

**Entwicklung und Einsatz eines  
FIA-Immunanalysensystems  
zur schnellen On-line-Bestimmung von  
pharmazeutisch relevanten humanen Proteinen  
in Bioprozessen**

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

- Dr. rer. nat. -

genehmigte

**Dissertation**

von

Dipl.-Chem. Katja Klockewitz

Geboren am 6. Juni 1972, in Hannover

2000

Referent: Professor Dr. Thomas Scheper  
Korreferent: Professor Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl  
Tag der Promotion: 13.12.1999

## Abstract

Katja Klockewitz

*Entwicklung und Einsatz eines FIA-Immunanalytensystems zur schnellen On-line-Bestimmung von pharmazeutisch relevanten humanen Proteinen in Bioprozessen*

Für die optimale Prozeßführung bei der Herstellung humaner Proteine (z.B. Blutgerinnungsfaktoren wie AT III, Faktor VII) durch tierische Zellkulturen ist die genaue Kenntnis der aktuellen Konzentration des Zielprodukts im Kultivierungsmedium erforderlich. Als Alternative zu den üblichen zeit- und personalintensiven ELISA-Tests wurde ein Verfahren entwickelt, das die Vorteile eines schnellen und automatisierbaren Fließinjektionsanalytensystems (FIA) mit der hohen Empfindlichkeit eines heterogenen Immunassays verbindet.

Das hier entwickelte System sollte zur On- und Off-line-Quantifizierung des rekombinanten Blutgerinnungsfaktors Faktor VIIa in Fermentationsproben eingesetzt werden. Die Untersuchungen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit der Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark), die die drei verschiedenen Antikörpertypen, die Fermentationsproben und den Faktor VIIa-Standard zur Verfügung gestellt hat.

Bei dem entwickelten Elutionsassay werden die Antikörper im Überschuß auf einem festen Trägermaterial immobilisiert und mittels einer Durchflußkartusche in das FIA-System implementiert. Nach der Injektion der Fermentationsprobe wird diese im Pufferstrom durch die Kartusche, in der das Zielprotein quantitativ gebunden wird, transportiert. Gleichzeitig werden alle anderen Proteine und Medienbestandteile mit dem Trägerstrom ausgewaschen. Anschließend wird die Antikörper-Antigenbindung mittels geeigneter Elutionsbedingungen aufgebrochen und der Analyt ausgespült. Dieser kann dann direkt über die Proteineigenfluoreszenz (280 nm/340 nm) detektiert werden. Die Steuerung des Systems sowie die Datenaufnahme und -auswertung erfolgt vollautomatisch durch die am Institut entwickelte Software CAFCA. Ein Analysenzyklus dauert 5-9 Minuten.

Nach der Entwicklung geeigneter Elutionsbedingungen wurde das System verschiedenen Langzeittests unterzogen. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe statistischer Verfahren ausgewertet und das System näher charakterisiert, um seine Genauigkeit zu testen. Selbst wenn das System nur alle 50 Messungen neu kalibriert wird, ist die erzielte Genauigkeit mit einem relativen Fehler von kleiner als sechs Prozent deutlich geringer als bei dem gängigen ELISA-Test. Nach der Optimierung der Injektionsparameter wurde das System bei der Messung von Fermentationsproben aus verschiedensten Prozessen eingesetzt. Diese Untersuchungen zeigten eine sehr gute Korrelation zu den Ergebnissen des ELISA-Tests und lieferten zusätzlich einige interessante Resultate in Bezug auf den Anteil der korrekt  $\gamma$ -carboxylierten Form des Proteins an der Gesamtmenge Faktor VIIa.

## Abstract

Katja Klockewitz

*Development and application of a FIA-immunoanalysis system for fast on-line detection of pharmaceutically relevant human proteins in bioprocesses*

For the determination of human proteins produced in mammalian cell cultivations, fast and automated analytical methods are essential to monitor and control the ongoing bioprocess. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), widely used for this purpose, is time consuming, labour-intensive and expensive to automate. Using antibodies as highly specific binding partners for the analyte of interest, a selective determination in complex protein mixtures and cultivation media without further purification steps is possible. In order to develop a fast and sensitive assay for on-line monitoring of bioprocesses, a combination of flow-injection analysis (FIA) and a heterogeneous immunoassay is used in these investigations.

The developed system should be able to determine a recombinant coagulation factor, Factor VIIa, on- and off-line in cultivation samples. All investigations were done in close collaboration with the company Novo Nordisk A/S (Copenhagen, Denmark), which provided the antibodies, samples and the Factor VIIa standard.

For this elution-assay, the antibodies are immobilized on a solid matrix and placed by the use of a cartridge in the flow system. Having injected of the sample into the carrier buffer flow, the antigen containing sample flows through the cartridge. The antigen binds to the immobilized antibody while the whole system is rinsed with buffer solution to wash out byproducts. In principle all antigen molecules are trapped inside the cartridge. Afterwards the antigen-antibody-bond is broken by application of an adapted elution-step and the eluted target protein flows through a spectrofluorometer to determine the protein concentration. Control of the system, as well as recording and storage of data is performed by a personal computer with the software CAFCA (developed in-house). One analysis-cycle takes about 5-9 minutes, depending on the sample-composition.

Having screened appropriate elution-conditions, several tests concerning long-time stability of the assay have been performed. The obtained data has been calculated with statistic methods to characterize the system and to control its accuracy. The relative error is less than six percent, even if the system is only re-calibrated every 50th measurement. This underlines the very high accuracy compared

to the standard ELISA. After optimizing some injection parameters, the system has been applied to determine the Factor VIIa concentration in the supernatants of different mammalian cell cultivations. The results show excellent correlation to those from the ELISA test. Furthermore, they render additional interesting information concerning the amount of correct  $\gamma$ -carboxylated form as a part of the total Factor VIIa protein-concentration.

## Schlagworte zum Inhalt / Keywords

Immunanalyse

On-line Prozeßbeobachtung

Faktor VII

immunoassay

on-line monitoring

Factor VII

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract (deutsch)</b>	<b>3</b>
<b>Abstract (English)</b>	<b>4</b>
<b>Schlagworte /Keywords</b>	<b>5</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>9</b>
<b>2 Theoretischer Teil</b>	<b>11</b>
2.1 Fließinjektionsanalyse	11
2.2 Immunanalytik	13
2.2.1 Antikörper	13
2.2.2 Immunanalytische Methoden	15
2.2.3 Immunassays ohne Markierung	16
2.2.3.1 Nephelometrische und Turbidimetrische Immunassays	16
2.2.4 Immunassays mit Markierung	17
2.2.4.1 Radioimmunassay	17
2.2.4.2 Enzymimmunassay	18
2.2.4.3 Fluoreszenzimmunassay	19
2.2.5 Immunsensoren	20
2.2.6 FIA-Immunassays in der Bioprozeßkontrolle	21
2.3 Untersuchter Analyt	23
2.3.1 Faktor VIIa	23
2.3.2 Methoden zur Faktor VII Bestimmung	25
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Heterogener Elutionsimmunassay	27
3.1.1 Prinzip des Elutionsassays	27
3.1.2 Systemaufbau	29
3.1.3 Signalauswertung	31
3.1.4 Verwendete Antikörper	32

---

<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>33</b>
4.1	Voruntersuchungen mit Faktor VIIa	33
4.2	Assayentwicklung und –optimierung	34
4.2.1	Antikörper FVII-4 F9 (F9A2)	35
4.2.2	Antikörper FVII-4 F7 (F7A2)	37
4.2.3	Antikörper FVII (F1A2)	40
4.3	Charakterisierung des Meßsystems	43
4.3.1	Stabilität der Kartusche	43
4.3.2	Reproduzierbarkeit der Meßdaten	44
4.3.2.1	Langzeitmessung mit Faktor VIIa in Puffer	44
4.3.2.2	Langzeitmessung mit Faktor VIIa in Medium	46
4.3.3	Statistische Auswertung der Langzeitmessungen	47
4.3.3.1	Differenztest	47
4.3.3.2	Kalibrierhäufigkeit	49
4.3.4	Optimierung des Injektionsverfahrens	53
4.4	Messung von Fermentationsproben	56
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>69</b>
6.1	Immobilisierung der Antikörper	69
6.2	Entsalzen des Faktor VIIa-Stadards	69
6.3	Geräteliste	69
6.4	Chemikalienliste	70
6.4.1	Immunochemikalien	70
6.4.2	Feinchemikalien	70
6.5	Puffer und Reagenzien	71
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BHK	Baby Hamster Kidney
BrCN	Bromcyan
EIA	Enzymimmunassay
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent assay
EMIT	enzyme-multiplied immunoassay technique
FETIA	Fluoreszenztransfer-Immunoassay
FIA	Fließinjektionsanalyse
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FIIA	Fluoreszenzimmunassay
rFVIIa	rekombinanter aktivierter Faktor VII
g	Gramm
HPLC	high performance liquid chromatography
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphat
L	Liter
mAK	Monoklonale Antikörper
pAK	Polyklonale Antikörper
R	Regressionskoeffizient
RIA	Radioimmunassay
rt-PA	Gewebeplasminaktivator
rkU	relative Konzentrationseinheit
rU	relative Unit
s	Sekunde
SPR	Surface Plasmon Resonanz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TMRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
V	Volt



# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Biotechnologie stellt eine der Schlüsseltechnologien unserer Zeit dar, deren Entwicklungspotential mit dem der modernen Informationstechnologie verglichen werden kann. Die Entwicklung der DNA-Rekombinationstechnik in den 70er Jahren ermöglichte es, spezielle Teile der Erbsubstanz aus Lebewesen unterschiedlicher Spezies neu zu kombinieren und in andere Wirtsorganismen (Bakterien, Pilze, Säugerzellen) zu übertragen. Mit Hilfe dieser modifizierten Stämme ist nun eine schnelle und einfache Produktion pharmakologisch und industriell interessanter kleiner Moleküle und Proteine, zum Beispiel Enzyme, Antikörper, Hormone und Rezeptoren, möglich. Das bekannteste Beispiel ist die Gewinnung von rekombinantem Human-Insulin aus *E.coli* zur Behandlung von Diabetes mellitus. Komplexere therapeutisch relevante Proteine mit zum Beispiel mehreren Disulfidbrücken und Glykosylierungsmustern können allerdings nur durch den komplexen Syntheseapparat von Säugerzellen hergestellt werden. Nur diese sind in der Lage, posttranslatorische Modifikationen vorzunehmen. Die Kultivierung dieses Zelltyps hat daher an großer Bedeutung gewonnen, besonders bei der Herstellung von Proteinen zur Blutgerinnung (Faktor VII und VIII), Gewebefibrinolyse (rt-PA) zur Fibrinolyse und Immunsuppressoren (monoklonale Antikörper). Die klassische Gewinnung solcher Substanzen aus Körperflüssigkeiten oder -gewebe ist nur unter großem Aufwand möglich, da sie oft nur in Spuren vorkommen. Mit biotechnologischen Verfahren ist die Produktion schneller und in großer Konzentration möglich, sobald eine entsprechende Zelllinie etabliert wurde. Zudem bringt die Verwendung von Humanblut-Präparaten das Risiko einer Virusinfektion (z.B. HIV oder Hepatitis) mit sich, was bei der Gewinnung aus Zellkulturen ausgeschlossen ist.

Die Effizienz dieser biotechnologischen Prozesse hängt ganz entscheidend davon ab, in wie weit das Potential der Organismen optimal genutzt werden kann. Zum Verständnis der Stoffwechselprozesse der Zellen sind möglichst genaue und schnelle Meßsysteme erforderlich, mit deren Hilfe die chemische und physikalische Umgebung der Zelle beobachtet werden kann. Mit diesen Daten ist dann sowohl die Optimierung als auch die Modellierung der Prozeßführung möglich. Standardmäßig werden meist pH-Wert, O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Gehalt der Abluft, pO<sub>2</sub>, Temperatur und die Nährstoffkonzentration on-line erfaßt. Für die Analytik von Schlüsselmetaboliten wie Acetat, Glucose, Lactat oder Aminosäuren sind Verfahren zur schnellen Bestimmung mittels Fließinjektionsanalyse- (FIA) oder HPLC-Systemen entwickelt worden.

Die schnelle Bestimmung der höhermolekularen Produkte bereitet dagegen häufig Schwierigkeiten, da sich die biologische Aktivität von Proteinen nur schlecht oder gar nicht für eine Nachweisreaktion nutzen läßt. Daher werden meist immunchemische Methoden zur Quantifizierung dieser Analyte in den oft sehr komplexen Kultivierungsmedien herangezogen. Die gängigste Methode ist der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Dieses in Mikrotiterplatten durchgeführte Verfahren ist allerdings sehr zeit- und arbeitsintensiv sowie schlecht automatisierbar, was einen On-line-Einsatz unmöglich macht.

Die Ergebnisse stehen oft erst nach einigen Tagen zur Verfügung, da der hohe Arbeitsaufwand für eine einzelne Probe nicht sinnvoll ist und die Proben daher gesammelt werden. Außerdem bringen die zahlreichen erforderlichen Verdünnungsschritte eine große Fehlerquelle mit sich.

