peripheral Blood. *J Vis Exp*. 2015(106):e53384.
57. Hebbel RP. Blood endothelial cells: utility from ambiguity. *J Clin Invest*. 2017;127(5):1613-5.
58. Do H, Healey JF, Waller EK, Lollar P. Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Biol Chem*. 1999;274(28):19587-92.
59. Kumaran V, Benten D, Follenzi A, Joseph B, Sarkar R, Gupta S. Transplantation of endothelial cells corrects the phenotype in hemophilia A mice. *J Thromb Haemost*. 2005;3(9):2022-31.
60. Zanolini D, Merlin S, Feola M, Ranaldo G, Amoruso A, Gaidano G, et al. Extrahepatic sources of factor VIII potentially contribute to the coagulation cascade correcting the bleeding phenotype of mice with hemophilia A. *Haematologica*. 2015;100(7):881-92.
61. Matsui H. Endothelial progenitor cell-based therapy for hemophilia A. *Int J Hematol*. 2012;95(2):119-24.
62. Ozelo MC, Vidal B, Brown C, Notley C, Hegadorn C, Webster S, et al. Omental implantation of BOECs in hemophilia dogs results in circulating FVIII antigen and a complex immune response. *Blood*. 2014;123(26):4045-53.
63. Council of Europe (2017). Raw materials of biological origin for the production of cell-based and gene therapy medicinal products. *European Pharmacopoeia*, 9th Ed. Council of Europe, Strasbourg, 01/2017:50212.
64. Stühler A, Blümel J (2015). Spezifische Aspekte zur Virussicherheit von Produktionshilfsstoffen für somatische Zelltherapie-Arzneimittel. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 58:1233-1238.
65. Blümel J, Stühler A (2009). Wichtige Aspekte der Virussicherheit bei Neuartigen Therapien. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 53:38-44.
66. Utta Schurig, Jan-Oliver Karo, U. Sicker, E. Spindler-Raffel, L. Häckel, I. Spreitzer, et al. Aktuelles Konzept zur mikrobiologischen Sicherheit von zellbasierten Arzneimitteln. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 58:1225-1232.
67. Council of Europe (2008). Mycoplasmas. *European Pharmacopoeia*, 9th Ed. Council of Europe, Strasbourg, 01/2008:20607 corrected 6.1.
68. Council of Europe (2010). Gene transfer medicinal products for human use. *European Pharmacopoeia*, 9th Ed. Council of Europe, Strasbourg, 01/2010:51400.
69. Beniumovich MS. [Determination of the time for population doubling in monolayer cultures]. *Biull Eksp Biol Med*. 1966;62(7):120-3.
70. Daukste L, Basse B, Baguley BC, Wall DJ. Mathematical determination of cell population doubling times for multiple cell lines. *Bull Math Biol*. 2012;74(10):2510-34.
71. Council of Europe (2018). Bacterial endotoxins. *European Pharmacopoeia*, 9th Ed. Council of Europe, Strasbourg, 01/2018:20614
72. Eurofins Genomics LLC. Purification and Yield 2017 [Available from: <https://www.eurofinsgenomics.com/en/products/dnarna-synthesis/purification-and-yields/>: Accessed 26 September 2019.
73. Gentric G, Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol*. 2014;184(2):322-31.
74. Green MR, Sambrook J. Optimizing Primer and Probe Concentrations for Use in Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(10):pdb prot095018.

75. Roche Diagnostics. LightCycler® 480 Probes Master Manual, Version 11. 2017.
76. Roche Diagnostics. LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual, Software Version 1.5. 2012.
77. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S) (2018). Good practices for data management and integrity in regulated GMP/GDP environments PI 041-1 (Draft 3). <https://www.picscheme.org/en/publications>.
78. Food and Drug Administration (2003). Guidance for Industry Part 11, Electronic Records; Electronic Signatures — Scope and Application (21 CFR Part 11). <https://www.fda.gov/media/75414/download>.
79. Economopoulos V, Noad JC, Krishnamoorthy S, Rutt BK, Foster PJ. Comparing the MRI appearance of the lymph nodes and spleen in wild-type and immuno-deficient mouse strains. *PLoS One*. 2011;6(11):e27508.
80. Babad J, Mukherjee G, Follenzi A, Ali R, Roep BO, Shultz LD, et al. Generation of beta cell-specific human cytotoxic T cells by lentiviral transduction and their survival in immunodeficient human leucocyte antigen-transgenic mice. *Clin Exp Immunol*. 2015;179(3):398-413.
81. Qiagen. DNeasy Blood & Tissue Handbook. 2006.
82. Kim TK. T test as a parametric statistic. *Korean J Anesthesiol*. 2015;68(6):540-6.
83. De Muth JE. Overview of biostatistics used in clinical research. *Am J Health Syst Pharm*. 2009;66(1):70-81.
84. Burkner PC, Doebler P, Holling H. Optimal design of the Wilcoxon-Mann-Whitney-test. *Biom J*. 2017;59(1):25-40.
85. Ialongo C. Understanding the effect size and its measures. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016;26(2):150-63.
86. Bittorf P, Bergmann T, Merlin S, Olgasi C, Pullig O, Sanzenbacher R, et al. Regulatory-Compliant Validation of a Highly Sensitive qPCR for Biodistribution Assessment of Hemophilia A Patient Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;18:176-88.
87. He XJ, Zhang Q, Liu YJ, Pan XY. Increasing specificity of real time PCR to detect microRNA through primer design and annealing temperature increase. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2009;41(6):691-8.
88. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2016). Leitlinien zur Einzellabor-Validierung qualitativer real-time PCR Methoden. https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/Leitlinien%20zur%20Einzellabor%20Validierung.html.
89. Thompson RE, Duncan G, McCord BR. An investigation of PCR inhibition using Plexor((R)) - based quantitative PCR and short tandem repeat amplification. *J Forensic Sci*. 2014;59(6):1517-29.
90. van Beem RT, Verloop RE, Kleijer M, Noort WA, Loof N, Koolwijk P, et al. Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro. *J Thromb Haemost*. 2009;7(1):217-26.
91. Liu S, Hou X, Chen L, Hu H, Sun Q, Zhao F, et al. Enhancing amplification of late-outgrowth endothelial cells by bilobalide. *J Cell Mol Med*. 2018;22(7):3340-52.
92. Schurig U, Karo JO, Sicker U, Spindler-Raffel E, Hackel L, Spreitzer I, et al. [Current concept for the microbiological safety of cell-based medicinal products]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2015;58(11-12):1225-32.
93. Stuhler A, Blumel J. [Specific aspects for virus safety of raw materials for cellular-based medicinal products]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2015;58(11-12):1233-8.
94. European Medicines Agency (2005). ICH Topic Q 5 E Comparability of Biotechnological/Biological Products Note for Guidance on Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process (CPMP/ICH/5721/03). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-e-comparability-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf.
95. Wolkers WF, Oldenhof H. Principles Underlying Cryopreservation and Freeze-Drying of Cells and Tissues. *Methods Mol Biol*. 2021;2180:3-25.

96. Wang CH, Huang PH, Chen JW, Lin SJ, Lee MF, Yang NI, et al. Clinical Application of Endothelial Progenitor Cell: Are We Ready? *Acta Cardiol Sin.* 2013;29(6):479-87.
97. Huizer K, Mustafa DAM, Spelt JC, Kros JM, Sacchetti A. Improving the characterization of endothelial progenitor cell subsets by an optimized FACS protocol. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184895.
98. Feng N, Huang X, Jia Y. Mycoplasma contamination affects cell characteristics and decreases the sensitivity of BV2 microglia to LPS stimulation. *Cytotechnology.* 2019;71(2):623-34.
99. Uphoff CC, Drexler HG. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2011;731:93-103.
100. Council of Europe (2017). Microbiological examination of cell-based preparations. *European Pharmacopoeia*, 9th Ed. Council of Europe, Strasbourg, 07/2017:20627
101. European Medicines Agency (2019). Questions and answers Comparability considerations for Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) (EMA/CAT/499821/2019). https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/questions-answers-comparability-considerations-advanced-therapy-medicinal-products-atmp_en.pdf. Accessed 20 January 2020.
102. Wei J, Jarmy G, Genuneit J, Debatin KM, Beltinger C. Human blood late outgrowth endothelial cells for gene therapy of cancer: determinants of efficacy. *Gene Ther.* 2007;14(4):344-56.
103. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7.
104. Auricchio B, Anniballi F, Fiore A, Skiby JE, De Medici D. Evaluation of DNA extraction methods suitable for PCR-based detection and genotyping of *Clostridium botulinum*. *Biosecur Bioterror.* 2013;11 Suppl 1:S200-6.
105. Evans JS, Lopez-Legentil S, Erwin PM. Comparing Two Common DNA Extraction Kits for the Characterization of Symbiotic Microbial Communities from Ascidian Tissue. *Microbes Environ.* 2018;33(4):435-9.
106. Dilhari A, Sampath A, Gunasekara C, Fernando N, Weerasekara D, Sissons C, et al. Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method. *AMB Express.* 2017;7(1):179.
107. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci.* 2010;55(1):25-33.
108. Shao W, Khin S, Kopp WC. Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreserv Biobank.* 2012;10(1):4-11.
109. Somani A, Nguyen J, Milbauer LC, Solovey A, Sajja S, Hebbel RP. The establishment of murine blood outgrowth endothelial cells and observations relevant to gene therapy. *Transl Res.* 2007;150(1):30-9.
110. Yoshino H, Ueda T, Kawahata M, Kobayashi K, Ebihara Y, Manabe A, et al. Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26(11):1211-6.
111. Michaelis UR. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(21):4131-48.
112. Geng J, Wang L, Qu M, Song Y, Lin X, Chen Y, et al. Endothelial progenitor cells transplantation attenuated blood-brain barrier damage after ischemia in diabetic mice via HIF-1alpha. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):163.
113. Ellison SM, Liao A, Wood S, Taylor J, Youshani AS, Rowlston S, et al. Pre-clinical Safety and Efficacy of Lentiviral Vector-Mediated Ex Vivo Stem Cell Gene Therapy for the Treatment of Mucopolysaccharidosis IIIA. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;13:399-413.
114. Appelt-Menzel A, Cubukova A, Gunther K, Edenhofer F, Piontek J, Krause G, et al. Establishment of a Human Blood-Brain Barrier Co-culture Model Mimicking the Neurovascular Unit Using Induced Pluri- and Multipotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2017;8(4):894-906.
115. European Medicines Agency (2010). Guideline on repeated dose toxicity (CPMP/SWP/1042/99 Rev 1 Corr*): https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-repeated-dose-toxicity-revision-1_en.pdf. Accessed 04 November 2019.

7. Anhang

Dokumententemplate „Risk Assessment, raw materials of biological origin_Thrombozytenkonzentrat“

Risk Assessment, raw materials of biological origin			
Raw material	Platelet Lysate=PL Sera and serum replacements	Manufacturer	
Source	Human, allogenic	Dosage form	Frozen solution
Criticality	High	Application	Cell growth medium

Requirements	Risk assessment			Risk mitigation		
	Current Status according to manufacturer	Risk identification considering the current status	Risk evaluation	Established action	Effect/Failure	New action
Production raw material						
Production within a suitable quality management system, compliant to GMP requirements, certificates available						
Suitable production facilities						
Manufacturing process steps described, suitable in-process controls						
Minimized risk for adventitious impurities						
Application of aseptic conditions						

Document	Risk Assessment, raw materials of biological origin	Version	1.0	Page	1 of 6
----------	---	---------	-----	------	--------

Requirements	Risk assessment			Risk mitigation		
	Current Status according to manufacturer	Risk identification considering the current status	Risk evaluation	Established action	Effect/Failure	New action
Application of biological substances, antibiotics or stabilizers within production of raw material, justification available						
Shelf life and storage conditions defined						
Label contains expiry date, code and conditions for storage and use						
Quality raw material						
Method for testing quality of raw materials						
Appropriate method confirming identity, relevant specification defined						
Appropriate method measuring content, relevant specification defined						

Requirements	Risk assessment			Risk mitigation		
	Current Status according to manufacturer	Risk identification considering the current status	Risk evaluation	Established action	Effect/Failure	New action
Appropriate method measuring biological activity, relevant specification defined						
Defined additional tests confirming quality of raw material, relevant specifications defined, of importance: sterility, endotoxin and mycoplasma						
Applied methods are qualified, if applicable performed according to EP or USP						
Specific requirements due to donor selection, quality control of PL and viral safety						
Carefully evaluated donors, Verification of batch to batch consistency, Donor number						

Requirements	Risk assessment			Risk mitigation		
	Current Status according to manufacturer	Risk identification considering the current status	Risk evaluation	Established action	Effect/Failure	New action
Viral risk assessment according to EP 5.1.7 complete						
Minimized risk of transmitting infectious agents from pooled sera/sera replacements or methods for inactivation/removal are applied						
Transmissible spongiform encephalopathies risk assessment according to EP 5.2.8 complete (particularly "TSE-relevant animal species")						
Specific tests for viral contaminants and infectious agents based on initial risk assessment and considering EP 0853 monograph "Human plasma for fractionation"						