Um eine produktgesteuerte Regelung des Prozesses zu ermöglichen, sind aktuelle Informationen über die Konzentration des Zielanalyten erforderlich. Die Realisierung einer solchen Analytik ist über die Kombination eines FIA-Systems mit einem Immunchemischen Assay möglich. Ein solches Verfahren, das auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie basiert, ist bereits am Institut für Technische Chemie für verschiedene Proteine (rt-PA, AT III, IgG) entwickelt und bei Kultivierungen und Aufreinigungsprozessen erfolgreich eingesetzt worden [REINECKE, 1993; SCHULZE, 1994; BEYER, 1995; HAGEDORN, 1998].

Die Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) stellt den Blutgerinnungsfaktor Faktor VIIa in Tierzellkultivierungen her. Als Analytik steht auch hier bisher nur ein ELISA-Test zur Verfügung, so daß eine direkte Prozeßkontrolle aus den bereits erwähnten Gründen nicht durchführbar ist. Ziel dieser Arbeit ist es, mit verschiedenen von Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellten Antikörpern auf der Basis des existierenden Systems einen funktionsfähigen und zuverlässigen heterogenen Immunassay zu entwickeln und zu optimieren. Das entsprechende System soll dann zur Quantifizierung des Proteins in verschiedenen Fermentationsproben eingesetzt werden. Alle Meßdaten von Fermentationsproben der Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) sind in den Graphiken in relativen Einheiten angegeben.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Fließinjektionsanalytik

Automatisierte Analysenverfahren ermöglichen die Wiederholung bestimmter Arbeitsschritte ohne Benutzereingriff und sind daher sowohl einfacher zu bedienen als auch schneller und besser reproduzierbar als vergleichbare manuelle Messungen. Durch den Einsatz von Computern sind zeitlich exakt gesteuerte Meßzyklen möglich. Dadurch kann die Messung auch im Nicht-Gleichgewichtszustand der Detektionsreaktion erfolgen, was eine Erhöhung der Analysenfrequenz erlaubt. Vor über 20 Jahren wurde die Fließinjektionsanalyse (FIA) entwickelt, mit deren Hilfe die Automatisierung naß-chemischer Analysenverfahren leicht durchführbar ist [RUZICKA, 1975]. Der schematische Aufbau eines einfachen FIA-Systems ist in Abbildung 1 dargestellt. Es besteht aus einer pulsationsarm und konstant arbeitenden Pumpe, einem Injektionsventil mit Probenschleife oder einer Ventilkombination, einer definierten Reaktionsstrecke (Manifold), einem Detektor sowie einem Prozeßrechner zur Datenaufnahme und Steuerung des Systems.

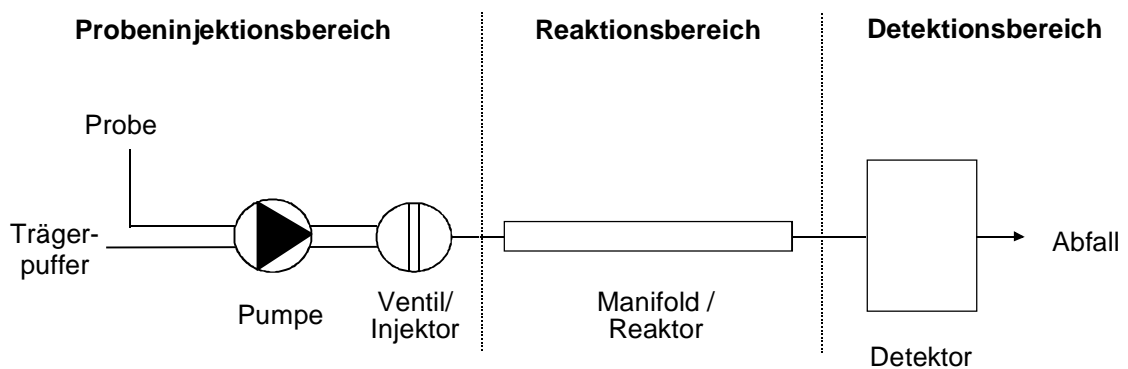


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines FIA-Systems

Dem Verfahren zur Probeninjektion muß besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden, da es großen Einfluß auf die Präzision der Methode hat. Das Waschvolumen sollte dem zwei bis dreifachen Volumen der Probenschleife entsprechen [DOLAN, 1989]. Der Manifold kann aus einem Reaktionsschlauch, einer Membran oder einem Trägermaterial in einer Kartusche bestehen. Alle Arten von Detektoren zur spektroskopischen, elektrochemischen oder fluorimetrischen Messung sind denkbar, sofern sie mit einer Durchflußzelle ausgestattet sind. Das Meßsignal, üblicherweise als "Peak" bezeichnet, kann nach verschiedenen Methoden ausgewertet werden (Höhe, Breite, Fläche, Steigung, Gradiententechnik) [RUZICKA, 1988]. Beim Transport vom Injektions- zum Detektionsort bildet sich aufgrund von Dispersionsprozessen in axialer Richtung ein Konzentrationsprofil aus. Da diese Dispersionsprozesse keinen stationären Zustand erreichen, ist es zur Gewährleistung reproduzierbarer Messungen erforderlich, die Meßbedingungen (z. B. Transportstrecke, Flußrate, Probenvolumen) konstant zu halten.

Die FIA ist daher eine dynamische Analysenmethode, woraus sich zahlreiche Vorteile ergeben:

- Kurze Verweilzeiten der Proben im Analysensystem und damit eine hohe Meßfrequenz, da im nicht-stationären Zustand gemessen wird.
- Lange Standzeiten der Systeme, da die Belastung durch Proben und Reagenzien gering ist. Dies ist besonders beim Einsatz von Biosensoren wichtig.
- Die Probenkonditionierung (z.B. pH-Wert-Einstellung, Verdünnung) kann automatisiert direkt im FIA-System vorgenommen werden.

Die im System auftretende Dispersion ist abhängig von dem Volumen der injizierten Probe, deren Verweilzeit im Fließsystem (Pumpgeschwindigkeit, Art des Manifolds) sowie Schlauchinnendurchmesser und Länge der Wegstrecke [RUZICKA, 1988]. Eine Vergrößerung des Probenvolumens bei gleich bleibender Konzentration vergrößert das Signal, erhöht die Empfindlichkeit und verkleinert die Dispersion. Die Dispersion steigt mit der Pumpgeschwindigkeit und unter der Verwendung von Mischkammern. Besonders in das FIA-System eingebundene Festbettreaktoren, wie zum Beispiel Enzymkartuschen, bewirken aufgrund ihrer Geometrie und der heterogenen Trägermatrix zusätzliche Dispersionseffekte. Diese können aber auch gezielt als analytisches Mittel eingesetzt werden: Eine hohe Dispersion bewirkt eine gute Vermischung der Reagenzien und damit eine vollständige Reaktion. Dabei sinkt jedoch die Analysenfrequenz, da sich die Verweilzeit sehr stark verlängert und die Probe somit erst deutlich später vollständig aus dem System ausgespült ist. Bei langsam ablaufenden Detektionsreaktionen bietet sich die Stopped-Flow-Technik als Alternative an, bei der der Fluß des Trägerstroms nach der Injektion der Probe unterbrochen wird. Nachdem die Reaktion ausreichend fortgeschritten ist, wird die Pumpe wieder eingeschaltet und die durch die Reaktion hervorgerufene Änderung detektiert [CHRISTIAN, 1992]. Durch die Variation der zeitlichen und örtlichen Versuchsparameter sind auch kinetische Messungen möglich [HSIEH, 1995].

## 2.2 Immunanalytik

Die Methoden der Immunanalytik basieren auf der Reaktion von Antikörpern mit entsprechenden Antigenen. Die entscheidenden Vorteile liegen dabei in der hohen Spezifität der Reaktion und der großen Geschwindigkeit. Die entsprechenden Zielanalyte können auch aus komplexen Proteingemischen (z.B. Blut, Urin, Kultivierungsmedien) ohne vorhergehende Aufreinigungsschritte mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit detektiert werden. Dadurch, daß in den letzten Jahren die Verfügbarkeit und Produktion von Antikörpern durch die Gewinnung aus Kultivierungen hybridomer Tierzellen enorm vereinfacht werden konnte, finden sie immer breitere Anwendung in der klinischen und biochemischen Analytik, bei Pharma- und Umweltsanwendungen sowie in der Bioprozeßanalytik.

### 2.2.1 Antikörper

Antikörper sind Glycoproteine, die in der  $\gamma$ -Globulinfraction des Blutplasmas vorkommen und daher auch Immunglobuline genannt werden. Das Molekulargewicht beträgt circa 150.000 Dalton mit einem Kohlenhydratanteil von 2-14 Prozent. Jeder Antikörper besteht aus vier Proteinketten: zwei identischen leichten L-Ketten (light) von je 23 kDa und zwei identischen schweren H-Ketten (heavy) von 53-75 kDa. Jede Kette besteht aus einer Anzahl ungefähr gleich großer "Domänen" mit jeweils 110 Aminosäuren, deren Faltung jeweils durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Diese Untereinheiten werden über Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrücken zusammengehalten und bilden ein Y-förmiges Dimer (Abbildung 2). Die Moleküle besitzen daher eine stabile dreidimensionale Struktur, die aber, besonders im Bereich der Gelenkregion, eine gewisse Flexibilität zur besseren Anpassung an die Bindungsstelle des Antigens hat [VAN DEN TWEEL, 1991].

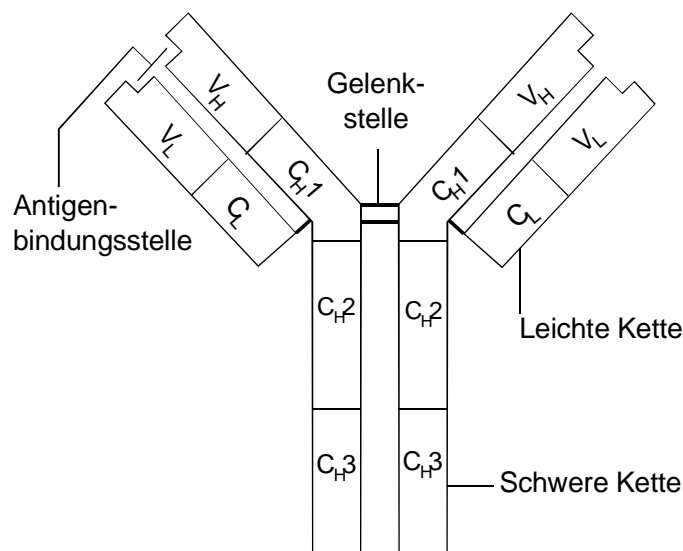


Abb. 2: Struktur eines Antikörpers;  $C_H$ ,  $C_L$  konstante Region der schweren bzw. leichten Ketten;  $V_H$ ,  $V_L$  variable Regionen der schweren bzw. leichten Ketten

Die Immunoglobine werden aufgrund der Unterschiede in ihren H-Ketten in fünf verschiedene Immunoglobinklassen eingeteilt: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Die Moleküle besitzen jeweils variable ( $V_H$ ,  $V_L$ ) und konstante ( $C_H$ ,  $C_L$ ) Kettenabschnitte, wobei in den variablen Regionen sogenannte hypervariable Regionen auftreten, die für die Antikörperbindung verantwortlich sind. Sie befinden sich in den aminoterminalen Abschnitten der L- und H-Ketten, die gemeinsam die Antigenbindungsstelle bilden. Dieser Bereich des Antikörpers wird als Paratop, die komplementäre Bindungsstelle auf dem Antigen als Epitop bezeichnet. Antikörper sind bivalent und können daher an zwei gleiche Epitope auf einem oder zwei verschiedenen Antigenen binden und so im Körper Ziele vernetzen und deaktivieren [STRYER, 1996].

Im menschlichen Serum ist IgG die am häufigsten auftretende Immunoklasse. Diese findet aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität und leichten Verfügbarkeit auch überwiegend Anwendung in analytischen Applikationen [LIDDELL, 1995].

Die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes ist eine reversible Gleichgewichtsreaktion, deren Bildungskonstante zwischen  $10^5$  und  $10^{11}$   $L \cdot mol^{-1}$  liegt [SCHOEMAKER, 1984]. Die Gesamtbindungsstärke resultiert aus Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen sowie Van-der-Waal-Kräften zwischen den komplementären tertiären Strukturen der beteiligten Aminosäureketten [VAN OSS, 1986]. Der Bindungsvorgang erfolgt dabei entweder nach einem starren Schloß-Schlüssel-Prinzip [AMIT, 1986] oder unter Konformationsänderungen von Antigen und Antikörper (induced fit) [COLMANN, 1987].

Man unterscheidet zwei Arten von Antikörpern: polyklonale (pAK) und monoklonale (mAK). Ein polyklonales Antiserum besteht aus einer Mischung von verschiedenen Antikörpern mit gleicher Spezifität. Die Produktion erfolgt über ein Wirtstier, dem die als Antigen wirkende Substanz injiziert wird. Deren Lymphozyten binden an ein beliebiges Epitop auf dem Antigen und produzieren Antikörper gegen dieses spezifische Epitop. Diese Antikörper können sich in Bezug auf Bindungsstärke, Antigenbindungsregion und Subklassen beträchtlich unterscheiden. Um eine starke Immunantwort und damit eine hohe Konzentration von Antikörpern im Serum zu erhalten, muß diese Injektion mehrfach wiederholt werden. Dieses Verfahren läßt sich ohne großen Aufwand durchführen, allerdings ist die Gewinnung von einheitlichem Serum durch die Lebensdauer des Versuchstieres begrenzt. Für monoklonale Antikörper, die von einem Zellklon identischer Zellen produziert werden, gilt diese Beschränkung nicht. Durch die Fusion von B-Lymphozyten aus der Milz eines immunisierten Tieres mit Myelomzellen<sup>1</sup> erhält man sogenannte "Hybridomzellen", die unbegrenzt teilungsfähig sind und dabei den speziellen Antikörper produzieren, der ursprünglich in der B-Zelle kodiert war [KÖHLER, 1975]. Mit diesen Zellklonen ist es nun möglich, in Zellkulturen über einen langen Zeitraum große Mengen eines identischen monoklonalen Antikörpers zu produzieren. Die Verwendung dieses Antikörpertyps in den verschiedensten Anwendungen hat daher in den letzten Jahren stark zugenommen.

---

<sup>1</sup> Antikörperproduzierende Zelle, die aufgrund einer malignen Erkrankung unkontrolliert eine große Zahl gleichartiger Zellen produziert.

## 2.2.2 Immunanalytische Methoden

Immunassays bestehen aus zwei Teilen: der eigentlichen Immunreaktion und der nachfolgenden Detektion des gebildeten Immunkomplexes. Anhand des Detektionsprinzips werden hier zwei Fälle unterschieden: Reaktionen mit und ohne chemisches Markieren ("Labeln") des Immunkomplexes (Abbildung 3). Bei Assays ohne Markierung wird der gebildete Immunkomplex direkt detektiert, zum Beispiel durch Trübungsmessung. Bei Assays mit Markierung wird einer der beiden Reaktionspartner vor der Reaktion mit radioaktiven Isotopen, Enzymen oder Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt.

Des Weiteren unterscheidet man zwischen homogenen Assays, bei denen die Komplexbildung direkt in der Lösung stattfindet, und heterogenen Assays, bei denen ein Bindungspartner auf einer festen Phase (Trägermaterial, Membran, Latexpartikel) immobilisiert wird und der Immunkomplex aus der Lösung abgetrennt wird.

Ein weiteres Klassifizierungsmerkmal ist die kompetitive oder nicht kompetitive Durchführung des Assays. Bei einem kompetitiven Immunassay konkurriert das Antigen aus der Probe mit einer definierten Menge von zugesetztem gelabeltem Antigen um eine begrenzte Zahl an Antikörperbindungsplätzen. Bei einem nicht kompetitiven Assay liegt ein Überschuss von Antikörpern vor und das Antigen der Probe wird vollständig gebunden.

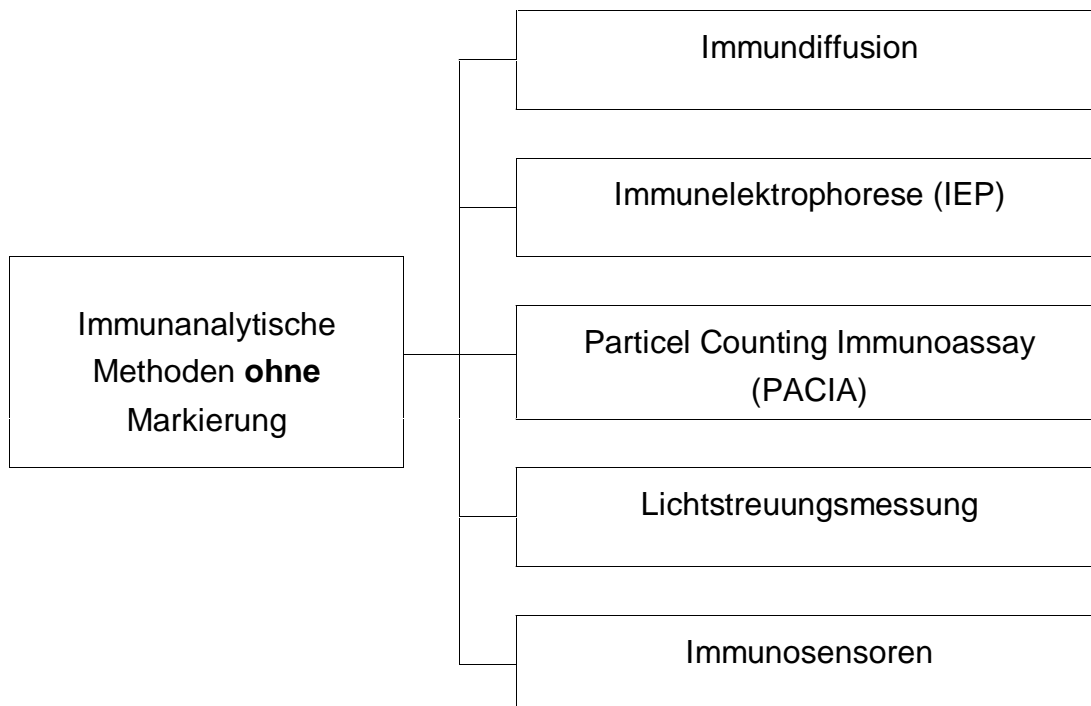


Abb. 3a: Übersicht über die Hauptmethoden der Immunanalytik

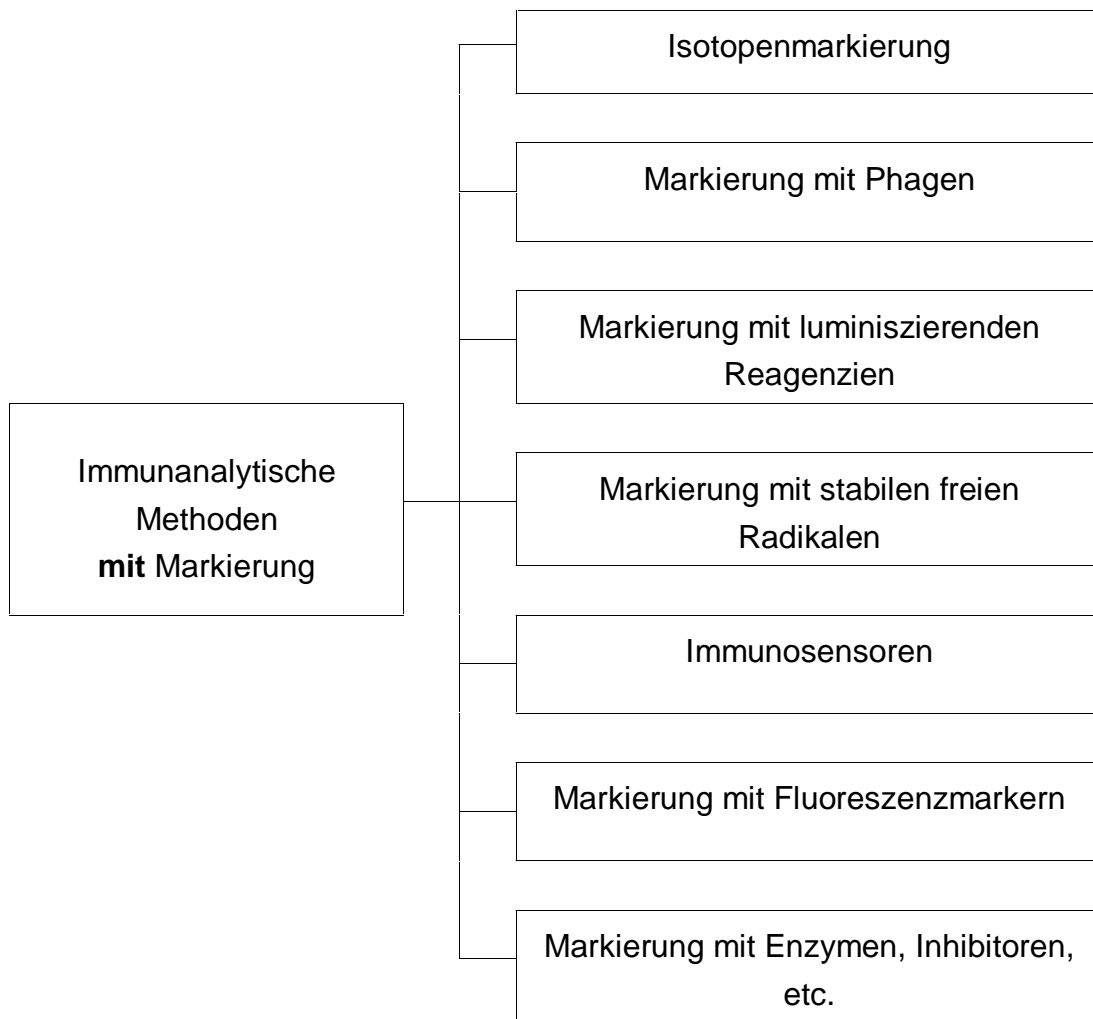


Abb. 3b: Übersicht über die Hauptmethoden der Immunanalytik

Für eine ausführliche Übersicht aller Methoden wird an dieser Stelle auf entsprechende Fachliteratur verwiesen [SCHÜGERL, 1991; MASSEYEFF, 1993; HAGE, 1995]. Im Folgenden werden nur die Methoden kurz erläutert, deren Anwendung weit verbreitet ist.

## 2.2.3 Immunassays ohne Markierung

### 2.2.3.1 Nephelometrische und Turbidimetrische Immunassays

Immunnephelometrie und –turbidimetrie verbinden das physikalische Prinzip der Streulicht-beziehungsweise Lichtabsorptionsmessung mit der quantitativen Bildung eines Immunpräzipitats in homogener Phase [PRICE, 1983; WHICHER, 1983; JOHNSON, 1987]. Die immunchemische Grundlage bildet die von Heidelberger beschriebene Gesetzmäßigkeit, die die Menge an gebildeten Immunpräzipitat (gemessen als Trübung) in Abhängigkeit vom Antigen/Antikörperverhältnis darstellt [HEIDELBERGER, 1935]. Die Messungen müssen immer bei einem Antikörperüberschuß vorgenommen werden, da nur dann ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und Antigenkonzentration besteht. Die Nephelometrie basiert auf der Messung der Intensität des in einem bestimmten Winkel (90° oder beliebiger Vorwärtswinkel)



zum eingestrahlten Licht gestreuten Lichtanteils. Wegen der geringen Intensität des Streulichtes wird als Lichtquelle ein Laser verwendet. In der Turbidimetrie bestimmt man die direkte Intensitätsabnahme des Durchlichts, wozu ein einfaches Photometer den Anforderungen genügt. Aufgrund der Vorteile dieser Methoden, wie zum Beispiel geringe Probenvorbereitung, kurze Analysendauer, gute Automatisierbarkeit, sind für beide Techniken eine Vielzahl von Anwendungen bekannt, zum Teil in Kombination mit der Fließinjektionsanalysetechnik [FOTIOU, 1992; FREITAG, 1991; GARTNER, 1991; MIDDENDORF, 1993; MONTAGNE, 1992; SCHULZE, 1994].

Eine Erhöhung der Sensitivität wurde mit der Entwicklung partikelverstärkter Immunassays erreicht, wobei einer oder beide Immunpartner vorher an größere Teilchen, wie z.B. Latexpartikel, gebunden werden [GRESSNER, 1990]. Durch die große Zunahme des Durchmessers der streuenden Partikel konnte die Empfindlichkeit bis in einen Konzentrationsbereich von  $\mu\text{g/mL}$  Analyt gesenkt werden.

## 2.2.4 Immunassays mit Markierung

### 2.2.4.1 Radioimmunassay

Die Verwendung radioaktiver Markierungen bei Immunassays ist aufgrund ihrer hohen Sensitivität bis zu Konzentrationen im  $\text{pg/mL}$ -Bereich speziell in medizinischen Laboratorien weit verbreitet. Radioimmunassays (RIA) beruhen auf der kompetitiven Reaktion zwischen einer definierten Menge gelabeltem Antigen und dem Antigen der Probe um eine begrenzte Zahl an Antikörperbindungsplätzen [YALOW, 1959]. Die gemessene Radioaktivität des Immunkomplexes ist dann umgekehrt proportional zu der Menge des Antigens in der Probe. Üblicherweise werden diese Assays mit immobilisierten Antikörpern durchgeführt, so daß die überschüssigen Bindungspartner leicht ausgewaschen werden können.

Eine andere Variante sind die sogenannten immunradiometrischen Assays (IRMA) [MILES, 1968]. Hier ist der im Überschuß vorliegende Antikörper selbst gelabelt und reagiert zunächst mit dem gesamten Analyten der Probe. In einem anschließenden heterogenen Schritt werden die überschüssigen Antikörper von an einer festen Phase immobilisierten Antigenen gebunden. Die gemessene Radioaktivität der festen Phase ist dann wiederum umgekehrt proportional zur Analytmenge in der ursprünglichen Probe. Eine Übersicht über die verschiedenen Techniken gibt Najjar [NAJJAR, 1993].