Requirements	Risk assessment			Risk mitigation		
	Current Status according to manufacturer	Risk identification considering the current status	Risk evaluation	Established action	Effect/Failure	New action
Tests and test system comply with EU/national legislation, CE-Certified Systems						
Application within drug product manufacturing and final product						
Specifications agreed with supplier and supplier agreement available						
Traceability						
Usage of raw material						
Control or removal of raw material from final product within manufacturing process						
Exposure of the patient to residual amounts of the raw material						
Potential harmful effects due to exposure						

Requirements	Risk assessment			Risk mitigation		
	Current Status according to manufacturer	Risk identification considering the current status	Risk evaluation	Established action	Effect/Failure	New action
Available for clinical applications						
Evaluation of the clinical benefit and risk						

Inspection performed by		Date / Signature	
Released by LQK		Date / Signature	
Release QP		Date / Signature	

Prüfung auf Normalverteilung

Test: Shapiro-Wilk Test und Normal Q-Q Plot of Concentration

Validierungsexperimente (VE) 1-4: Proben Ref10E6 und Ref mgDNA:

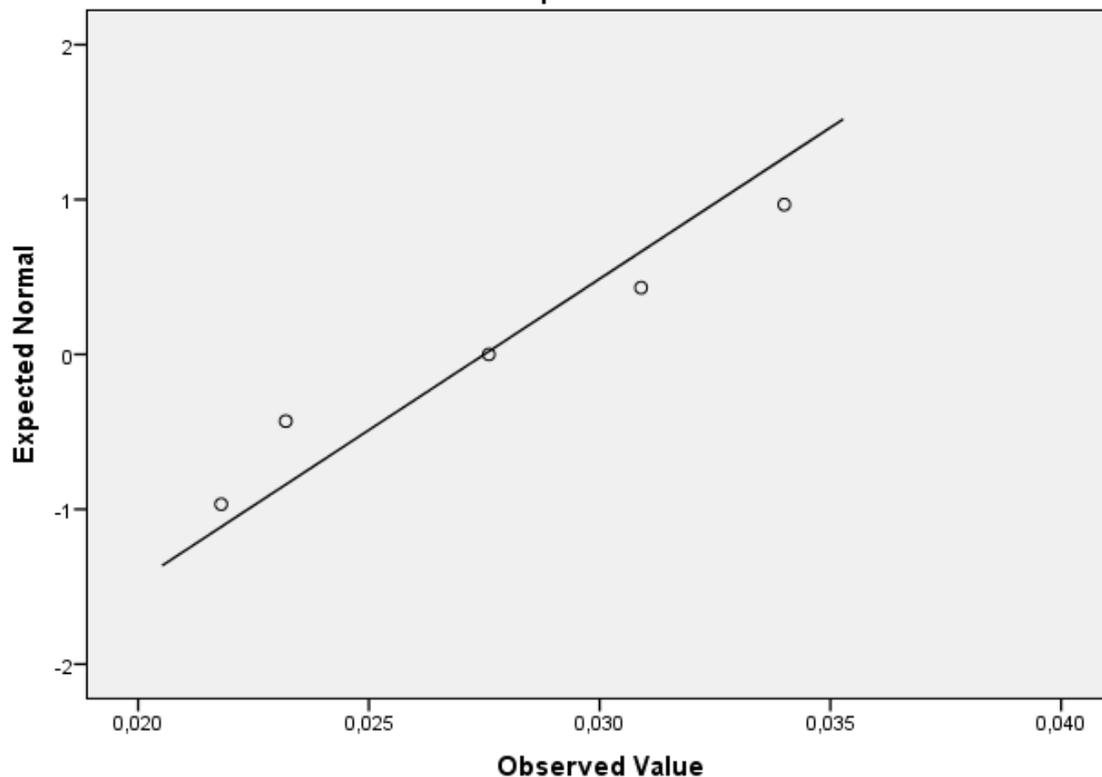
Tests of Normality							
	Comparator	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Concentration	1 Ref10E6 VE1	,200	5	,200*	,948	5	,722
	2 mgDNA VE1	,207	4	.	,978	4	,891
	3 Ref10E6 VE2	,358	5	,035	,760	5	,037
	4 mgDNA VE2	,339	4	.	,860	4	,260
	5 Ref10E6 VE3	,231	5	,200*	,930	5	,599
	6 mgDNA VE3	,260	4	.	,913	4	,499
	7 Ref10E6 VE4	,221	5	,200*	,906	5	,446
	8 mgDNA VE4	,223	4	.	,932	4	,607
	9 mean Ref10E6	,196	4	.	,986	4	,933
	10 mean mgDNA	,239	4	.	,940	4	,652

*. This is a lower bound of the true significance.

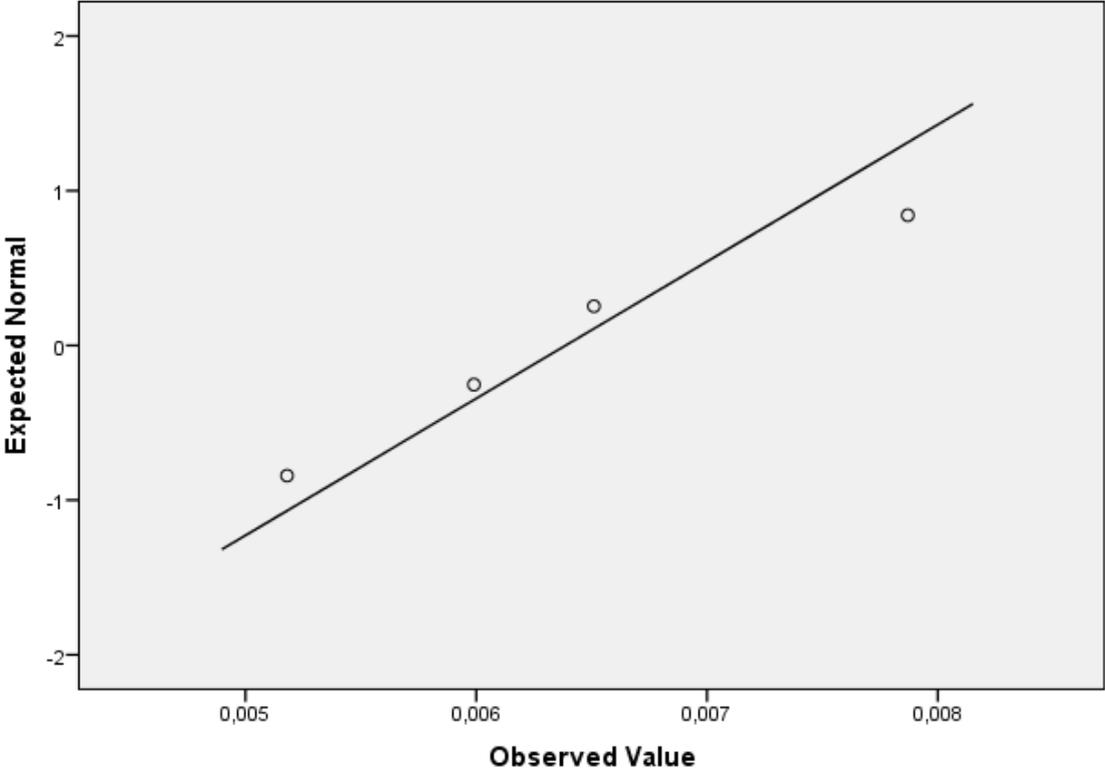
a. Lilliefors Significance Correction

Normal Q-Q Plot of Concentration

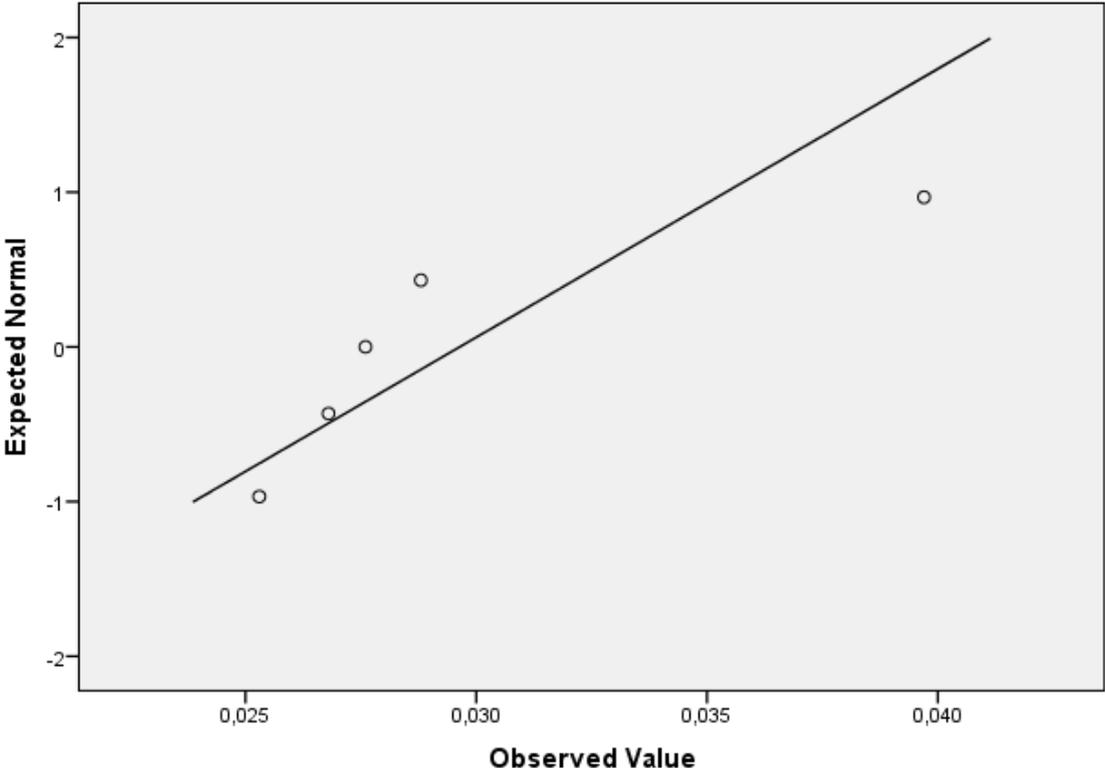
for Comparator= 1



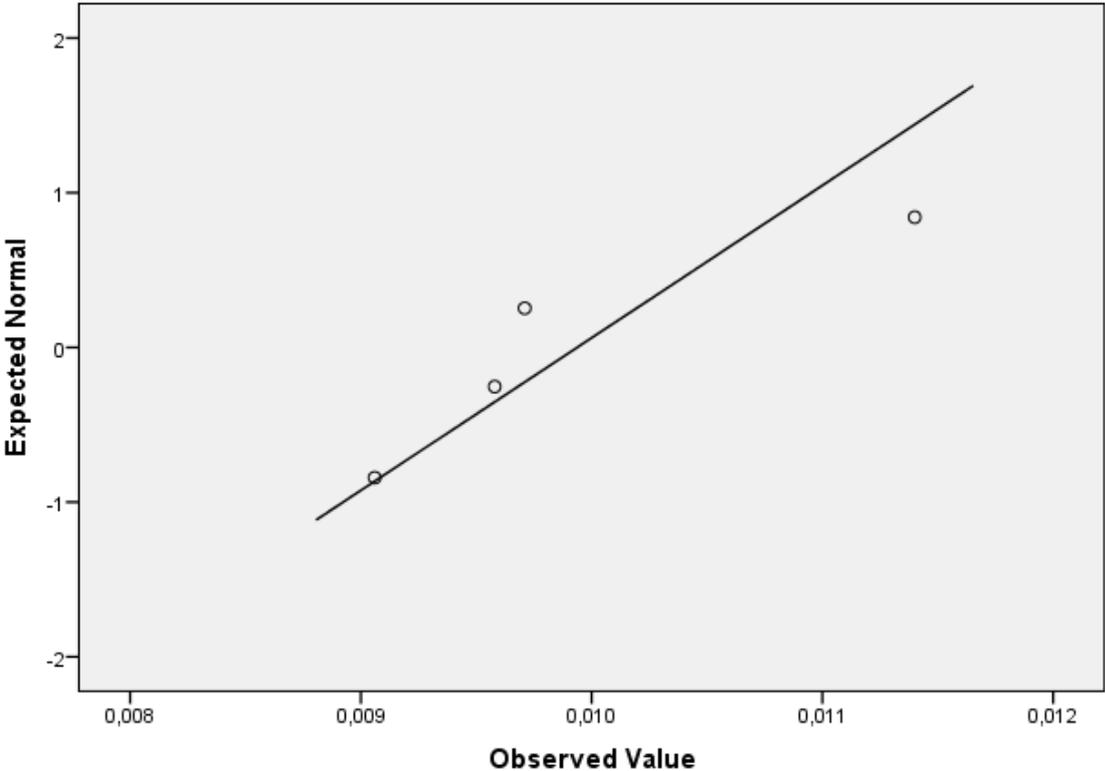
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Comparator= 2