Dennoch sind diese Methoden mit einigen Nachteilen behaftet, wie hohe Geräte- und Reagenzienkosten, Instabilität der Reagenzien und dem Anfall radioaktiver Abfälle, die ein großes Umweltproblem und einen immensen Kostenfaktor darstellen. Daher geht die Tendenz dahin, radioaktive Marker durch Enzyme und Fluoreszenzfarbstoffe zu ersetzen.

#### 2.2.4.2 Enzymimmunassays

Die Verwendung von Enzymen anstelle radioaktiver Isotope als Marker stellte eine der ersten Alternativen zu radioaktiven Immunassays dar und hat eine weite Verbreitung gefunden [ENGVALL, 1971]. Beim Enzymimmunassay (EIA) wird die Bildung des Immunkomplexes über eine daran gekoppelte Enzymreaktion verfolgt, bei der ein leicht detektierbares Produkt gebildet wird. Klassischerweise wird ein farbloses Substrat durch das Enzym in ein farbiges Produkt umgewandelt, das dann spektroskopisch quantifiziert werden kann. Die unzähligen Varianten lassen sich in die beiden Hauptgruppen homogene und heterogene Assays einteilen.

Bei heterogenen EIAs ist ein Separationsschritt nötig, um die ungebundenen Reaktanden von dem Immunkomplex abzutrennen. Das gängigste heterogene EIA ist der nicht kompetitive Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), bei dem die Antikörper im Überschuß auf Agarose-, Polyacrylamid- oder Polystyrolträgern in Mikrotiterplatten immobilisiert werden. Auch hier kann kompetitiv und nicht kompetitiv gearbeitet werden. Nach der Probenaufgabe und Inkubation erfolgt ein Waschschrift und eine weitere Inkubation mit einem enzymgelabelten Antikörper. Nach erneutem Waschen erfolgt die Zugabe des Enzymsubstrats, dessen Reaktionsprodukt anschließend photometrisch, fluorimetrisch oder mittels Chemilumineszenz detektiert werden kann. Die am häufigsten verwendeten Markerenzyme sind alkalische Phosphatase,  $\beta$ -Galactosidase, Glucoseoxidase und Meerrettich-Peroxidase, da diese Enzyme billig und sehr stabil sind und zudem hohe Umsatzraten zeigen [NAKANE, 1974]. Dieses Verfahren eignet sich aber nur für bi- bzw. multivalente Antigene, da eine Bindung zu zwei Antikörpern erfolgen muß. Für monovalente Antigene (z.B. Haptene) müssen kompetitive Assays mit markiertem Antigen durchgeführt werden. Generell sind ELISA-Tests sehr empfindlich und liefern bis in den atto- und pikomolaren Bereich gute Ergebnisse [OELLERICH, 1980]. Bei der Messung von Fermentationsproben führt dies allerdings zu Schwierigkeiten, da um Größenordnungen höhere Produktkonzentrationen vorliegen. Als Folge müssen diese Proben daher meist stark verdünnt werden, was eine zusätzliche Fehlerquelle mit sich bringt. Eine Kopplung der EIAs mit Fließinjektionsanalyssystemen kann dieses Problem minimieren, da automatische und daher besser reproduzierbare Verdünnungsroutinen etabliert werden können [NILSSON, 1991; 1993].

Die meisten homogenen EIAs sind kompetitive Assays und basieren auf der Modulation der Aktivität des Markerenzym (Abnahme oder Zunahme) durch die Bildung des Immunkomplexes. Die etablierteste Technik ist die EMIT (enzyme-multiplied immunoassay technique), bei der enzymgelabelte Antigene verwendet werden, deren Enzymaktivität durch die Bindung an den Antikörper und die daraus resultierende sterische Hinderung vermindert wird. Dieses Verfahren findet besonders bei der Konzentrationsbestimmung kleiner Antigene Anwendung, z.B. Drogen und Hormone.

### 2.2.4.3 Fluoreszenzimmunassays

Bei Fluoreszenzimmunassays (FIIA) kann die Markierung einerseits durch ein Enzym erfolgen, das ein Fluorogen in ein fluoreszierendes Molekül umsetzt [BURD, 1981]. Andererseits kann einer der beiden Reaktionspartner mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Der am häufigsten eingesetzte Marker ist FITC (Fluorescein Isothiocyanat), welcher sich durch eine gute Langzeitstabilität, hohe Lichtausbeute, leicht meßbare Exzitations- und Emissionswellenlänge (Ex. 495, Em. 515 nm) und durch seine Eigenschaft, die Immunreaktion nicht zu beeinflussen, auszeichnet [NAKAMURA, 1984; LIDDELL, 1995]. Eine weitere Möglichkeit ist die Messung der Eigenfluoreszenz des Zielanalyten (Protein), wenn dieser nach der Immunkomplexbildung an einer stationären Phase wieder eluiert wird [BEYER, 1995; REINECKE, 1997]. Einige FIIA-Systeme erreichen inzwischen Sensitivitäten, die mit denen der RIAs vergleichbar sind, so daß Analyte in Konzentrationen bis  $10^{-15}$  mol/L bestimmt werden können. Als Störquelle kann hier natürliche Eigenfluoreszenz anderer biologischer Substanzen auftreten, zum Beispiel von Proteinen, NAD(P)H, Tryptophan und Flavinen, die als Bestandteile im Blut, Serum oder Fermentationsmedium vorkommen [LINDEMANN, 1998].

Heterogene Fluoreszenzimmunassays funktionieren analog zu den heterogenen EIAs [HEMMILÄ, 1985]. Die markierten Probenantigene reagieren mit den immobilisierten Antikörpern und die nicht gebundenen Probenbestandteile werden ausgewaschen. In einem anschließenden Elutionsschritt werden die Antigene wieder freigesetzt und die Fluoreszenz im Eluat detektiert. Dieser Assaytyp kann auch kompetitiv durchgeführt werden.

Homogene Fluoreszenzassays sind im allgemeinen nicht so sensitiv wie heterogene, da Verunreinigungen zu Störungen des Fluoreszenzsignals führen können. Daher sind hochspezifische Antikörper, hochreine markierte Antigene und ein entsprechender experimenteller Aufbau erforderlich [NAKAMURA, 1992]. Homogene FIIAs sind fast ausschließlich kompetitive Assays, wobei durch die Immunreaktion entweder die Fluoreszenz verstärkt (enhancement Assay) oder verringert wird (quenching Assay). Beispielsweise kann die Bildung des Immunkomplexes die zur Detektion gekoppelte Enzymreaktion unterdrücken [KELLY, 1982].

Eine weitere interessante Variante ist der Fluoreszenztransfer-Immunassay (FETIA) [MORRISON, 1988]. Hierbei werden zwei Fluorophore als Donor/Akzeptorpaar verwendet, z.B. FITC und TMRITC (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat). Das vom FITC emittierte Fluoreszenzlicht dient als Exzitationslicht des TMRITC. Die Stärke dieses Effektes nimmt mit der Abnahme des Abstandes der Moleküle zu. Gemessen wird entweder die Intensitätsabnahme des vom FITC emittierten Lichtes oder die Intensitätszunahme des vom TMRITC emittierten Lichtes.

## 2.2.5 Immunsensoren

Immunsensoren bilden eine Untergruppe der Biosensoren. Diese bestehen aus zwei Bauelementen: einem biologischen Erkennungssystem, das gleichzeitig auch Signalgeber ist, und einem physikalischen Meßwandler (Transducer). Meist stehen die biologische und physikalische Komponente direkt miteinander in Kontakt [FREITAG, 1992]. Eine Einteilung erfolgt nach der Art des eingesetzten Transducers: Elektrochemische, optische, amperometrische und piezoelektrische Systeme sowie Thermistoren und Feldeffekttransistoren sind bekannt [SCHEPER, 1991; SCHÜGERL, 1991; NAKAMURA, 1992; SCHMID, 1993]. Die Einsatzgebiete sind: Umweltanalytik, Lebensmittelüberwachung, klinische und biotechnologische Anwendungen.

Eine sehr rasante Entwicklung findet zur Zeit im Bereich der SPR (Surface Plasmon Resonance) statt [HALL, 1988; MOON 1988]. Bei diesem Meßprinzip macht man sich evaneszierende Wellen<sup>2</sup> bei der Totalreflexion zunutze. Der Transducer besteht hier aus einer Glasoberfläche, auf die ein dünner Metallfilm (meist Gold oder Silber) aufgebracht ist. Über den Resonanzwinkel und die Intensität des reflektierten Lichtes kann so der Bindungszustand der auf der Oberfläche immobilisierten Antikörper oder Antigene bestimmt werden. Die Assays werden miniaturisiert auf einem Chip durchgeführt, wodurch sich auch die Möglichkeit einer Mehrkanal-Messung ergibt.

Zunächst wurde das Verfahren überwiegend zur Untersuchung thermodynamischer und kinetischer Konstanten biomolekularer Interaktionen genutzt [LUNDSTRÖM, 1994]. Inzwischen sind aber auch Assays zur direkten Quantifizierung von Analyten aus Fermentations- oder anderen Realproben entwickelt worden, wobei auch kompetitive oder Sandwich-ELISA-Verfahren zum Einsatz kommen [SEVERS, 1993; BRECHT, 1997]. Während sich frühe Arbeiten ausschließlich auf Antikörper-Antigen- und Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen konzentrierten, finden in neuen Verfahren auch Protein-Protein-, Protein-DNA- und DNA-DNA-Wechselwirkungen Anwendung sowie Untersuchungen zu Konformationsänderungen immobilisierter Proteine [MERNAGH, 1998; SOTA, 1998]. Neue Anwendungen ergeben sich dadurch in den Bereichen Epitop-Mapping, Affinitätsmessung und molekulare Erkennung sowie in der Signaltransduktion, Genregulierung und Proteinfaltung [TRUTNAU, 1998; HOMOLA, 1999]. Auf diesem Meßprinzip basierende Meßgeräte sind seit einigen Jahren von verschiedenen Herstellern kommerziell erhältlich (Affinity, BIAcore, BioTul, Texas Instruments, Xantec), und die Zahl neuer Applikationen steigt stetig [HOMOLA, 1999].

---

<sup>2</sup> Elektromagnetisches Feld, das in der Grenzschicht von einfallendem und reflektiertem Licht senkrecht zur optischen Achse im optisch dünneren Material auftritt.

## 2.2.6 FIA-Immunassays in der Bioprozeßkontrolle

Die Kombination der Fließinjektionsanalytik (FIA) mit verschiedenen Arten von Immunassays verbindet die Selektivität und Sensitivität von Antikörpern mit der Schnelligkeit und einfachen Automatisierbarkeit der Fließinjektionstechnik. Dadurch entstehen Verfahren, welche sich hervorragend zur schnellen und kontinuierlichen On-line-Detektion hochmolekularer Komponenten in Bioprozessen eignen. Die meisten Systeme sind aus bekannten Off-line-Methoden entwickelt worden, wobei wesentlich mehr heterogene als homogene Assays Verwendung finden. Im Folgenden wird ein kleiner Überblick über die realisierten Applikationen gegeben. Detailliertere Informationen finden sich in entsprechenden Übersichtsartikeln [MATTHIASSEN, 1992; PUCHADES, 1992; 1996; FINTSCHENKO, 1998].

Homogene Assays, die zur Prozeßüberwachung eingesetzt werden, sind meist turbidimetrischer Art. Sie werden üblicherweise im Stopped-Flow-Modus durchgeführt, um eine ausreichende Immun-Präzipitation zu erreichen. Mit diesem Verfahren lassen sich bei Zykluszeiten von 1-6 Minuten relativ einfach hohe Meßfrequenzen realisieren. Dieses System ist bereits für zahlreiche On-line-Bestimmungen an Bioprozessen eingesetzt worden: Pullanase Isoenzym aus Bakterien (1-100 mg/L), AT III (0-30 mg/L), Maus-IgG (10-900 mg/L) und rt-PA (im Bereich mg/L) [FREITAG 1991; 1991b; DEGELAU, 1992; MIDDENDORF, 1993].

Eine vollständige Automatisierung der Standard-ELISA-Technik kombiniert dessen Vorteile in Bezug auf die hohe Sensibilität mit der einfachen und dynamischen Durchführung der FIA. Ein solcher Flow-ELISA ist sowohl für die Bioprozeßbeobachtung als auch in Aufreinigungsprozessen interessant. Anwendungen erfolgten bereits in beiden Bereichen, zum Beispiel zur Detektion von  $\alpha$ -Amylase (0-1000 mg/L) [MATTHIASSEN, 1992; NILSSON, 1993]. Das gleiche Prinzip wurde auch bei einem kalorimetrischen Sandwich-Assay mit immobilisiertem Protein A zur Messung von IgG in Kultivierungsproben mit guten Ergebnissen etabliert [BRANDES, 1993; SCHEPER, 1993; LAMMERS, 1996].

Ein kompetitives heterogenes Assay mit FITC-gelabeltem Antigen wurde zur Bestimmung von AT III und Pullanase eingesetzt, wobei hier die Fluoreszenz des Eluats zur Konzentrationsbestimmung gemessen worden ist [FREITAG, 1989; MIDDENDORF, 1993].

Ein nicht-kompetitives heterogenes Immunassay, bei dem das Antigen quantitativ an im Überschuß immobilisierte Antikörper bindet, wird in Kapitel 3 näher beschrieben. Die Detektion erfolgt anhand der Proteineigenfluoreszenz, ohne daß weitere Markierungen vorgenommen werden müssen. Dieses Verfahren wurde bereits zur Bestimmung von rt-PA, AT III und Maus-IgG in komplexen Fermentationsmedien (Konzentrationen von 1-1000 mg/L) und während eines Aufreinigungsprozesses verwendet [REINECKE, 1993; SCHULZE, 1994; BEYER, 1995; HAGEDORN, 1998].

Ein weiteres Verfahren beruht auf dem physikalischen Prinzip, daß die Kapazität eines Kondensators von der Dicke und dem dielektrischen Verhalten der Schicht auf der Metalloberfläche des Kondensators abhängig ist. Um dies auszunutzen, werden die Antikörper auf der Tantaloxid-Oberfläche einer Durchflußzelle immobilisiert. Erfolgt nun die Bildung des Immunkomplexes, so verändert sich die elektrische Kapazität, die über eine Impedanz-Messung zugänglich ist. Dieses Verfahren wurde bereits zur Beobachtung einer IgG-Kultivierung (2-200 µg/mL) eingesetzt [GEBBERT, 1992; 1994].

Eine weiterer Biosensor nutzt das physikalische Prinzip der evaneszierenden Wellen, deren Änderungen mittels eines Gitterkopplers detektiert werden. Die Bildung des Immunkomplexes führt zu einer Änderung des Einkopplungswinkels, über den der effektive Refraktionsindex berechnet werden kann. Das ganze System ist auf einem Chip untergebracht und direkt in das Fließsystem implementiert. Dieses in Stopped-Flow-Technik durchgeführte Verfahren wurde zur Messung der IgG-Konzentration in einem Bioprozeß in einem Detektionsbereich von 10-150 µg/mL erfolgreich genutzt [POLZIUS, 1993].

## 2.3 Untersucher Analyt

### 2.3.1 Faktor VIIa

Der Prozeß der Blutgerinnung unterliegt einem komplexen Mechanismus, da zum einen bei Verletzungen die Gerinnung schnell eintreten, aber andererseits auf den Verletzungsbereich beschränkt bleiben muß, um keine Thrombose auszulösen. Blutgerinnsel bilden sich durch eine Serie von Zymogenaktivierungen. Im Verlauf einer enzymatischen Kaskade katalysiert jeweils die aktivierte Form eines Gerinnungsfaktors die Aktivierung des nächsten, wobei kleine Mengen ausreichen, um die Reaktionsfolge in Gang zu setzen. Durch die Vielzahl der Schritte wird eine große Verstärkung erreicht, die eine schnelle Antwort auf Verletzungen gewährleistet. Man unterscheidet zwei unterschiedliche Systeme: Das intravaskuläre System, das durch Kontakt mit anormalen Oberflächenstrukturen, wie sie durch Verletzungen verursacht werden, aktiviert wird, und das extravaskuläre System, welches durch Substanzen, die das Gewebe in Folge von Verletzungen freisetzt, in Gang gesetzt wird. Es führt zur Aktivierung von Faktor VII und der Freisetzung eines als Gewebefaktor bezeichneten Lipoproteins aus den Blutgefäßen (Abbildung 4). Schließlich münden beide Systeme in eine gemeinsame Folge von Schritten, die letztlich zur Bildung eines Fibringerinnsels führen. Beide Systeme sind für eine vollständige Gerinnung notwendig und beeinflussen sich *in vitro* gegenseitig, so daß das Fehlen einer Proteinkomponente in einem der beiden Systeme bereits zu Gerinnungsanomalien führt [Stryer, 1996].

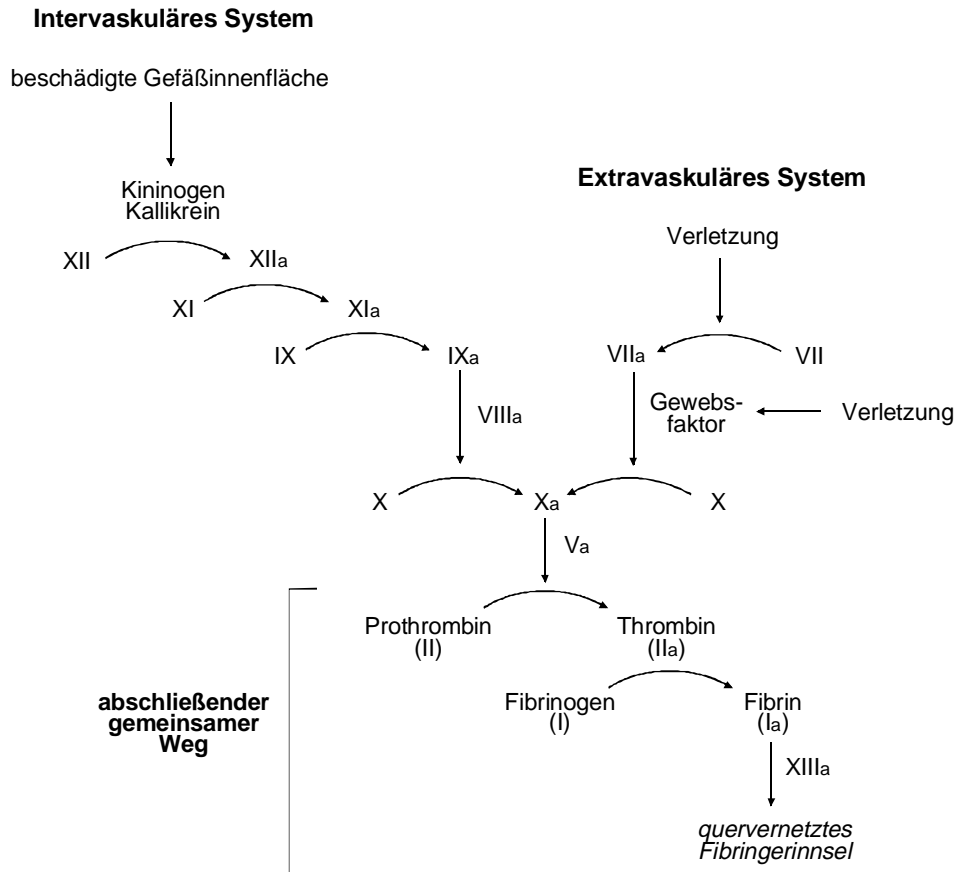


Abb. 4: Die Blutgerinnungskaskade mit intra- und extravaskulärem System [STRYER, 1996]

Einer der bekanntesten Defekte ist die Hämophilie A (klassische Hämophilie), die als geschlechtsgebundenes, rezessives Merkmal vererbt wird und nur bei Männern auftritt. Hier fehlt entweder der Faktor VIII des intravaskulären Systems ganz oder besitzt eine deutlich verminderte Aktivität. Die weniger verbreitete Hämophilie B ist auf einen Mangel oder das vollständige Fehlen von Faktor IX zurückzuführen. Die Folgen sind starke, nur schwer zu stoppende Blutungen selbst bei kleinen Verletzungen, die auch das Gewebe oder Gelenke betreffen können. Gefahr besteht für diese Patienten besonders bei chirurgischen Eingriffen und Unfällen, bei denen starke, unkontrollierbare Blutungen auftreten können. Die Behandlung erfolgt durch die intravenöse Gabe des entsprechenden Gerinnungsfaktors. Gerinnungsfaktoren wurden früher aus menschlichem Plasma gewonnen, aufgrund des hohen Infektionsrisikos (HIV, Hepatitis) nimmt aber gegenwärtig der Anteil der durch rekombinante (gentechnisch veränderte) Organismen hergestellten Präparate stark zu. Allerdings entwickeln etwa 10 Prozent aller Hämophilie-Patienten im Laufe der Behandlung Antikörper gegen Faktor VIII oder IX und werden somit gegen diese Therapieform resistent [Novo Nordisk, 1999a; b].

Die dadurch auftretenden Komplikationen können durch die Verabreichung von Gerinnungsfaktor VII behoben werden, der die Blutgerinnung auf einem von Faktor VIII und IX unabhängigen Weg auslösen kann. Faktor VII bildet dabei mit dem am Ort der Gewebeverletzung freigesetzten Gewebethromboplastin (Gewebsfaktor) einen Komplex, der über das extravaskuläre System zu einer lokalen Aktivierung der Hämostase führt und so die Blutung stoppt [Meili, 1995]. Die Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) stellt rekombinanten aktivierten Faktor VII mittels einer genetisch veränderten Säugerzelllinie her und vertreibt diesen unter dem Handelsnamen NovoSeven® [Novo Nordisk, 1999c].

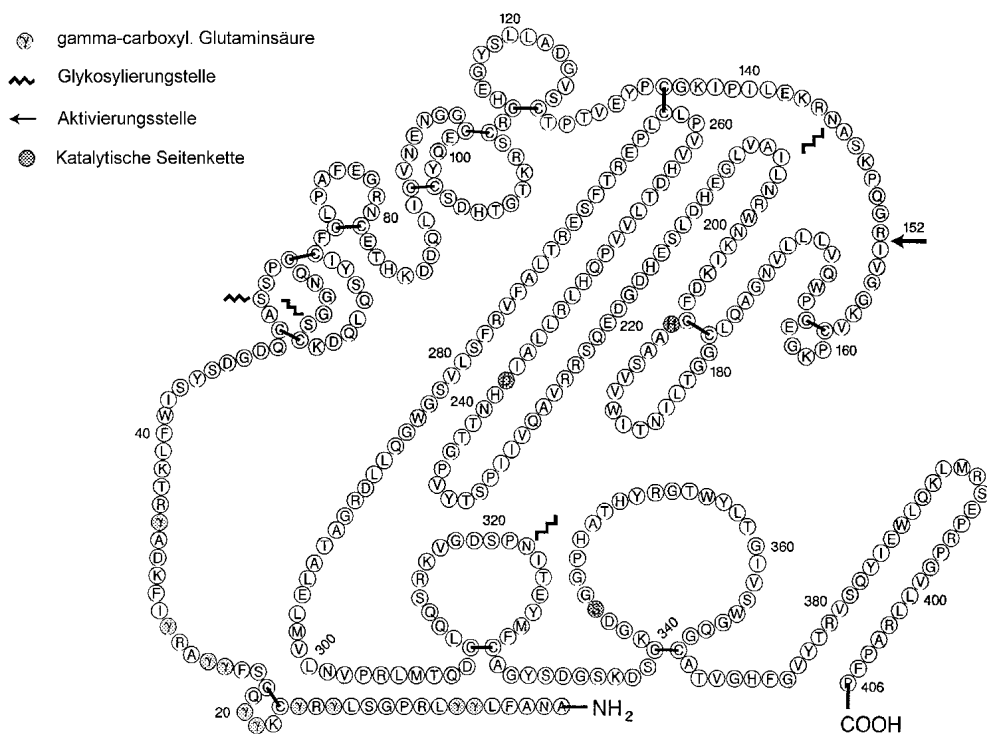


Abb. 5: Primärstruktur von Faktor VII



Humaner Faktor VII ist ein einsträngiges Glykoprotein, welches im Plasma in einer Konzentration von etwa 0.4 µg/mL vorkommt [TAKASE, 1988]. Es wird in der Leber synthetisiert, wobei die post-translatorische  $\gamma$ -Carboxylierung von 10 Glutaminsäuren in der aminoterminalen Region des Proteins, Vitamin K abhängig ist. Dieser Bereich des Moleküls ist für die spätere Komplexbildung mit dem phospholipidischen Gewebefaktor notwendig. Faktor VII besteht aus 406 Aminosäuren mit 50 kDa und wird durch die Spaltung der Arg-152/Ile-153-Bindung in seine aktivierte Form Faktor VIIa, einer Serin-Protease, überführt (siehe Abbildung 5). Der aktivierte Faktor besteht aus einem aminoterminalen leichten Strang von 152 Aminosäuren, in dem die  $\gamma$ -carboxylierten Glutaminsäuren liegen (Gla-Domäne), und einem carboxylterminalen schweren Strang mit 254 Aminosäuren, der das katalytische Zentrum der Serin-Protease enthält. Beide Stränge werden durch eine einfache Disulfidbrücke in den Positionen Cys-145 und Cys-262 zusammengehalten [HAGEN, 1986]. Das Molekül selbst hat nur sehr geringe protolytische Aktivität. Erst nach der Komplexbildung mit dem Gewebefaktor beginnt in der Gegenwart von Calcium, das an die  $\gamma$ -carboxylierten Gruppen der Gla-Domäne des Faktor VII bindet, die Aktivierung von Faktor X und IX [ZUR, 1982]. Eine Aktivierung kann aber auch durch die Faktoren IXa, Xa, XIIa und Thrombin erfolgen [CERSKUS, 1985].