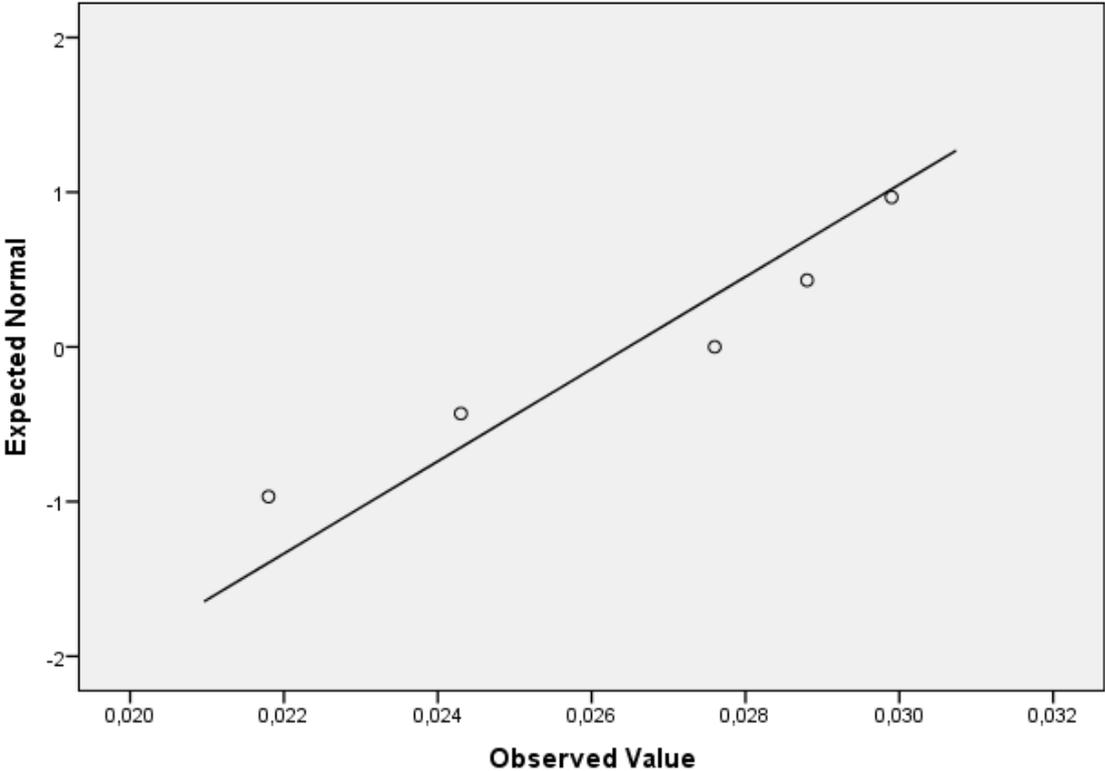
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Comparator= 3



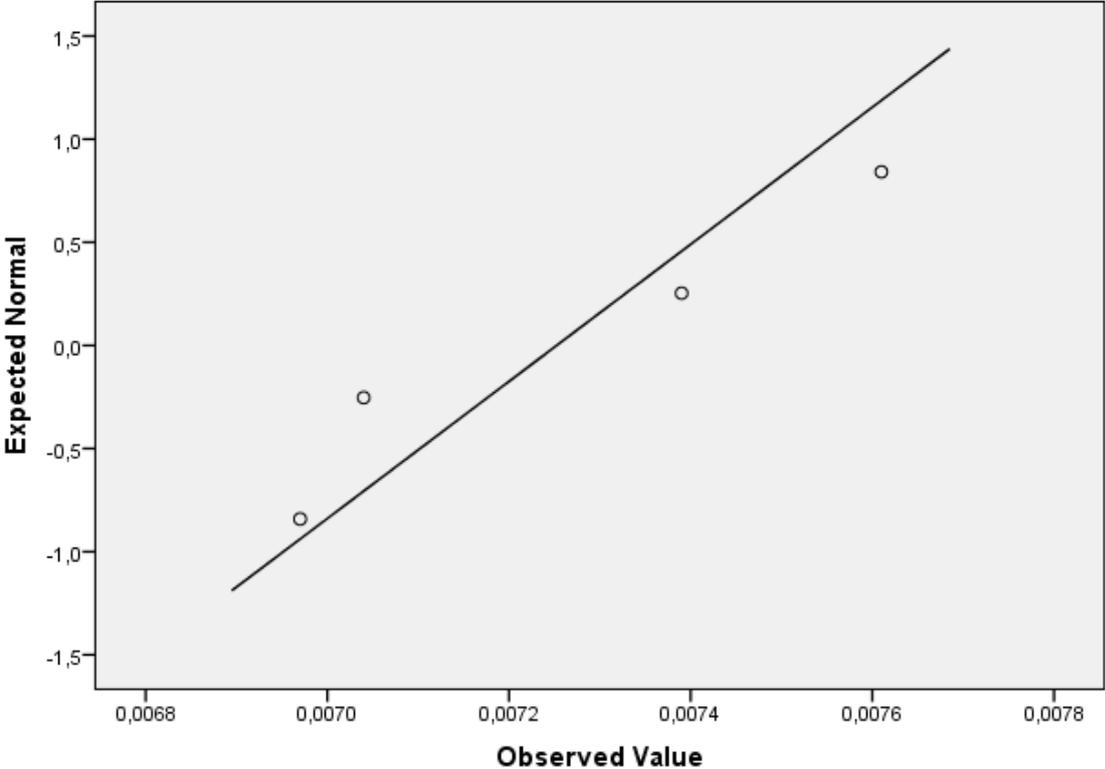
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Comparator= 4



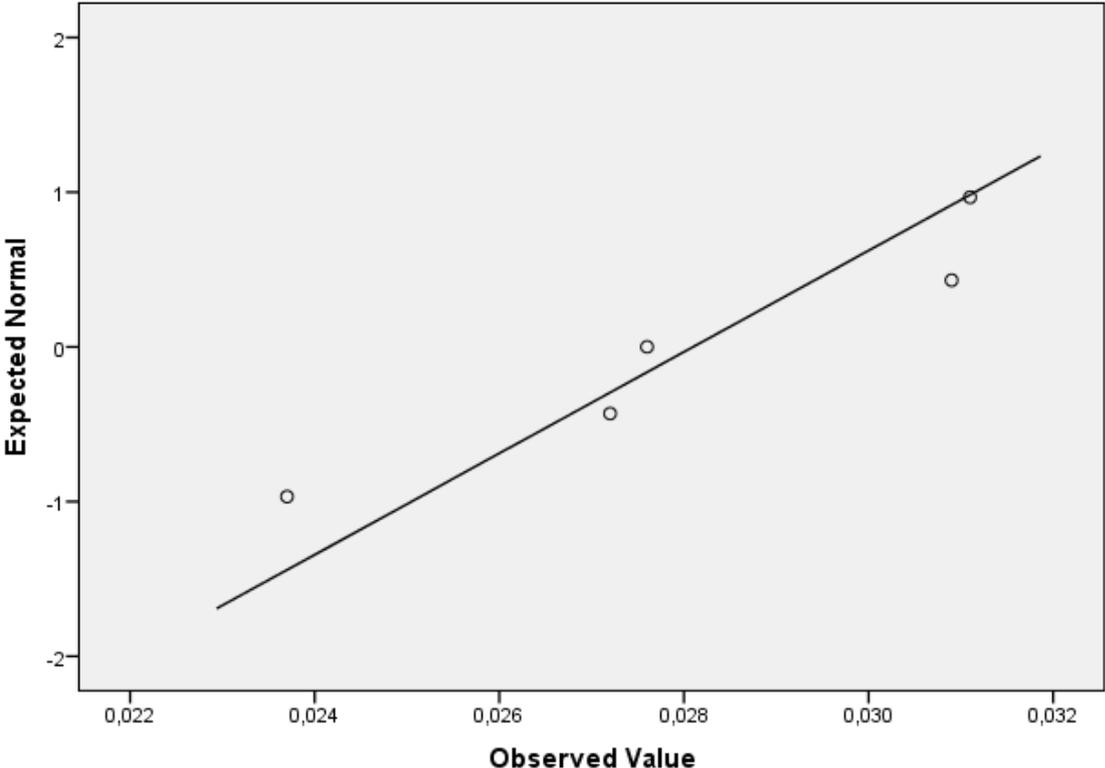
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Comparator= 5

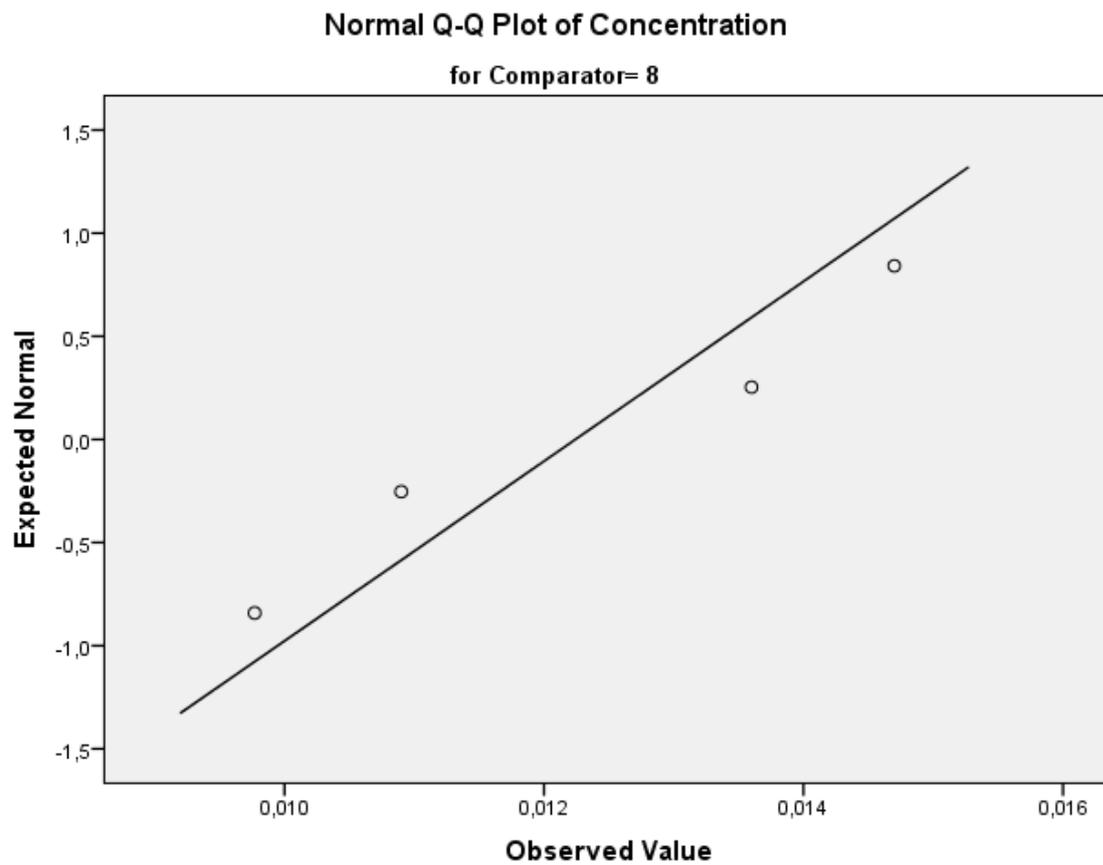


Normal Q-Q Plot of Concentration
for Comparator= 6



Normal Q-Q Plot of Concentration
for Comparator= 7





Prüfung auf Varianzhomogenität

Test: Levene-Test

Validierungsexperimente (VE) 1-4: Proben Ref10E6 und Ref mgDNA:

Test of Homogeneity of Variances

Concentration

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,711	7	28	,028

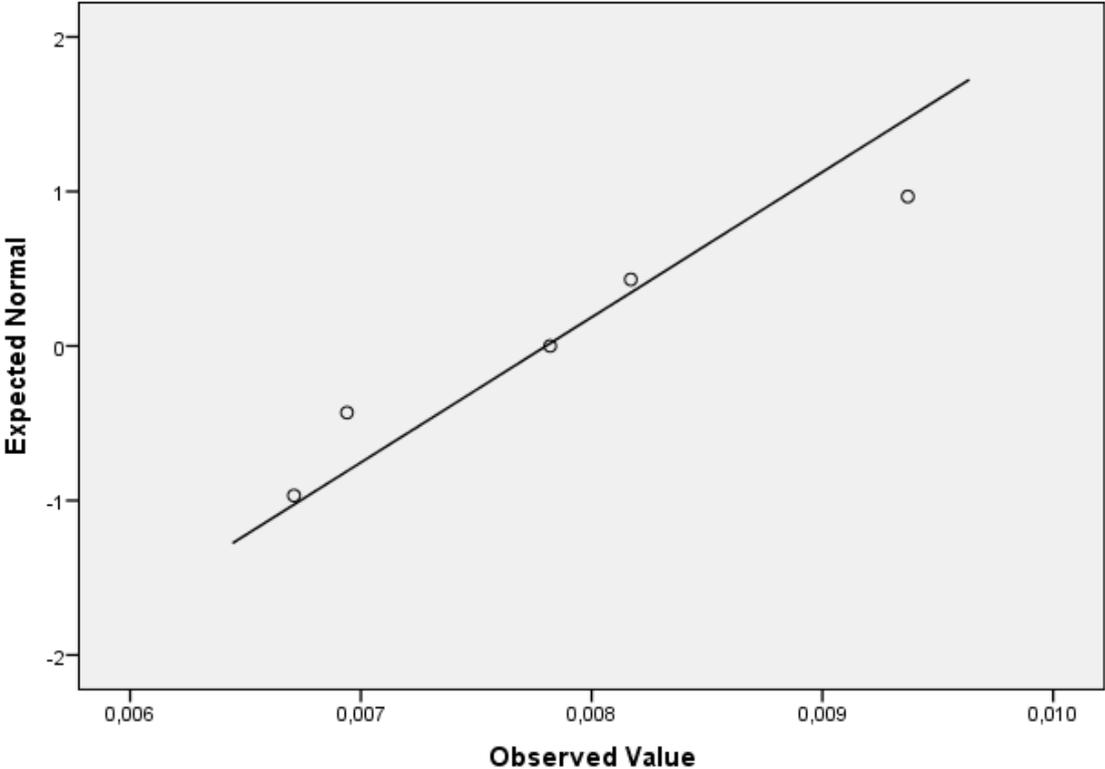
Prüfung auf Normalverteilung**Test:** Shapiro-Wilk Test und Normal Q-Q Plot of Concentration**Studiengruppen:** BD Experiment 24h (0-8) und BD Experiment 7d (10-18):

Tests of Normality							
	Mouseorgan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Concentration	0 mgDNA	,191	5	,200 [*]	,941	5	,674
24h	1 Bone	,455	5	,001	,590	5	,000
	2 Brain	,209	5	,200 [*]	,968	5	,859
	3 Heart	,292	5	,188	,799	5	,079
	4 Kidney	,387	5	,014	,667	5	,004
	5 Liver	,236	5	,200 [*]	,841	5	,167
	6 Lung	,360	5	,033	,802	5	,085
	7 Spleen	,347	5	,049	,788	5	,064
	8 Gonads	,308	3	.	,902	3	,392
7d	10 mgDNA	,214	5	,200 [*]	,928	5	,581
	11 Bone	,338	5	,063	,784	5	,060
	12 Brain	,375	5	,021	,695	5	,008
	13 Heart	,291	4	.	,864	4	,273
	14 Kidney	,209	5	,200 [*]	,900	5	,409
	15 Liver	,230	5	,200 [*]	,898	5	,401
	16 Lung	,349	4	.	,855	4	,244
	17 Spleen	,252	4	.	,863	4	,271
	18 Gonads	,377	5	,019	,724	5	,017

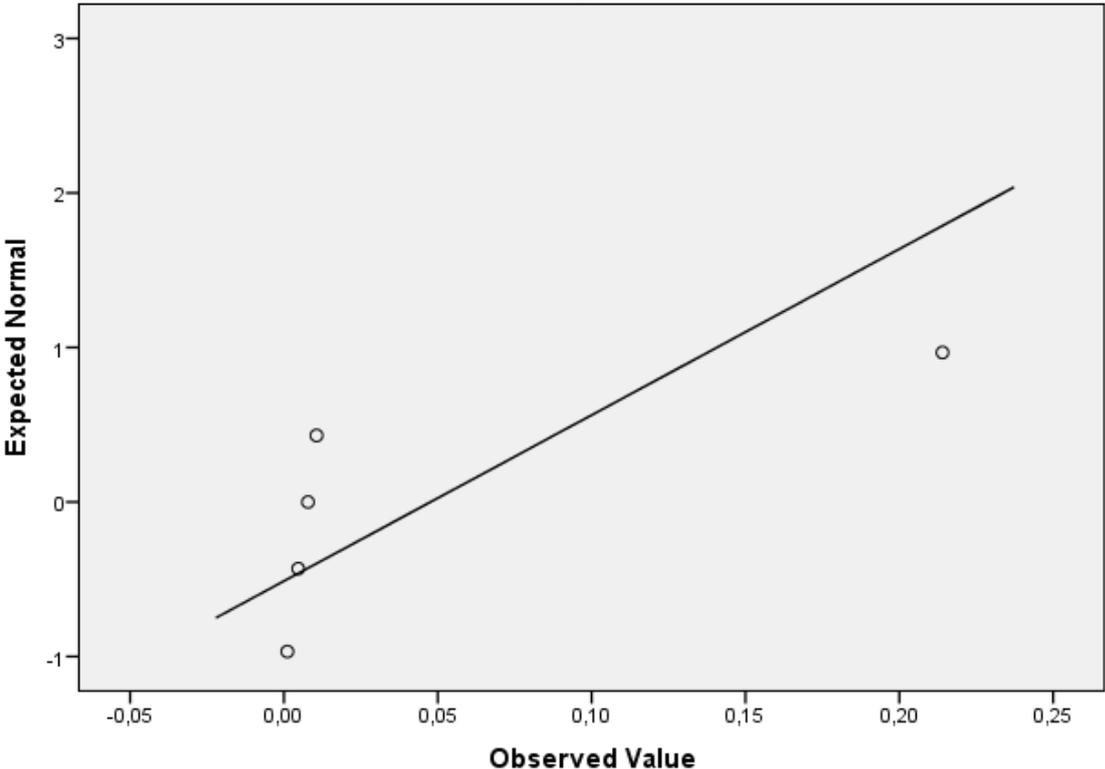
*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

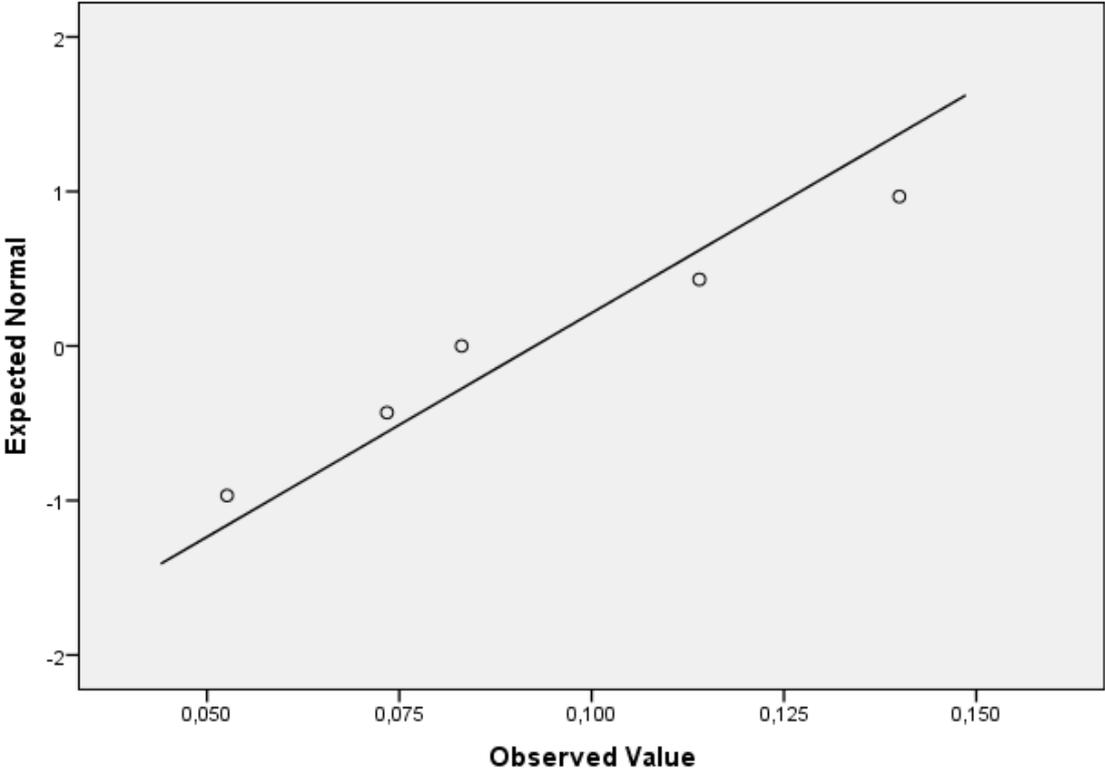
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 0



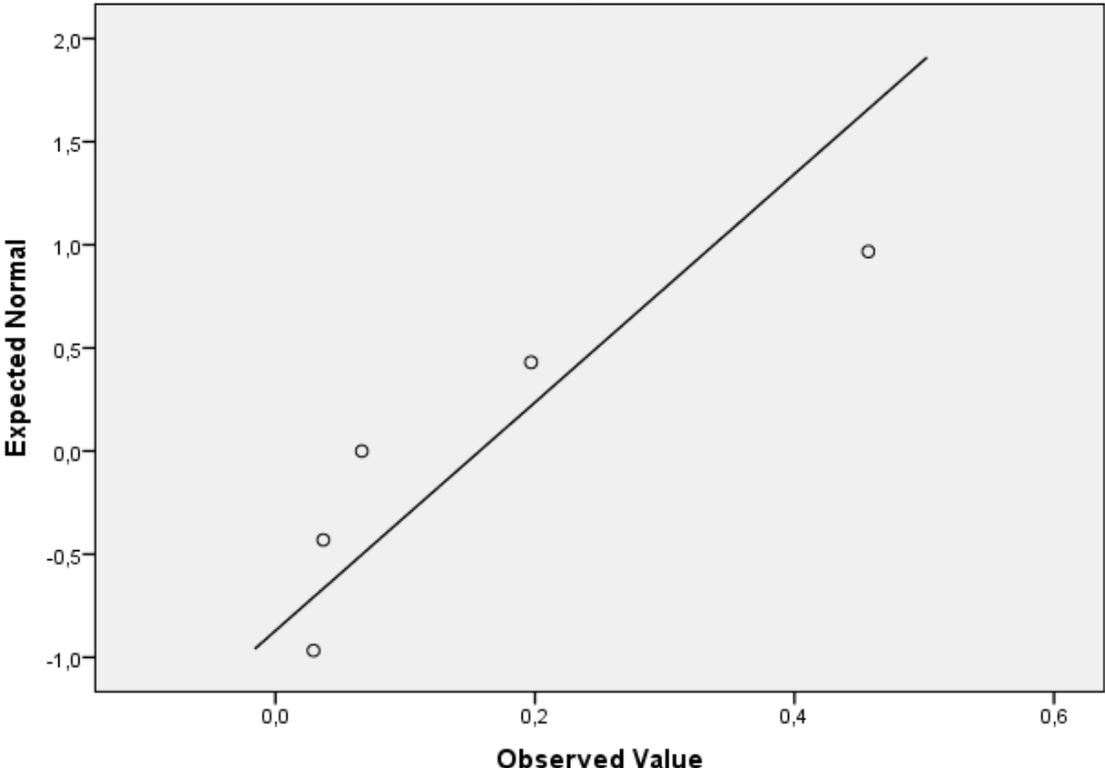
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 1



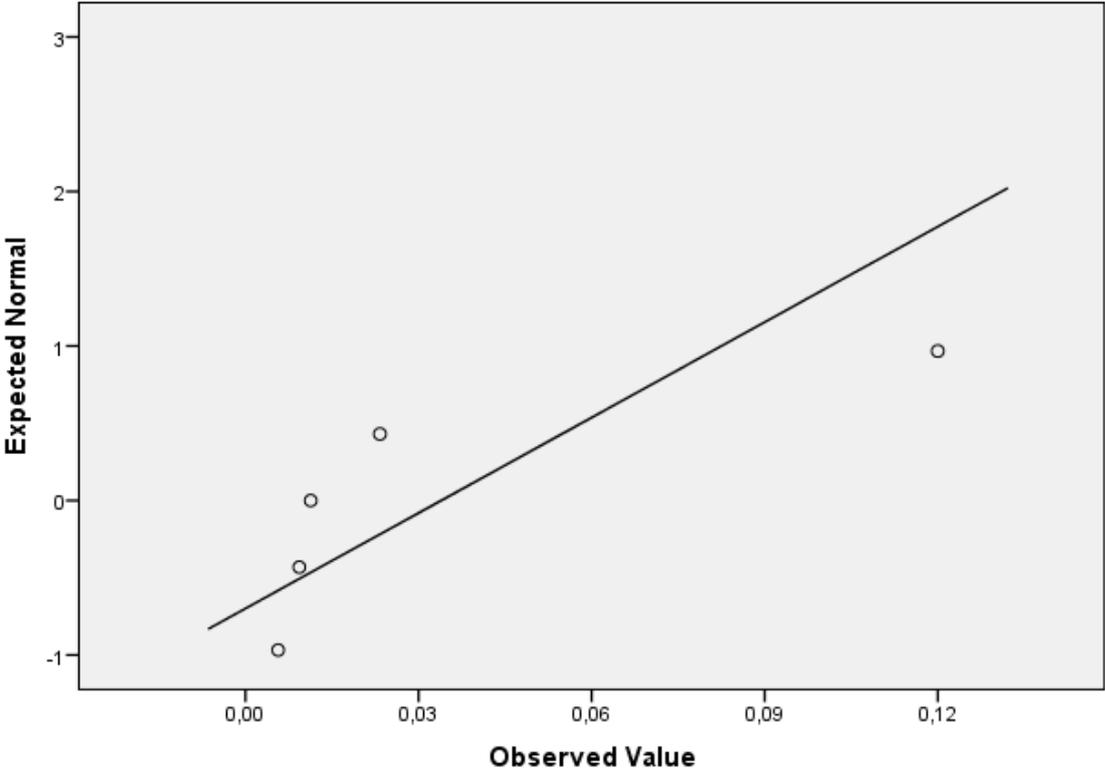
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 2