Faktor VII besitzt vier Kohlenhydratseitenketten, von denen jeweils zwei *O*- und zwei *N*-glykosidisch gebunden sind. Die beiden *O*-glykosidisch gebundenen Seitenketten unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung. An Ser 52 werden zu gleichen Teilen drei verschiedene Kohlenhydratketten gefunden: Glucose, das Disaccharid Glucose-Xylose und das Trisaccharid Xylose-Xylose-Glucose. Ser 60 dagegen ist mit Fructose verbunden [BJOERN, 1991]. Die *N*-glykosidisch gebundenen Seitenketten an Asn 145 und Asn 322 bestehen aus Fructose, Mannose, Galactose, N-Acetylglucosamin und Salinsäure [THIM, 1988]. Unterschiede in der biologischen Aktivität zwischen aus humanem Plasma und rekombinant hergestelltem Faktor VII sind nicht feststellbar, obwohl geringfügige Unterschiede in der Kohlenhydratzusammensetzung der *N*-glykosidischen Seitenkette vorliegen. Zudem sind beim rekombinanten Faktor VII nur 9 statt 10 Glutaminsäuren  $\gamma$ -carboxyliert [THIM, 1988].

### 2.3.2 Methoden zur Faktor VII Bestimmung

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß eine erhöhte Faktor VII-Gerinnungsaktivität direkt mit dem zunehmenden Risiko, an einem koronaren oder koronal-arteriellen Herzleiden zu erkranken, in Verbindung steht [MEADE, 1986; HOFFMANN, 1989; BROADHURST, 1990]. Dadurch hat das Interesse an der Bestimmung der Faktor VII-Aktivität aus Plasma- und Serumproben stark zugenommen. Dabei treten allerdings zahlreiche Probleme auf: Faktor VII kann in vielfältigen Formen im Plasma vorliegen (einsträngig, aktiviert zweisträngig, beide Formen jeweils als Komplex mit Gewebefaktor), was großen Einfluß auf dessen Gerinnungsaktivität hat und so aussagekräftige Messungen erschwert.

Zudem kann Faktor VII durch die Anwesenheit anderer Gerinnungsfaktoren, geladener Oberflächen (Glasgefäße) sowie durch Kälte autoaktiviert werden, was eine standardisierte Probenhandhabung erschwert [PEDERSEN, 1989]. Eine weitere Problematik liegt darin, daß das Protein in normalen Plasmaproben nur als Spur vorkommt. Zur Messung der Aktivität wurden einige Immunassays entwickelt, zum Beispiel ein Antikörper-Neutralisationsassay [MARIANI, 1981], sowie Radioimmunassays (RIA) [MIKAMI, 1986; FAIR, 1983] unter der Verwendung von mono- und polyklonalen Antikörpern. Ein one-step, monoklonales immunradio-metrisches Assay, das auch bei sehr geringen Aktivitäten gute Ergebnisse liefert, ist ebenfalls beschrieben [TAKASE, 1988]. Das einzige kommerziell erhältliche Assay für die Quantifizierung von Faktor VII in Plasmaproben ist ein ELISA-Test, der von der Firma Stago (Asnières, Frankreich) vertrieben wird [BOYER, 1986; KITCHEN, 1992]. Der entscheidende Bestandteil bei diesem Assay ist das zur Kalibration erforderliche "Normplasma" mit allen normalen Blutbestandteilen außer Faktor VII, das die Firma als Standard vertreibt.

Des Weiteren sind noch einige funktionale Assays bekannt, bei denen die Faktor VII-Aktivität durch eine an Faktor X gekoppelte Reaktion gemessen wird. Faktor VII wird durch die Zugabe von Gewebefaktor und Calcium zunächst selbst aktiviert und aktiviert anschließend Faktor X. Der gebildete Faktor Xa spaltet dann ein gekoppeltes chromogenes Substrat (S-2222), das photometrisch einfach detektiert werden kann [SELIGSON, 1978]. Diese Methode dient zur Messung der Gesamtaktivität unabhängig von dem Aktivierungsgrad des Proteins in der Probe. Im Gegensatz dazu messen Gerinnungsassays, bei denen die Zeit bis zur abgeschlossenen Gerinnung Rückschlüsse auf die Aktivität des Proteins zuläßt, nur die Menge des bereits in der Probe aktiven Faktors [BROZE, 1982]. Eine Kombination der beiden Verfahren erlaubt so die Abschätzung des Aktivierungsgrades des Faktor VII in der Probe [HAYES, 1993].

Die anfänglich angesprochenen Schwierigkeiten treten bei der Messung von Faktor VIIa in Fermentationsproben nur vermindert oder gar nicht auf. Die anfallenden Produktkonzentrationen sind deutlich höher als im Plasma und ihre Bestimmung daher nicht so störungsanfällig. Zudem treten die Probleme der Autoaktivierung nicht auf, da das Protein bereits in der zweisträngigen aktivierten Form exprimiert wird. Für die routinemäßige quantitative Bestimmung der Faktor VII- und Faktor VIIa-Konzentration in Plasma- oder Fermentationsproben findet ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit-System Anwendung. Die Firma DAKO (Glostrup, Dänemark) vertreibt es in enger Kooperation mit der Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark), die die Antikörper und Standards produziert. Das Antigen bindet dabei zunächst an auf einer Polystyrenoerfläche immobilisierte Antikörper, um dann in einem zweiten Inkubationsschritt mit einem weiteren, mit Peroxidase markierten, monoklonalen Antikörper ein Sandwich zu bilden. Als Substrat dient das farblose ortho-Phenylen-diamin, welches zu 2,2-Diamino-Azobenzen umgesetzt wird, das bei 490 nm vermessen werden kann [LUND-HANSEN, 1989]. Dieser Assay ist für einen Konzentrationsbereich von ca. 5-40 µg/L Faktor (VII+VIIa) geeignet [DAKO, 1994].

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Heterogener Elutionsimmunassay

#### 3.1.1 Prinzip des Elutionsassays

In Kapitel 2.2.6 wurde bereits kurz der in dieser Arbeit für alle Untersuchungen verwendete heterogene Immunassay erwähnt. Das System besteht aus einem in ein FIA-System implementierten nicht-kompetitiven Immunassay, bei dem der Antikörper im Überschuß auf einem festen Trägermaterial immobilisiert wird [REINECKE, 1993; SCHULZE, 1994; BEYER, 1995]. Die Immobilisierung des Antikörpers ermöglicht eine leichte Abtrennung des gebildeten Immunkomplexes von den anderen Bestandteilen der Probe, die mit dem Trägerpufferstrom ausgewaschen werden. Zudem zeigen immobilisierte Antikörper eine beschleunigte Bindungskinetik, was auf das erhöhte Verhältnis von Oberfläche/Volumen zurückzuführen ist [PUCHADES, 1996].

Als Trägermaterialien sind Gele, Cellulose, Polymere und Harze ebenso möglich wie Glas- kugeln oder Membranen. Eine kovalente Bindung der Antikörper ist sinnvoll, um eine möglichst stabile Bindung zu erhalten. Für diesen Assay ist Bromcyan-aktivierte Sepharose B (Sigma; Deisenhofen, Deutschland) am besten geeignet, da hiermit die höchste Aktivitätsausbeute erzielt werden kann [REINECKE, 1993]. Das Durchflußverhalten des Materials ist für die Fließinjektionsanalyse ebenfalls gut geeignet, da es nicht zu starker Kanal- oder Blasenbildung neigt und somit keine Druckschwankungen im System entstehen. Die Antikörper werden im Überschuß auf dem Trägermaterial immobilisiert, um eine quantitative Bindung der Antigene aus der Probe zu erzielen. Verbleibende freie Bindungsstellen auf der Trägeroberfläche werden mit Ethanolamin blockiert (siehe Vorschrift im Anhang), um unspezifische Bindungen von Proteinen zu verhindern. Bei der Immobilisierung der Antikörper muß man berücksichtigen, daß nur 5-25 Prozent der eingesetzten Antikörper ihre biologische Aktivität behalten [HEARN, 1990; WIMALASENA, 1991]. Gründe für diesen Aktivitätsverlust können sein:

- Sterische Blockade des aktiven Zentrums der Antikörper durch die Trägeroberfläche;
- Mehrfachbindung der Antikörper an die Trägeroberfläche, die zu einer Verzerrung des aktiven Zentrums führen;
- Sterische Blockade des aktiven Zentrums durch zu dicht gebundene Antikörper.

Zudem muß berücksichtigt werden, daß im Verlauf der Messungen ein Teil der Aktivität durch Denaturierung und Elution der gebundenen Antikörper verloren gehen kann.

Das Trägermaterial mit den immobilisierten Antikörpern wird dann in einer Durchflußkartusche (1 mL, MoBiTec (Göttingen, Deutschland)) in den Trägerstrom des FIA-Systems implementiert. In der Kartusche erfolgt dann die quantitative Bindung des in der Probe enthaltenen

Antigens durch die Antikörper. Weitere Probenbestandteile werden in einem ausreichend langen Spülschritt ausgewaschen und so der Zielanalyt vollständig isoliert.

In einem nun folgenden Elutionsschritt wird die Antikörper/Antigen-Bindung gelöst und das Antigen mit dem Elutionspuffer ausgespült (Abbildung 6). Die Elution sollte möglichst schnell und vollständig erfolgen. Dadurch bleibt einerseits die Aktivität der Antikörper erhalten und andererseits werden keine Analyten mit in den nächsten Analysenzyklus verschleppt. Letzteres würde mit jeder Messung zu einer Verringerung der Kapazität der Kartusche führen.

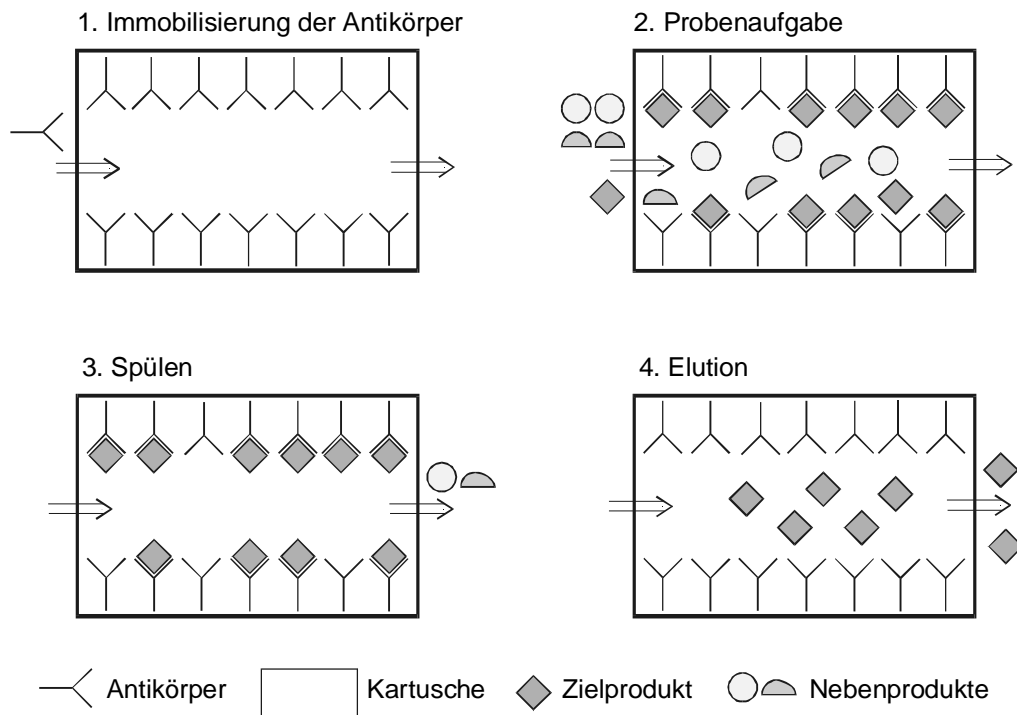


Abb. 6: Schematisches Funktionsprinzip des heterogenen Immunassays

Hinter der Kartusche wird der eluierte Analyt direkt über die Proteinfluoreszenz detektiert. Die Messung erfolgt bei einer Exzitationswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm, was dem Fluoreszenzmaximum von Tryptophan entspricht. Nach einem folgenden kurzen Equilibrierungsschritt ist bereits der nächste Meßzyklus möglich.

Der bereits erwähnte Elutionsschritt stellt bei diesem Assay den schwierigsten Punkt dar: Zum einen soll die Elution vollständig und schnell erfolgen, zum anderen sollen die Antikörper möglichst wenig geschädigt oder abgelöst werden. Praktisch kann die Elution über die Änderung verschiedener Puffereigenschaften durchgeführt werden [PHARMACIA, 1996]:

- **pH-Wert:** Ein Sprung des pH-Wertes ändert die Ladungsverhältnisse sowohl der Antikörper als auch des gebundenen Proteins. Diese Änderung kann die Bindungsstellen direkt betreffen und so die Bindung lösen oder indirekt die Bindungsaffinität über eine Konformationsänderung beeinflussen. Die Elution ist sowohl mit einem Sprung zu einem hohen (12.0) oder niedrigen (2.0-3.0) pH-Wert möglich [REINECKE, 1993]. Die chemische Stabilität der Matrix, des Liganden und des Analyten sind hier entscheidend für den verwendbaren pH-Bereich.

- **Ionenstärke:** Die Elution durch hohe Salzkonzentrationen führt zu ähnlichen Veränderungen in Bezug auf die Ladungsverhältnisse der Bindungspartner. Am gängigsten ist die Verwendung von NaCl-Konzentrationen bis zu 1.0 M. Bei Interaktionen mit hoher Affinität ist oft ein chaotropes Salz (z.B.  $I^-$ ,  $SCN^-$  oder  $CCl_3COO^-$ ) in hohen Konzentrationen (bis zu 3 M) erforderlich, um die Bindung zu lösen.
- **Kompetitive Reaktion:** Selektive Elution kann auch durch eine Substanz, die um die Bindungsstellen konkurriert, durchgeführt werden. Diese Methode ist sowohl für die Antigen- als auch die Antikörperbindungsstellen möglich.
- **Verminderte Polarität:** Eluenten mit geringerer Polarität erhöhen die Desorption und führen selten zu einer Inaktivierung der eluierten Substanz. Hier finden Dioxane (bis 10 %) und Ethylenglykol (bis 50 %) Anwendung.
- **Denaturierungsmethode:** Die irreversible Denaturierung des Antigens durch hohe Konzentrationen von chaotropen Salzen, Guanidin-HCl oder Harnstoff führt letztlich in jedem Fall zur Elution. Allerdings ist bei dieser Methode das eluierte Protein nicht mehr aktiv und die Gefahr einer nachhaltigen Schädigung der Antikörper groß.

Ein Screening der verschiedenen Elutions-Methoden ist für jedes Antikörper/Antigen-System erforderlich und bedarf sorgfältiger Optimierung, um ein bestmögliches Analyseergebnis zu erzielen.

### 3.1.2 Systemaufbau

Das verwendete Fließinjektionsanalytensystem wurde im Institut für Technische Chemie entwickelt und gebaut. Es besteht aus folgenden Komponenten (vergleiche Abbildung 7):

- Selektor I (7-Port-Schaltventil), um zwischen dem Träger- und dem Elutionspuffer zu wechseln.
- Injektor (6-Port-Injektionsventil) mit integrierter Probenschleife (50-100  $\mu$ L) zur Aufnahme der Probe in den Trägerstrom.
- Durchflußkartusche (Polypropylen, 1 mL Volumen), in der sich das Trägermaterial mit den immobilisierten Antikörpern befindet. Das Immobilisat wird am Ein- und Ausgang durch auswechselbare Filterfritten mit einem Porendurchmesser von 35  $\mu$ m zurückgehalten.
- Fluoreszenzdetektor mit einer 40  $\mu$ L Durchflußküvette, frei wählbarer Exzitations- und Emissionswellenlänge (hier: 280/340 nm) und einem 0-10 V Ausgang zur Signalübertragung.

- Zwei Peristaltikpumpen mit einstellbarer Flußrate, wobei die zur Probenaufgabe mit circa 0.8 mL/min und die Pufferpumpe mit circa 1.0 mL/min betrieben wird.
- Selektor II (7-Port-Schaltventil), um zwischen verschiedenen Standards und Proben zu wechseln.
- Computer (386SX-16) mit der Software CAFCA (Computer Assisted Flow and Control Analysis), die die verschiedenen Komponenten der Anlage steuert und den mittels einer A/D-Karte digitalisierten Signalverlauf analysiert und speichert [HITZMANN, 1995].

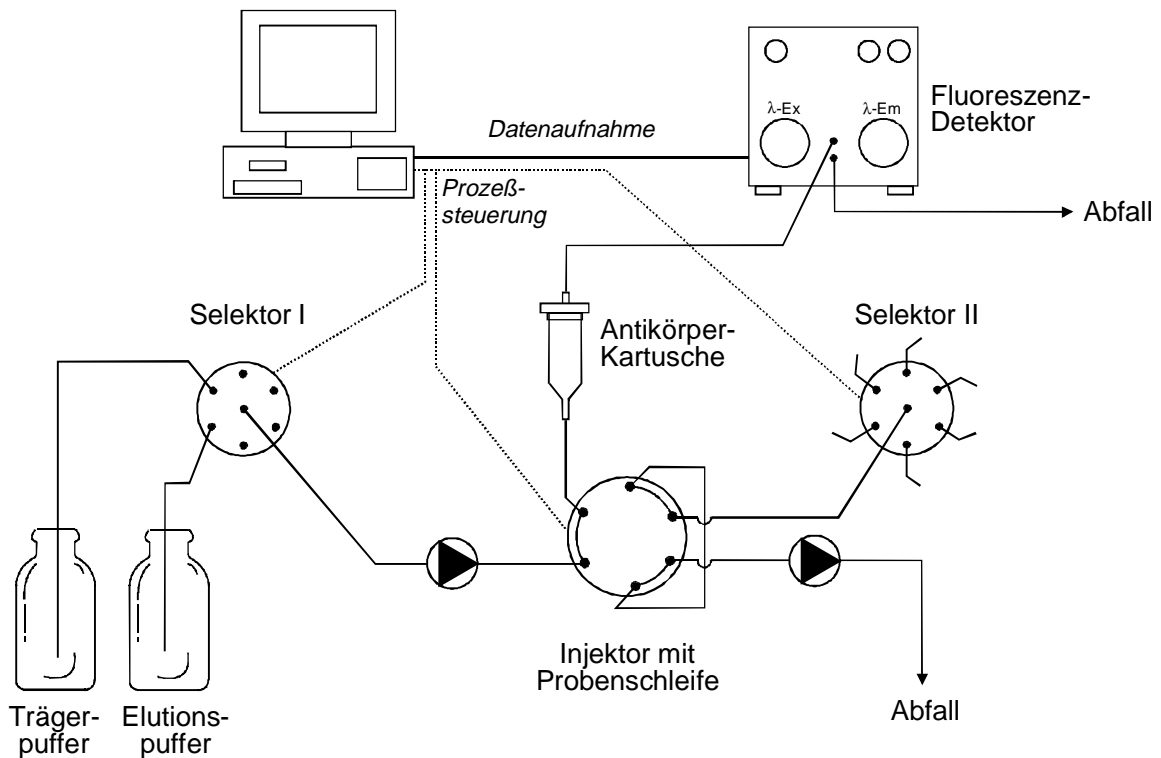


Abb. 7: Schematischer Aufbau der heterogenen Immun-FIA

Alle Verbindungen sind aus Teflonschlauch mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm. Diese gewährleisten eine geringe Dispersion im Schlauchsystem, die aber aufgrund der Durchflußkartusche dennoch einen für ein solches System hohen Wert erreicht [REINECKE, 1993].

Die übrigen Systemparameter, wie Pufferzusammensetzung, Spül- und Elutionszeiten und Integrationsgrenzen bei der Auswertung, sind variabel. Für jedes neue Antikörper/Antigen-System ist eine erneute Optimierung notwendig, um möglichst kurze und effektive Analysenzyklen durchzuführen. So ist es für ein präzises Ergebnis, zum Beispiel bei Realproben mit einem höheren Proteingehalt, erforderlich, den Spülschritt erheblich zu verlängern. Extreme Elutionsbedingungen dagegen erfordern einen verlängerten Equilibrierungsschritt.

### 3.1.3 Signalauswertung

Den typischen Signalverlauf eines Analysenzyklus mit dem heterogenen Immunassay zeigt Abbildung 8. Der Gesamtmeßzyklus kann in zwei Bereiche, den Injektions- und den Elutionsabschnitt, unterteilt werden. Das Signal im ersten Bereich (Waschpeak) entsteht durch die Proteinbestandteile der Probe, zum Beispiel Nebenprodukte und Medienkomponenten, die nicht von den Antikörpern gebunden werden. Da ihr Anteil an der Probe sehr viel größer ist, ist dieser Peak deutlich höher als der zweite Peak (Elutionspeak). Dieser entsteht nach dem Umschalten auf den Elutionspuffer und ist ausschließlich auf die Fluoreszenz des Zielproduktes zurückzuführen.

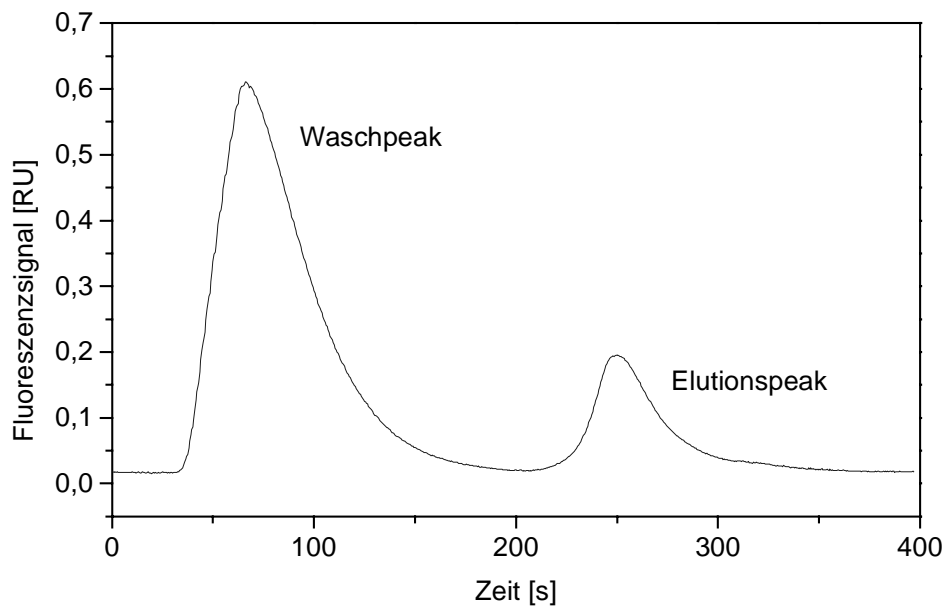


Abb. 8: Typischer Signalverlauf des heterogenen Immunassays

Die Auswertung erfolgt über das Integral der Peakfläche, da dieses im Gegensatz zur Peakhöhe während der Laufzeit des Analysensystems die geringste Anfälligkeit gegenüber Schwankungen der Flußrate zeigt.

Für eine genaue und präzise Auswertung ist es sinnvoll, die Empfindlichkeit des Detektors so zu wählen, daß der für die Auswertung relevante Elutionspeak den Meßbereich möglichst gut ausnutzt. Das führt dazu, daß der Waschpeak bei Proben mit hohen Proteinkonzentrationen den Meßbereich überschreitet. Da er für die Auswertung jedoch keine weitere Rolle spielt, kann dieser Effekt vernachlässigt werden. Die Reproduzierbarkeit der Integrationsgrenzen und -optionen ist durch die Verwendung der Software CAFCA für alle Analysenzyklen einer Meßreihe gewährleistet.

### 3.1.4 Verwendete Antikörper

Die Firma NOVO Nordisk A/S hat für die Entwicklung eines heterogenen Elutionsassays drei verschiedene Typen von Antikörpern gegen Faktor VII aus eigener Entwicklung und Produktion zur Verfügung gestellt. Diese unterscheiden sich bezüglich ihrer Selektivität und Bindungsstärke.

- **mab FVII-4 F9 (F9A2)** ist ein monoklonaler Antikörper, der alle Formen von Faktor VII bindet. Er wird auch in dem in Kapitel 2.3.2 erwähnten kommerziellen ELISA-Kit verwendet.
- **mab FVII (F1A2)** ist ebenfalls ein monoklonaler Antikörper, der aber nur selektiv die korrekt  $\gamma$ -carboxylierte Form von Faktor VII bindet. Dieser Antikörper ist Calcium-abhängig und benötigt 5-10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in den verwendeten Puffern.
- **mab FVII-4 F7 (F7A2)** ist ein weiterer monoklonaler Antikörper, der alle Formen von Faktor VII bindet. Er unterscheidet sich von mab FVII-4 F9 (F9A2) durch eine verringerte Bindungsaffinität.

Alle drei Antikörper werden auf ihre Verwendbarkeit in dem heterogenen Elutionsassay untersucht und die Systemparameter optimiert.



## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Voruntersuchungen mit Faktor VIIa

Um einen funktionierenden Assay für Faktor VIIa zu entwickeln, ist es vorab erforderlich, einige Eigenschaften des Proteins zu untersuchen. Wichtig ist zunächst, die optimale Exzitations- und Emissionswellenlänge des Fluoreszenzmaximums zu bestimmen, um eine möglichst hohe Empfindlichkeit bei der Quantifizierung zu erreichen. Dazu wurde eine Faktor VIIa-Probe (Protein-Konzentration  $10^{-7}$  mol/L) mit einem 2D-Fluoreszenzspektrometer (F4500, Hitachi) in einer Küvette vermessen.