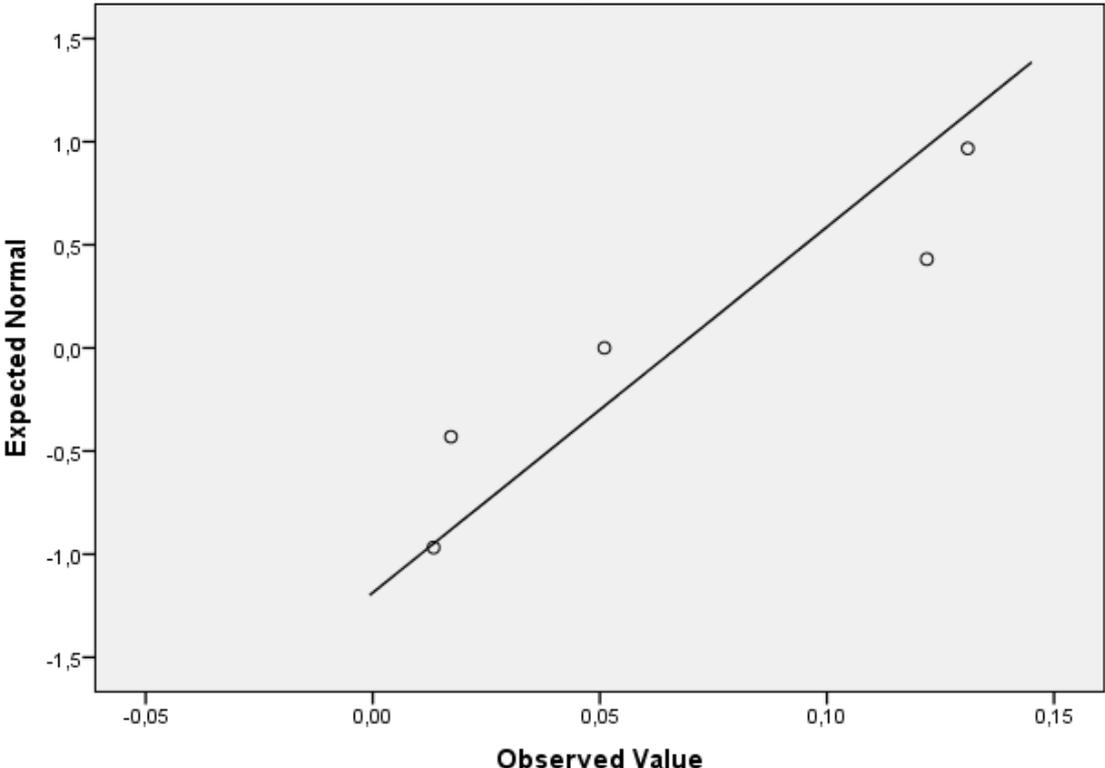
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 3



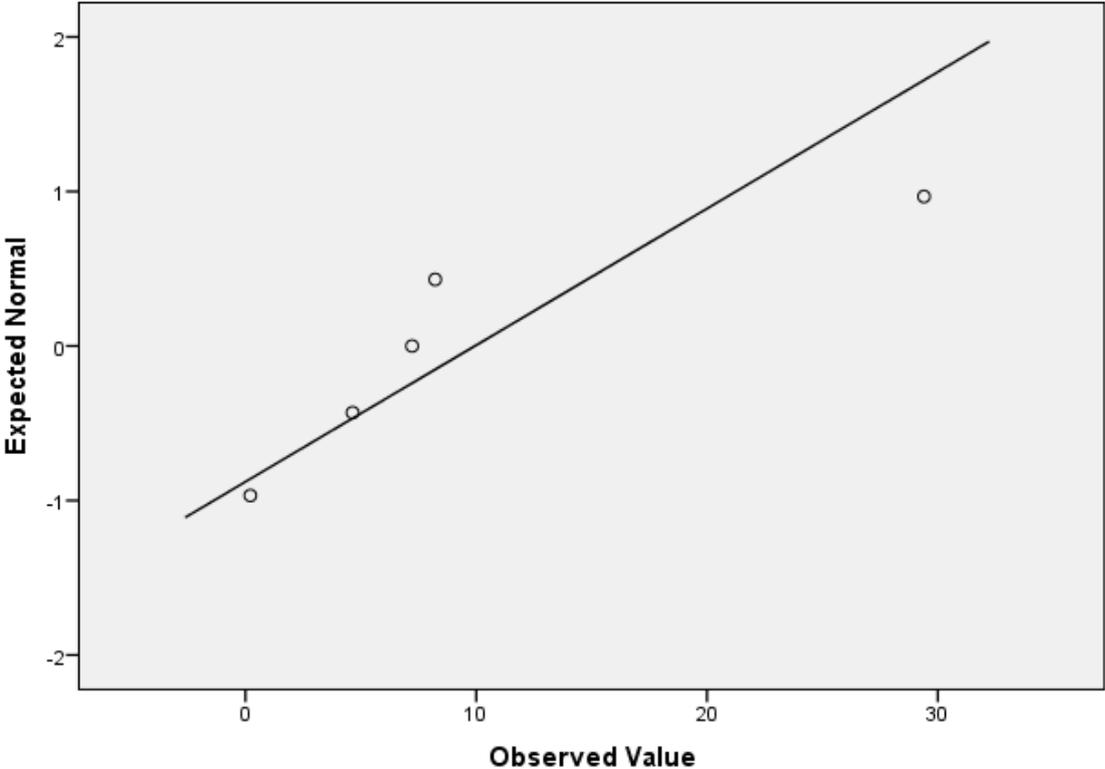
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 4



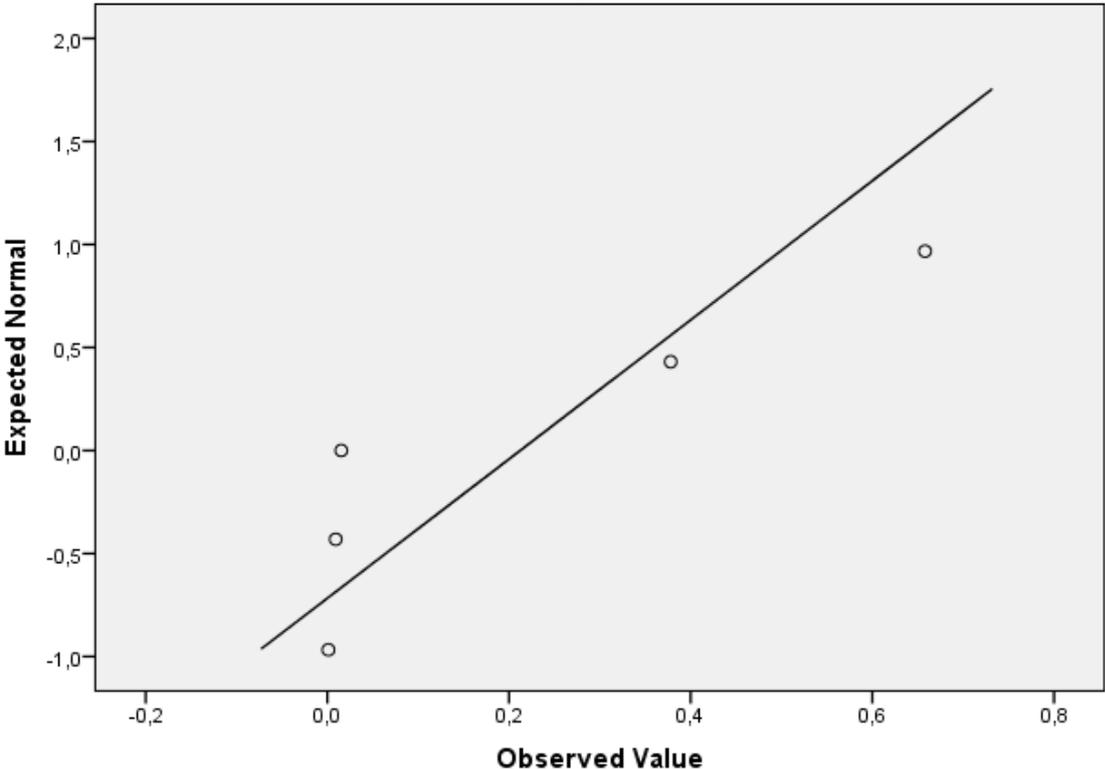
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 5



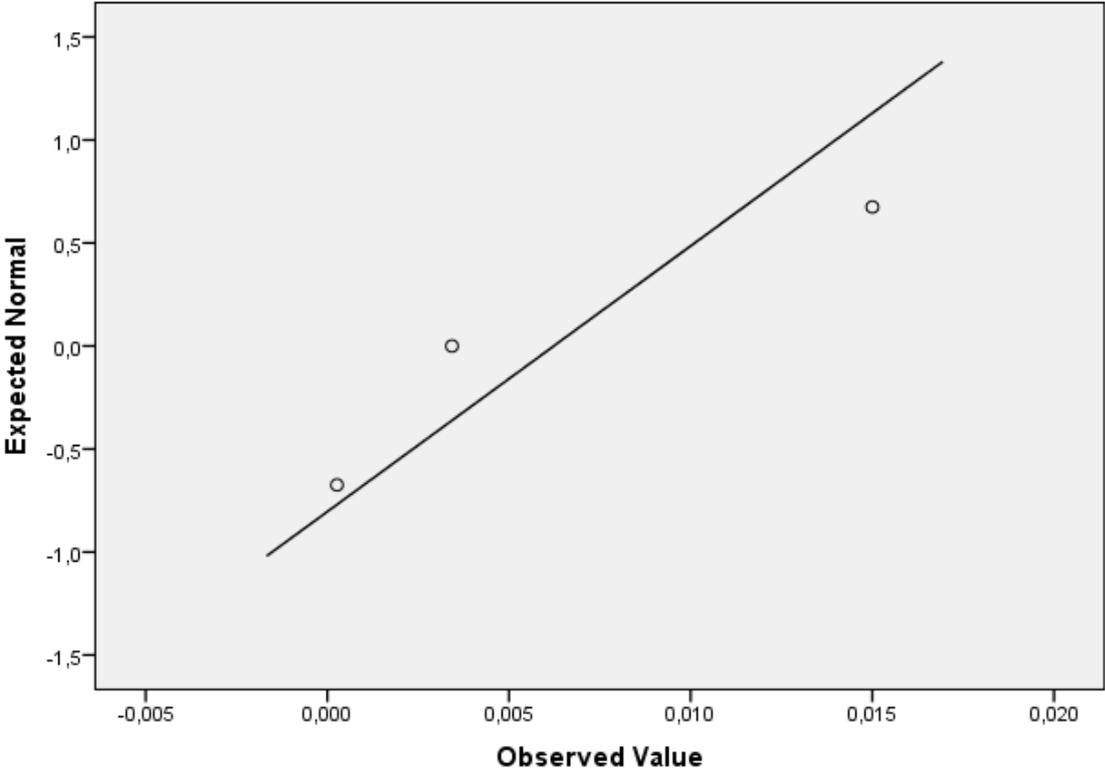
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 6



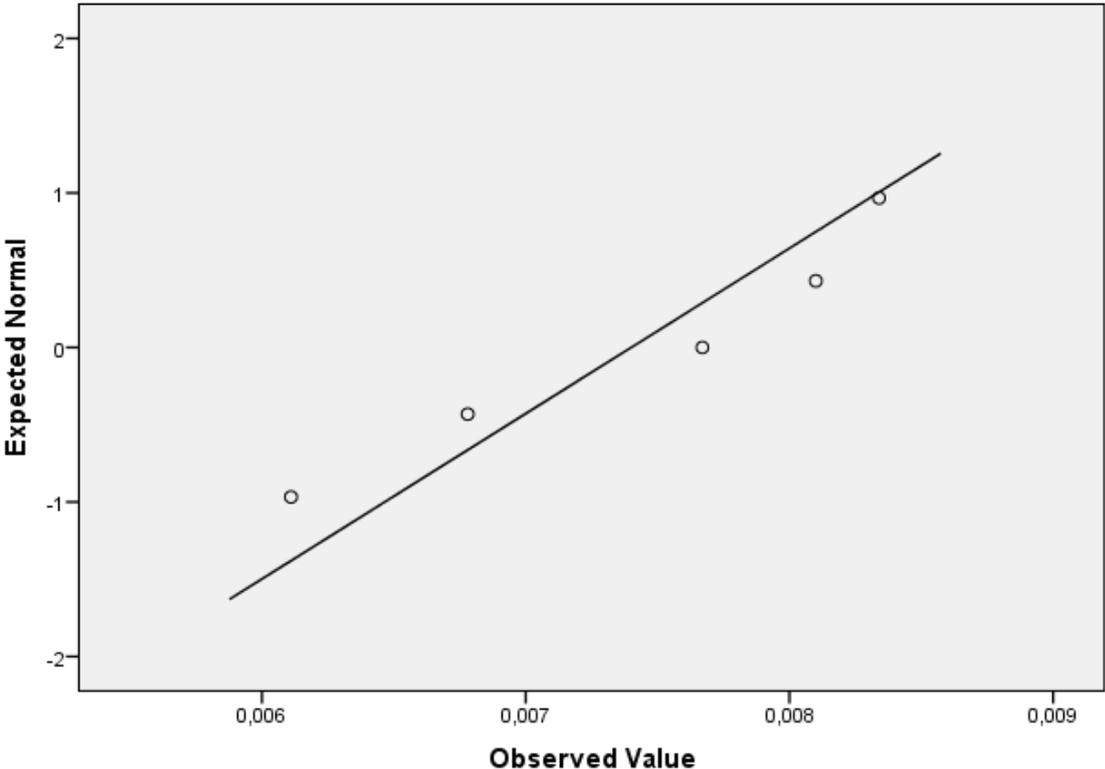
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 7



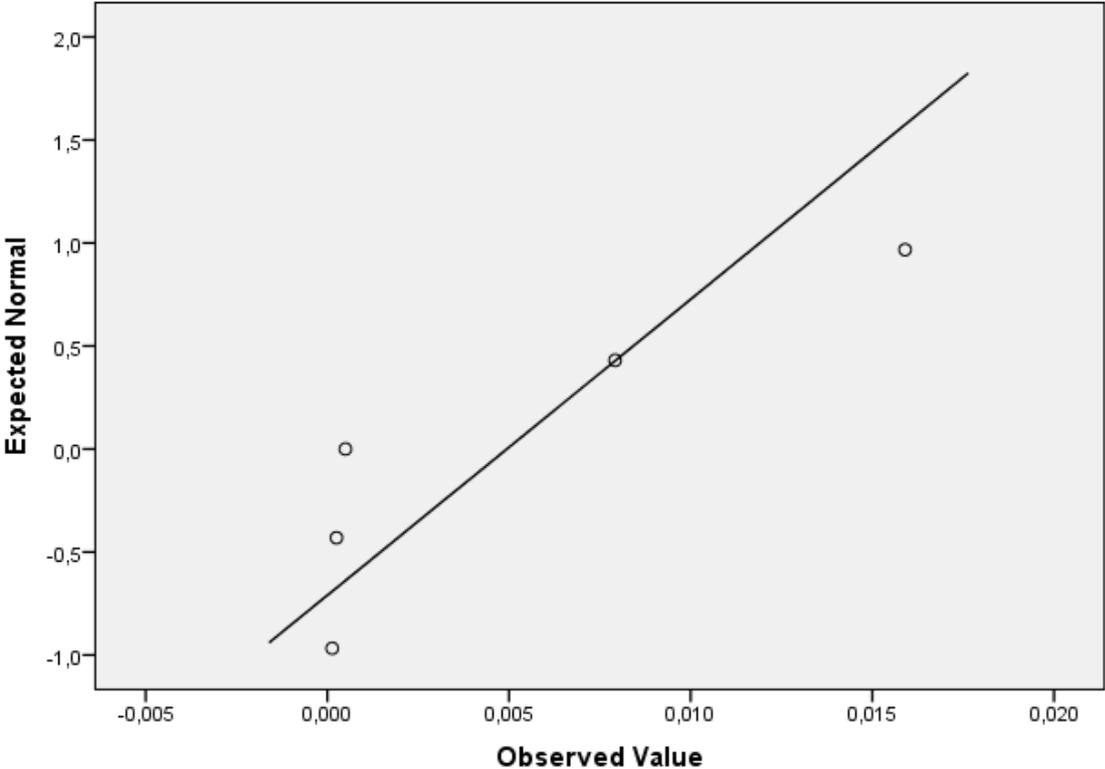
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 8



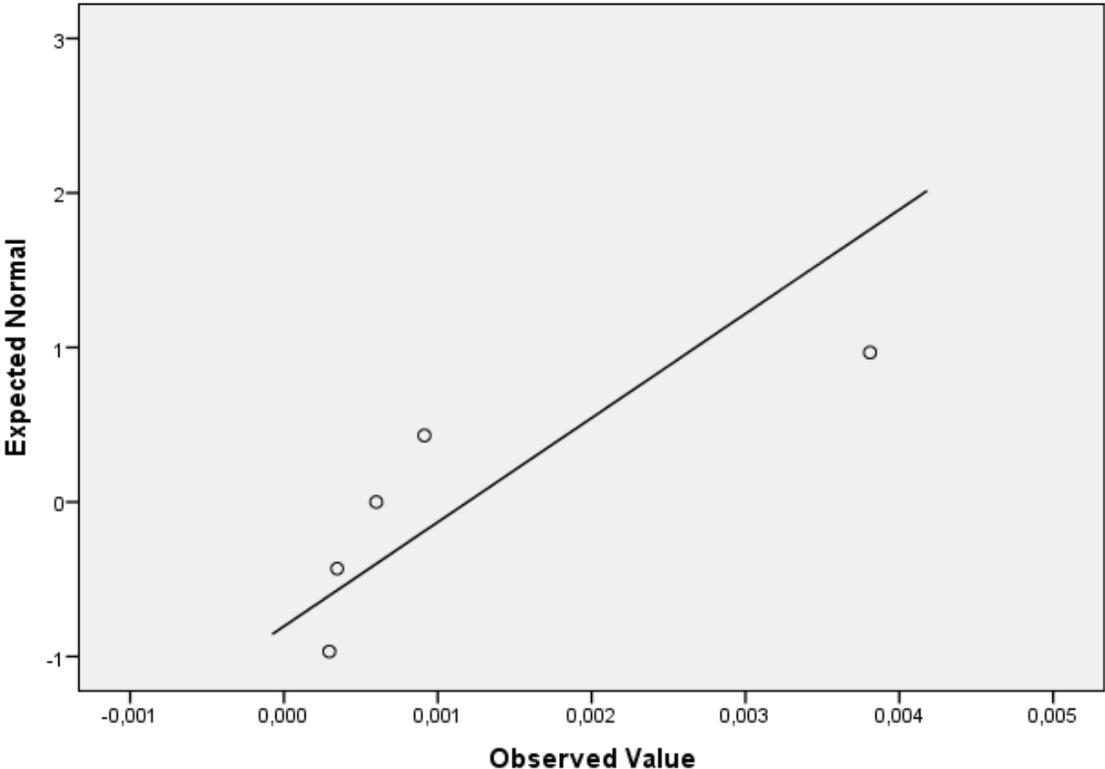
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 10



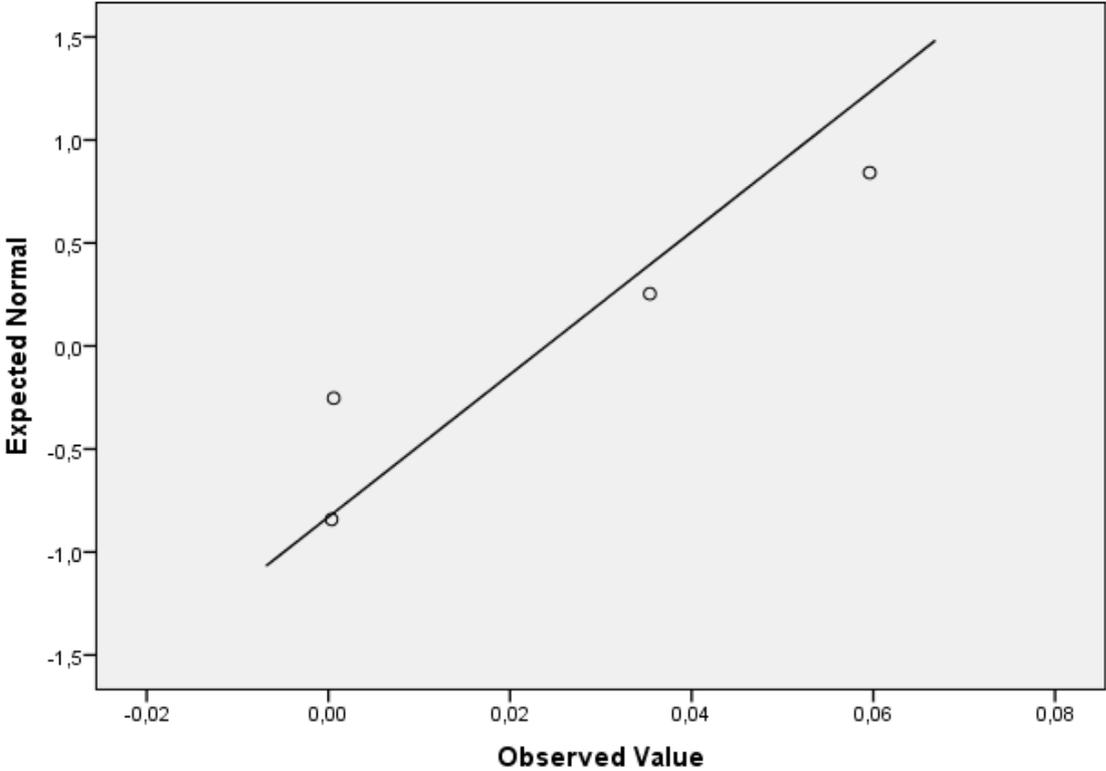
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 11



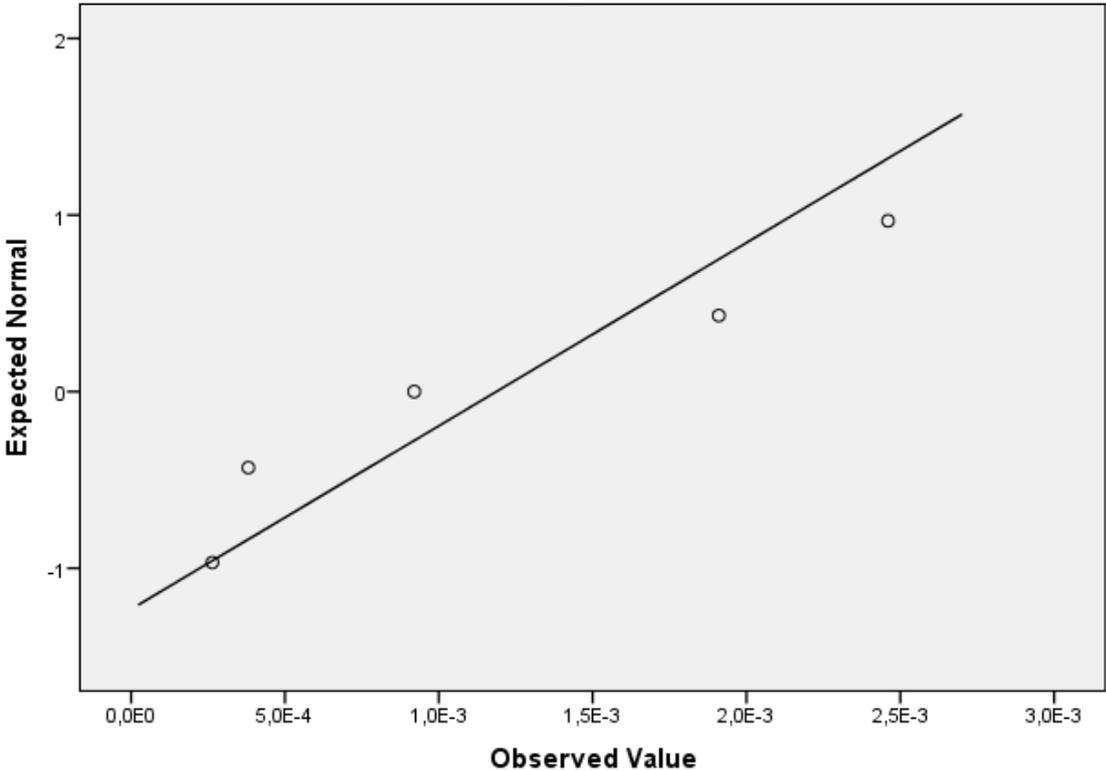
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 12



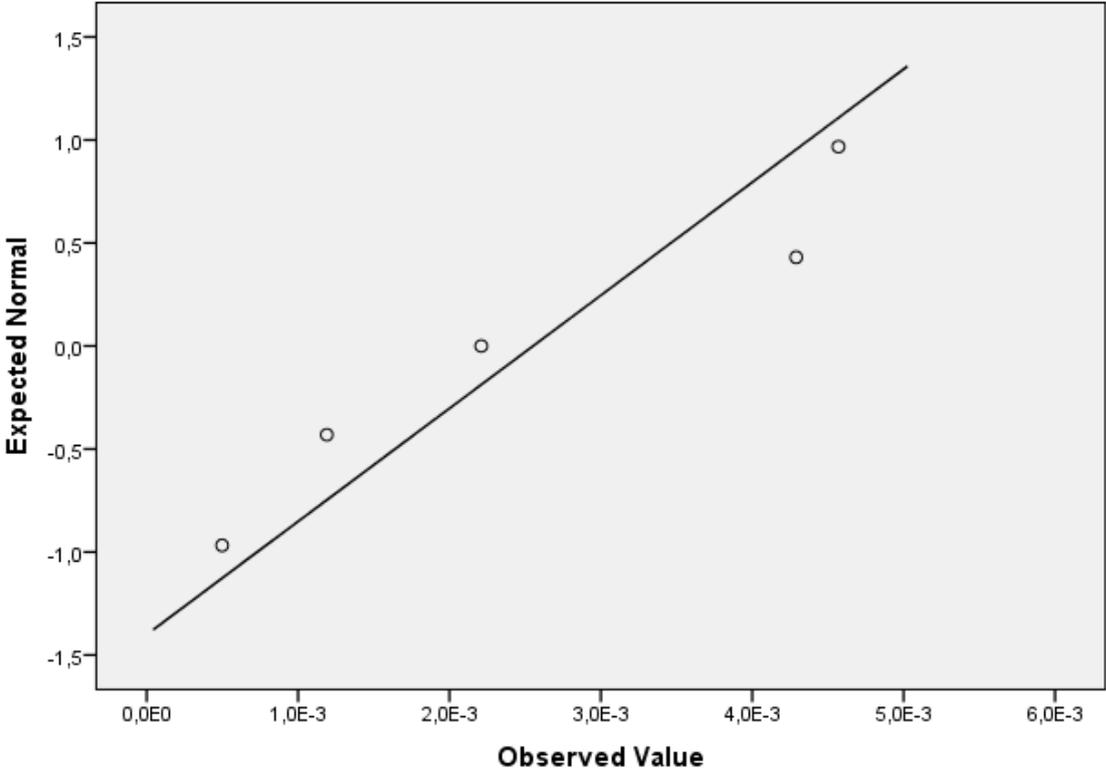
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 13



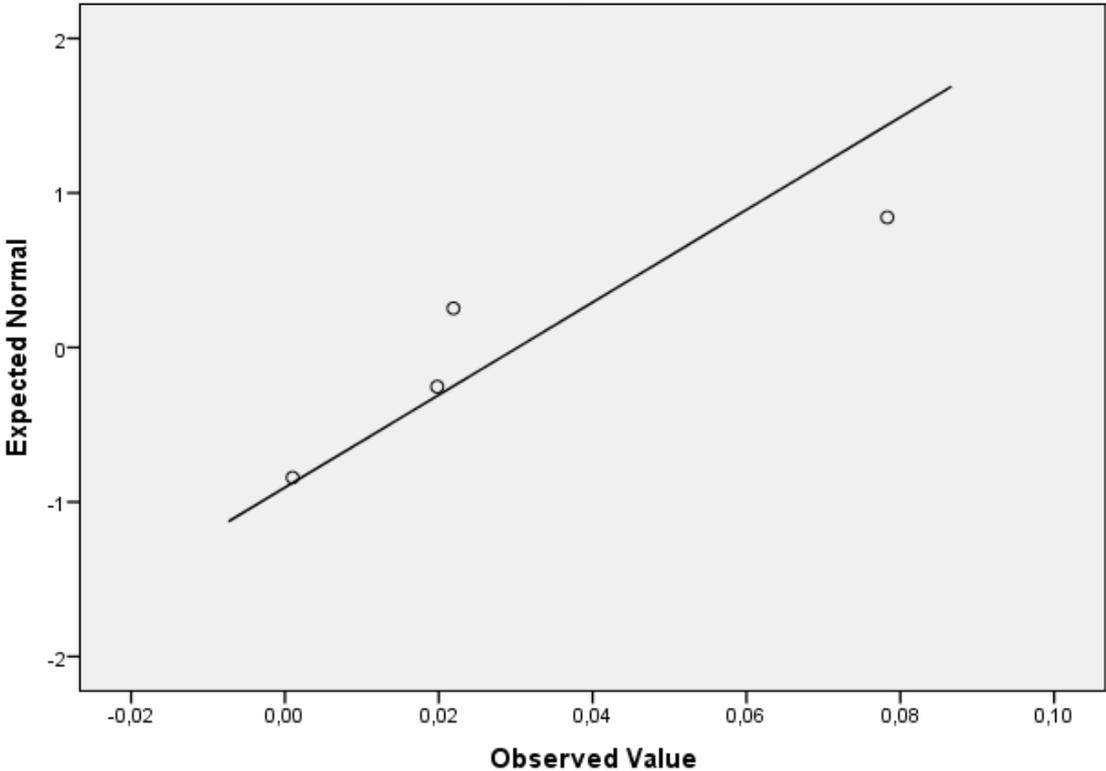
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 14



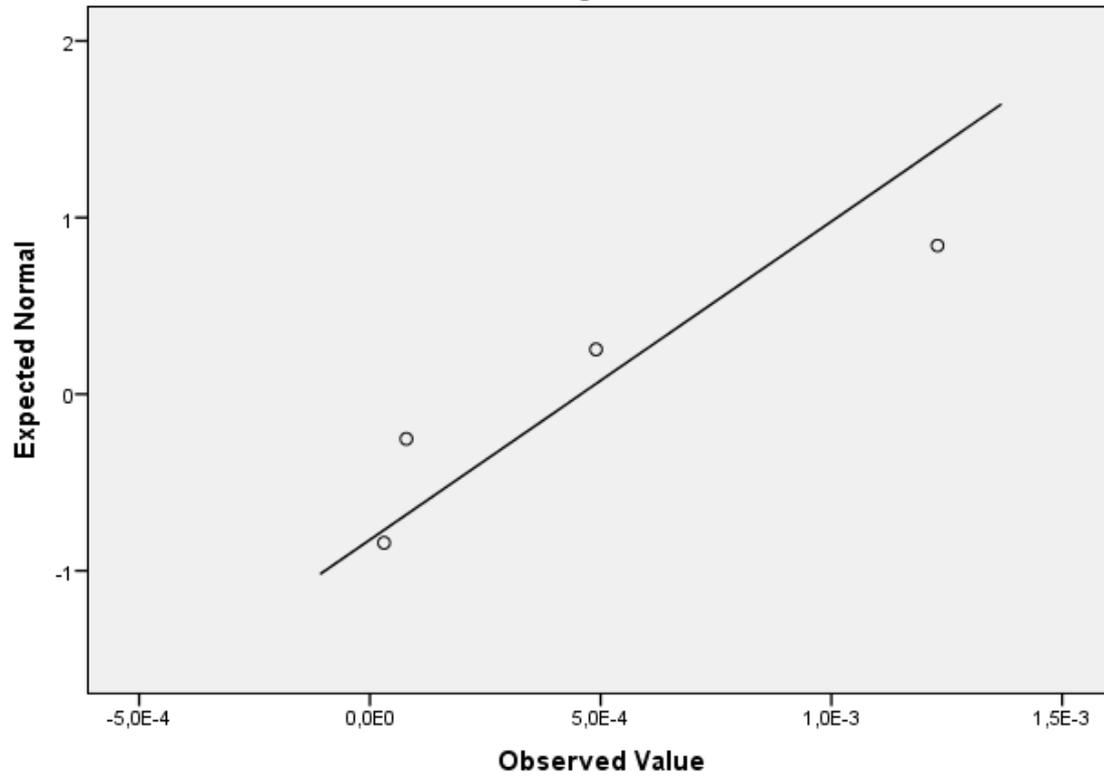
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 15



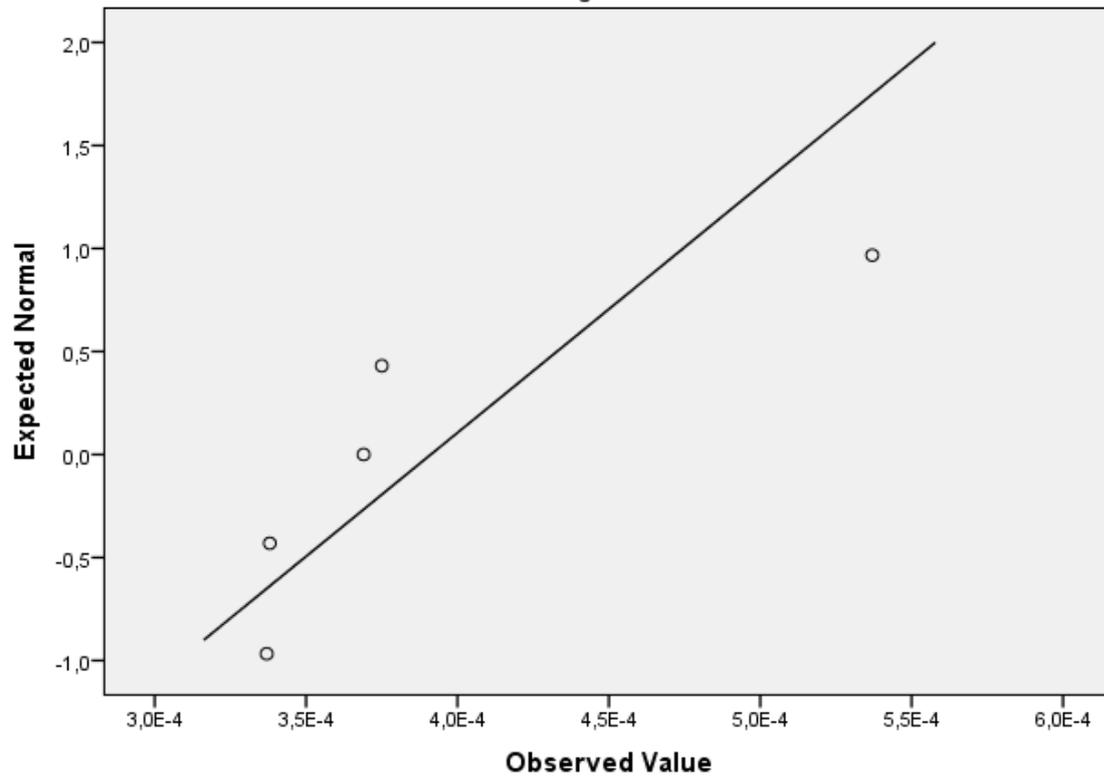
Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 16



Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 17



Normal Q-Q Plot of Concentration
for Mouseorgan= 18



Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests mit Angabe aller Teststatistiken inklusive dem Z-Wert für die Berechnung der Effektstärke

Studiengruppe: BD Experiment 24h:

Samples	Control	Test Statistics	Result	Significance																																
Bone	mgDNA	<p style="text-align: center;">Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>12,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>27,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-,104</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,917</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>1,000^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Concentration	Mann-Whitney U	12,000	Wilcoxon W	27,000	Z	-,104	Asymp. Sig. (2-tailed)	,917	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b	(U(n=10)=12, p=1)	no																				
	Concentration																																			
Mann-Whitney U	12,000																																			
Wilcoxon W	27,000																																			
Z	-,104																																			
Asymp. Sig. (2-tailed)	,917																																			
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b																																			
Brain	mgDNA	<p style="text-align: center;">Ranks</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Mouseorgan</th> <th>N</th> <th>Mean Rank</th> <th>Sum of Ranks</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Concentration 0</td> <td></td> <td>5</td> <td>3,00</td> <td>15,00</td> </tr> <tr> <td>Concentration 2</td> <td></td> <td>5</td> <td>8,00</td> <td>40,00</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td></td> <td>10</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Concentration 0		5	3,00	15,00	Concentration 2		5	8,00	40,00	Total		10				Concentration	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b	(U(n=10)=0, p=.008) Effect size: r= 0,83	yes, higher
	Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks																																
Concentration 0		5	3,00	15,00																																
Concentration 2		5	8,00	40,00																																
Total		10																																		
	Concentration																																			
Mann-Whitney U	,000																																			
Wilcoxon W	15,000																																			
Z	-2,611																																			
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009																																			
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b																																			
Heart	mgDNA	<p style="text-align: center;">Ranks</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Mouseorgan</th> <th>N</th> <th>Mean Rank</th> <th>Sum of Ranks</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Concentration 0</td> <td></td> <td>5</td> <td>3,00</td> <td>15,00</td> </tr> <tr> <td>Concentration 3</td> <td></td> <td>5</td> <td>8,00</td> <td>40,00</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td></td> <td>10</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> </tbody> </table>		Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Concentration 0		5	3,00	15,00	Concentration 3		5	8,00	40,00	Total		10				Concentration	(U(n=10)=0, p=.008) Effect size: r= 0,83	yes, higher										
	Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks																																
Concentration 0		5	3,00	15,00																																
Concentration 3		5	8,00	40,00																																
Total		10																																		
	Concentration																																			

		<table border="1"> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b																								
Mann-Whitney U	,000																																			
Wilcoxon W	15,000																																			
Z	-2,611																																			
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009																																			
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b																																			
Kidney	mgDNA	<p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>6,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>21,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-1,358</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,175</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,222^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Concentration	Mann-Whitney U	6,000	Wilcoxon W	21,000	Z	-1,358	Asymp. Sig. (2-tailed)	,175	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,222 ^b	(U(n=10)=6, p=.222)	no																				
	Concentration																																			
Mann-Whitney U	6,000																																			
Wilcoxon W	21,000																																			
Z	-1,358																																			
Asymp. Sig. (2-tailed)	,175																																			
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,222 ^b																																			
Liver	mgDNA	<p>Ranks</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Mouseorgan</th> <th>N</th> <th>Mean Rank</th> <th>Sum of Ranks</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Concentration 0</td> <td>0</td> <td>5</td> <td>3,00</td> <td>15,00</td> </tr> <tr> <td>Concentration 5</td> <td>5</td> <td>5</td> <td>8,00</td> <td>40,00</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td></td> <td>10</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Concentration 0	0	5	3,00	15,00	Concentration 5	5	5	8,00	40,00	Total		10				Concentration	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b	(U(n=10)=0, p=.008) Effect size: r= 0,83	yes, higher
	Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks																																
Concentration 0	0	5	3,00	15,00																																
Concentration 5	5	5	8,00	40,00																																
Total		10																																		
	Concentration																																			
Mann-Whitney U	,000																																			
Wilcoxon W	15,000																																			
Z	-2,611																																			
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009																																			
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b																																			
Lung	mgDNA	<p>Ranks</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Mouseorgan</th> <th>N</th> <th>Mean Rank</th> <th>Sum of Ranks</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Concentration 0</td> <td>0</td> <td>5</td> <td>3,00</td> <td>15,00</td> </tr> <tr> <td>Concentration 6</td> <td>6</td> <td>5</td> <td>8,00</td> <td>40,00</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td></td> <td>10</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> </tbody> </table>		Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Concentration 0	0	5	3,00	15,00	Concentration 6	6	5	8,00	40,00	Total		10				Concentration	(U(n=10)=0, p=.008) Effect size: r= 0,83	yes, higher										
	Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks																																
Concentration 0	0	5	3,00	15,00																																
Concentration 6	6	5	8,00	40,00																																
Total		10																																		
	Concentration																																			

		<table border="1"> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b				
Mann-Whitney U	,000															
Wilcoxon W	15,000															
Z	-2,611															
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009															
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b															
Spleen	mgDNA	<p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>6,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>21,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-1,358</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,175</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,222^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Concentration	Mann-Whitney U	6,000	Wilcoxon W	21,000	Z	-1,358	Asymp. Sig. (2-tailed)	,175	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,222 ^b	(U(n=10)=6, p=.222)	no
	Concentration															
Mann-Whitney U	6,000															
Wilcoxon W	21,000															
Z	-1,358															
Asymp. Sig. (2-tailed)	,175															
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,222 ^b															
Gonads	mgDNA	<p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>5,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>11,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-,745</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,456</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,571^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Concentration	Mann-Whitney U	5,000	Wilcoxon W	11,000	Z	-,745	Asymp. Sig. (2-tailed)	,456	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,571 ^b	(U(N=8)=5, p=.571)	no
	Concentration															
Mann-Whitney U	5,000															
Wilcoxon W	11,000															
Z	-,745															
Asymp. Sig. (2-tailed)	,456															
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,571 ^b															

Studiengruppe: BD Experiment 7d:

Samples	Control	Test Statistics	Result	Significance												
Bone	mgDNA	<p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>8,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>23,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-,940</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,347</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,421^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Concentration	Mann-Whitney U	8,000	Wilcoxon W	23,000	Z	-,940	Asymp. Sig. (2-tailed)	,347	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,421 ^b	(U(n=10)=8, p=.421)	no
	Concentration															
Mann-Whitney U	8,000															
Wilcoxon W	23,000															
Z	-,940															
Asymp. Sig. (2-tailed)	,347															
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,421 ^b															
Brain	mgDNA	<p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> </tbody> </table>		Concentration	(U(n=10)=0, p=.008)	yes, lower										
	Concentration															

		<table border="1"> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b				
Mann-Whitney U	,000															
Wilcoxon W	15,000															
Z	-2,611															
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009															
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b															
Heart	mgDNA	<p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>10,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>20,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>1,000</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>1,000^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Concentration	Mann-Whitney U	10,000	Wilcoxon W	20,000	Z	,000	Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b	(U(n=9)=10, p=1)	no
	Concentration															
Mann-Whitney U	10,000															
Wilcoxon W	20,000															
Z	,000															
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000															
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b															
Kidney	mgDNA	<p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Concentration	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b	(U(n=10)=0, p=.008)	yes, lower
	Concentration															
Mann-Whitney U	,000															
Wilcoxon W	15,000															
Z	-2,611															
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009															
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b															
Liver	mgDNA	<p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Concentration	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b	(U(n=10)=0, p=.008)	yes, lower
	Concentration															
Mann-Whitney U	,000															
Wilcoxon W	15,000															
Z	-2,611															
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009															
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b															
Lung	mgDNA	<p>Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>5,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>20,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-1,225</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,221</td> </tr> </tbody> </table>		Concentration	Mann-Whitney U	5,000	Wilcoxon W	20,000	Z	-1,225	Asymp. Sig. (2-tailed)	,221	(U(n=9)=5, p=.221)	no		
	Concentration															
Mann-Whitney U	5,000															
Wilcoxon W	20,000															
Z	-1,225															
Asymp. Sig. (2-tailed)	,221															

		Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,286 ^b														
		a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.															
Spleen	mgDNA	Test Statistics^a <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>10,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,449</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,014</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,016^b</td> </tr> </tbody> </table>			Concentration	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	10,000	Z	-2,449	Asymp. Sig. (2-tailed)	,014	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,016 ^b	(U(n=9)=0, p=.016)	Yes, lower
	Concentration																
Mann-Whitney U	,000																
Wilcoxon W	10,000																
Z	-2,449																
Asymp. Sig. (2-tailed)	,014																
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,016 ^b																
		a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.															
Gonads	mgDNA	Test Statistics^a <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </tbody> </table>			Concentration	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b	(U(n=10)=0, p=.008)	yes, lower
	Concentration																
Mann-Whitney U	,000																
Wilcoxon W	15,000																
Z	-2,611																
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009																
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b																
		a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.															

Studiengruppe: BD Experiment 24h und BD Experiment 7d:

Samples 24h	Control 7d	Test Statistics	Result	Significance																																
Brain	Brain	Ranks <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Mouseorgan</th> <th>N</th> <th>Mean Rank</th> <th>Sum of Ranks</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Concentration</td> <td>2</td> <td>5</td> <td>8,00</td> <td>40,00</td> </tr> <tr> <td></td> <td>12</td> <td>5</td> <td>3,00</td> <td>15,00</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Total</td> <td>10</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> Test Statistics^a <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </tbody> </table>		Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Concentration	2	5	8,00	40,00		12	5	3,00	15,00		Total	10				Concentration	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b	(U(n=10)=0, p=.008) Effect size: r= 0,83	yes
	Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks																																
Concentration	2	5	8,00	40,00																																
	12	5	3,00	15,00																																
	Total	10																																		
	Concentration																																			
Mann-Whitney U	,000																																			
Wilcoxon W	15,000																																			
Z	-2,611																																			
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009																																			
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b																																			

		a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.																																		
Heart	Heart	<p style="text-align: center;">Ranks</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Mouseorgan</th> <th>N</th> <th>Mean Rank</th> <th>Sum of Ranks</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Concentration</td> <td>3</td> <td>5</td> <td>6,40</td> <td>32,00</td> </tr> <tr> <td></td> <td>13</td> <td>4</td> <td>3,25</td> <td>13,00</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Total</td> <td>9</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>3,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>13,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-1,715</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,086</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,111^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Concentration	3	5	6,40	32,00		13	4	3,25	13,00		Total	9				Concentration	Mann-Whitney U	3,000	Wilcoxon W	13,000	Z	-1,715	Asymp. Sig. (2-tailed)	,086	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,111 ^b	(U(n=9)=3, p=.111)	no
	Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks																																
Concentration	3	5	6,40	32,00																																
	13	4	3,25	13,00																																
	Total	9																																		
	Concentration																																			
Mann-Whitney U	3,000																																			
Wilcoxon W	13,000																																			
Z	-1,715																																			
Asymp. Sig. (2-tailed)	,086																																			
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,111 ^b																																			
Liver	Liver	<p style="text-align: center;">Ranks</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Mouseorgan</th> <th>N</th> <th>Mean Rank</th> <th>Sum of Ranks</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Concentration</td> <td>5</td> <td>5</td> <td>8,00</td> <td>40,00</td> </tr> <tr> <td></td> <td>15</td> <td>5</td> <td>3,00</td> <td>15,00</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Total</td> <td>10</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>15,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,611</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,009</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,008^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Concentration	5	5	8,00	40,00		15	5	3,00	15,00		Total	10				Concentration	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	15,000	Z	-2,611	Asymp. Sig. (2-tailed)	,009	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b	(U(n=10)=0, p=.008) Effect size: r= 0,83	yes
	Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks																																
Concentration	5	5	8,00	40,00																																
	15	5	3,00	15,00																																
	Total	10																																		
	Concentration																																			
Mann-Whitney U	,000																																			
Wilcoxon W	15,000																																			
Z	-2,611																																			
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009																																			
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,008 ^b																																			
Lung	Lung	<p style="text-align: center;">Ranks</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Mouseorgan</th> <th>N</th> <th>Mean Rank</th> <th>Sum of Ranks</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>6</td> <td>5</td> <td>7,00</td> <td>35,00</td> </tr> </tbody> </table>		Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks		6	5	7,00	35,00	(U(n=9)=0, p=.016) Effect size: r= 0,82	yes																						
	Mouseorgan	N	Mean Rank	Sum of Ranks																																
	6	5	7,00	35,00																																

		<table border="1"> <tr> <td>Concentration</td> <td>16</td> <td>4</td> <td>2,50</td> <td>10,00</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td></td> <td>9</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Concentration	16	4	2,50	10,00	Total		9						
Concentration	16	4	2,50	10,00												
Total		9														
		<p align="center">Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Concentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>10,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-2,449</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,014</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,016^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Mouseorgan b. Not corrected for ties.</p>		Concentration	Mann-Whitney U	,000	Wilcoxon W	10,000	Z	-2,449	Asymp. Sig. (2-tailed)	,014	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,016 ^b		
	Concentration															
Mann-Whitney U	,000															
Wilcoxon W	10,000															
Z	-2,449															
Asymp. Sig. (2-tailed)	,014															
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,016 ^b															

Studiengruppe: BD Kontrolle 24h und BD Kontrolle 7d:

Samples	Control	Test Statistics	Result	Significance																																
Mittelwert Heart	Mittelwert mgDNA	<p align="center">Ranks</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Experiment</th> <th>N</th> <th>Mean Rank</th> <th>Sum of Ranks</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Konzentration</td> <td>100</td> <td>3</td> <td>6,00</td> <td>18,00</td> </tr> <tr> <td></td> <td>101</td> <td>5</td> <td>3,60</td> <td>18,00</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td></td> <td>8</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p align="center">Test Statistics^a</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Konzentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mann-Whitney U</td> <td>3,000</td> </tr> <tr> <td>Wilcoxon W</td> <td>18,000</td> </tr> <tr> <td>Z</td> <td>-1,342</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig. (2-tailed)</td> <td>,180</td> </tr> <tr> <td>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</td> <td>,250^b</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Grouping Variable: Experiment b. Not corrected for ties.</p>		Experiment	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Konzentration	100	3	6,00	18,00		101	5	3,60	18,00	Total		8				Konzentration	Mann-Whitney U	3,000	Wilcoxon W	18,000	Z	-1,342	Asymp. Sig. (2-tailed)	,180	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,250 ^b	(U(n=8)=3, p=.250)	no
	Experiment	N	Mean Rank	Sum of Ranks																																
Konzentration	100	3	6,00	18,00																																
	101	5	3,60	18,00																																
Total		8																																		
	Konzentration																																			
Mann-Whitney U	3,000																																			
Wilcoxon W	18,000																																			
Z	-1,342																																			
Asymp. Sig. (2-tailed)	,180																																			
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,250 ^b																																			