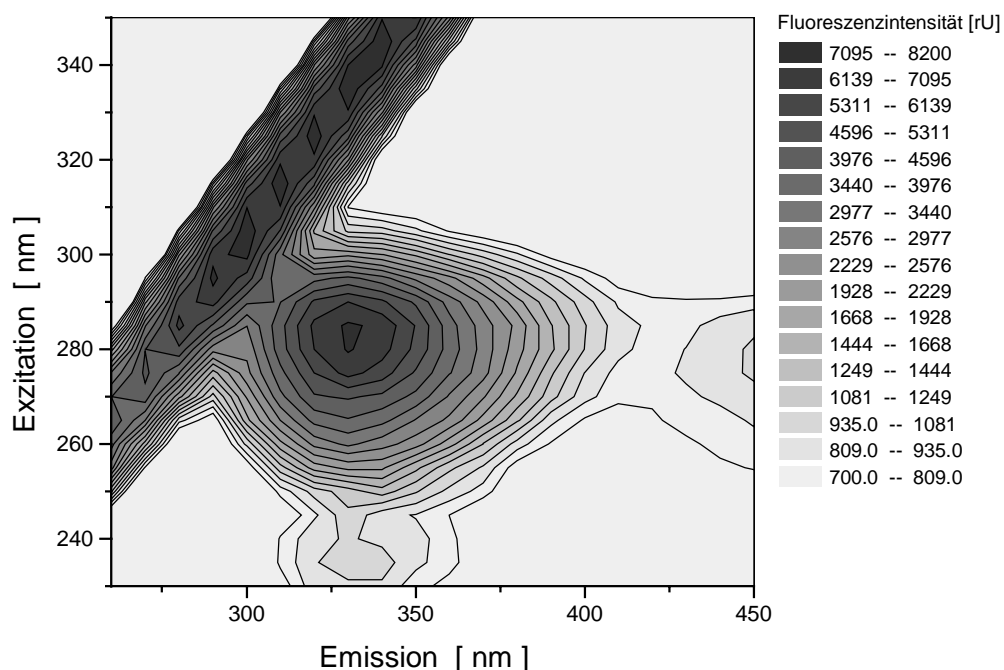


Abb. 9: 2D-Fluoreszenzspektrum von Faktor VIIa

Das 2D-Fluoreszenzspektrum in Abbildung 9 zeigt, daß für Faktor VIIa das Wellenlängenpaar 280/340 nm zur Exzitation und Emission am besten geeignet ist, da hier das Fluoreszenzmaximum liegt. Diese Einstellung wird für alle weiteren Messungen verwendet.

Es gibt verschiedene Methoden, die zur Elution des Antigens herangezogen werden können, wie bereits in Kapitel 3.1.1 diskutiert wurde. Einfach durchführbar und daher häufig verwendet ist eine starke pH-Wert-Änderung [HAGEDORN, 1998]. Da dieses Verfahren im Rahmen der Assayentwicklung auch getestet werden soll, der pH-Wert aber auch starke Auswirkungen auf die Proteinfluoreszenz haben kann, ist eine Überprüfung dieses Aspektes notwendig [REINECKE, 1993]. Dazu wurden Proben mit gleicher Faktor VIIa-Konzentration in Puffer bei verschiedenen pH-Werten in den Trägerstrom (10 mM Tris/100 mM NaCl (pH 7.4)) injiziert, um festzustellen, ob sich das Signal signifikant verändert.

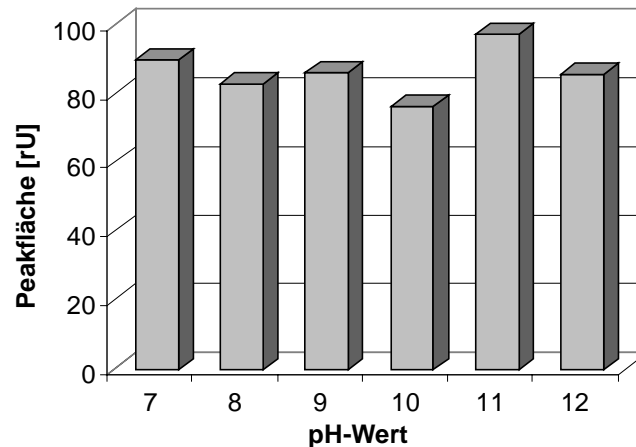


Abb. 10: Fluoreszenzsignal von Faktor VIIa bei verschiedenen pH-Werten der injizierten Probe

Wie Abbildung 10 zeigt, ist der Einfluß des pH-Wertes auf die Fluoreszenz gering. Die zu beobachtenden Schwankungen sind eher auf Verdünnungsfehler bei der Probenaufbereitung als auf Effekte des pH-Wertes zurückzuführen. Allerdings muß auch davon ausgegangen werden, daß sich der pH-Wert der Probe beim Erreichen des Detektors aufgrund der starken Dispersion dem des Probenpuffers angenähert hat. Elution über einen pH-Sprung ist aber dennoch ohne weitere Auswirkung auf die Proteinfluoreszenz möglich.

## 4.2 Assayentwicklung und -optimierung

Es sollen für alle drei Antikörpertypen funktionierende Assays entwickelt werden, um diese dann zur Quantifizierung des Anteils an korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa zu nutzen. Dafür müssen zunächst für jeden der drei Antikörpertypen effektive Träger- und Elutionspuffer-Systeme entwickelt und die Analysenzyklen (Injizieren, Spülen, Eluieren, Equilibrieren) optimiert werden. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist, daß ein zu großer Unterschied in der Ionenstärke der beiden Puffer zu einer Deformierung des Elutionspeaks führen kann. Dieser Effekt kann die Auswertung der Signale erschweren oder gar unmöglich machen. Um mögliche Auswirkungen anderer Bestandteile aus den komplexen Fermentationsproben auf den Assay ausschließen zu können, wurden die Optimierungsuntersuchungen zunächst mit Faktor VIIa Standard-Proben durchgeführt, die mit Probenpuffer verdünnt wurden (Standardaufbereitung s. Anhang).

Die Immobilisierung der Antikörper erfolgte immer auf BrCN-aktivierter Sepharose 4B (Sigma; Deisenhofen, Deutschland) nach der Vorschrift des Herstellers (siehe Anhang). Dieses Trägermaterial wird auch von der Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) bei der Immobilisierung von Antikörpern für die Affinitätschromatographie verwendet.

Da diese Untersuchungen in enger Zusammenarbeit mit der Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) an einem aktuellen Produktionsprozeß durchgeführt wurden, erfolgen alle Konzentrationsangaben nur in relativen Einheiten (rkU).

### 4.2.1 Antikörper FVII-4 F9 (F9A2)

Es müssen zunächst Elutionsbedingungen gefunden werden, die für dieses Antigen/Antikörperpaar zu einer vollständigen Elution führen. Da dieser Antikörper, laut Auskunft von Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark), nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist, wurde zunächst ein Kaliumphosphat-Puffersystem mit pH 7.4 als Träger- und pH 12.3 als Elutionspuffer getestet, da dieses System bei vorangegangenen Untersuchungen mit verschiedenen Analyten und Antikörpern zu guten Ergebnissen geführt hat [REINECKE, 1993; HAGEDORN, 1998]. Eine Elution des Faktor VIIa vom Antikörper nach der Bildung des Immunkomplexes ist mit diesem System jedoch nicht möglich; es kann kein Elutionspeak beobachtet werden. Als weitere Möglichkeit wurde ein pH-Sprung auf 2.0 mit 100 mM Glycin/ 135 mM NaCl als Puffersystem angewendet, doch auch hier konnte keine Elution des Antigens erreicht werden.

Die Anwendung eines Glycin/NaCl-Systems mit einem pH-Sprung auf 12.3 führt zu einem detektierbaren Signal. Da in diesem Fall alkalische Elutionsbedingungen erfolgreich sind, spielt bei dem vorangegangenen Versuch (Elution mit Phosphat-Puffer) die vollständige Abwesenheit von Calcium, da vorhandene Spuren mit dem Phosphat zu unlöslichem  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  reagieren, doch eine Rolle. Laut Produktbeschreibung ist dieser Antikörper allerdings  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Mit dem Puffersystem 0.1 M Glycin/135 mM NaCl/10 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 7.4) // 0.1 M Glycin/135 mM NaCl/10 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 12.3) konnte über einen größeren Konzentrationsbereich von Faktor VIIa eine Kalibration aufgenommen werden.

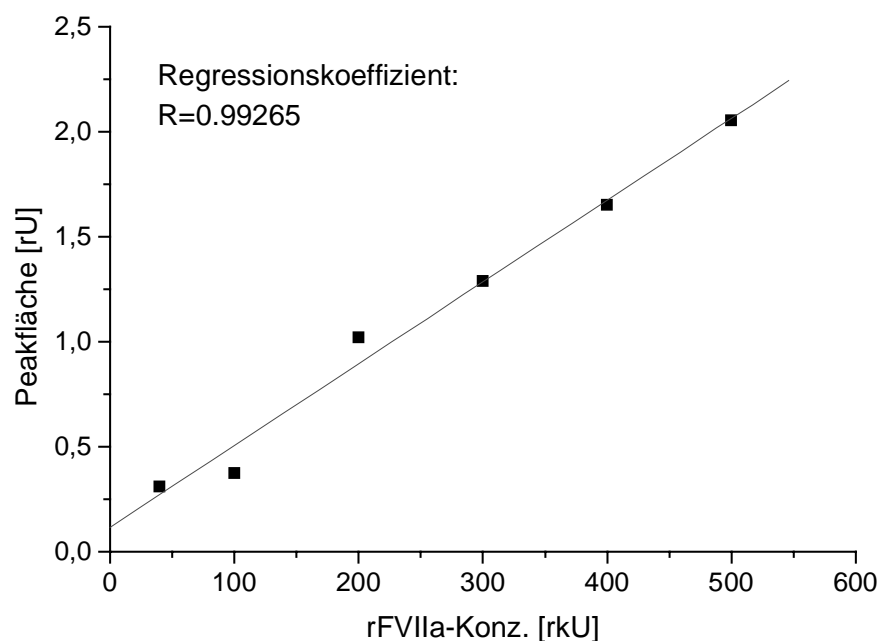


Abb. 11: Kalibrationsfunktion für den Antikörper FVII-4 F9 (F9A2) mit einem Glycin/NaCl-Puffersystem bei alkalischer Elution (pH 12.3); Probe: FVIIa in Probenpuffer

Abbildung 11 zeigt eine lineare Kalibrationsfunktion, die mit diesem Antikörper aufgenommen wurde. Alle Meßwerte ergeben sich als Mittelwert von Doppelbestimmungen. Der Regressionskoeffizient ist mit 0.99265 für einen Immunassay sehr gut.

Diese Messung zeigt, daß der Elutionsassay mit diesem Puffersystem funktioniert. Daher wird eine weitere Messung mit Fermentationsproben durchgeführt. Die komplexere Proben-

zusammensetzung kann zu zahlreichen Störungen (zum Beispiel unspezifische Wechselwirkungen) führen, die die Funktionsweise des Assays beeinträchtigen. Für diese Messung wurde der Faktor VIIa-Standard mit frischem Medium, wie es zu Beginn der Kultivierung eingesetzt wird, verdünnt und vermessen. Auch hier wurden wieder Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert aus beiden Werten gebildet (siehe Abbildung 12).

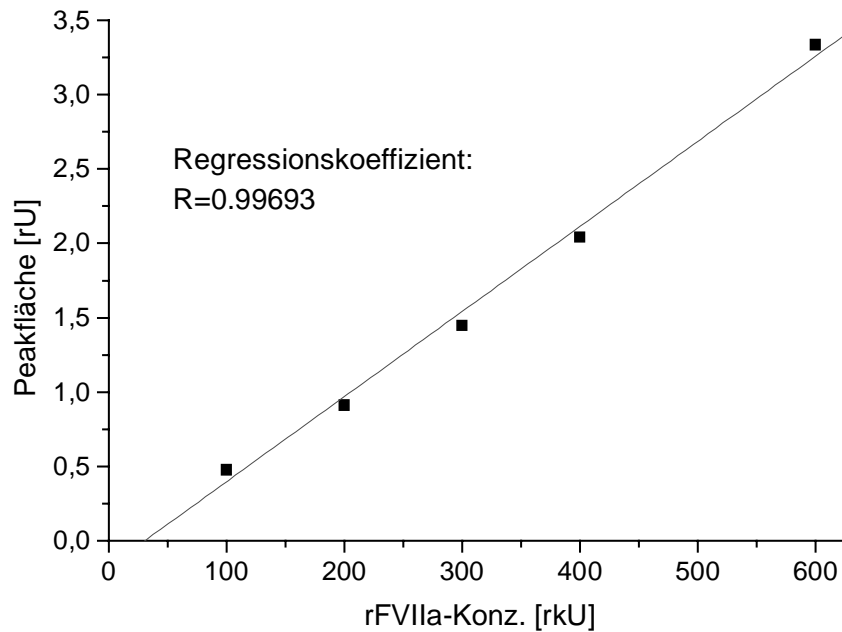


Abb. 12: Kalibrationsfunktion für den Antikörper FVII-4 F9 (F9A2) mit einem Glycin/NaCl-Puffersystem bei alkalischer Elution (pH 12.3) mit Faktor VIIa in Medium

Die Kalibrationsfunktion zeigt auch für die Medium-Proben einen sehr guten linearen Zusammenhang. Allerdings ist die Steigung der Gerade geringfügig niedriger als bei der Messung mit Faktor VIIa-Proben in Puffer. Diese Verringerung des Signals ist auf die erhöhte Komplexität der Probe zurückzuführen. Durch die hohe Konzentration anderer Bestandteile kann die Bindung des Zielproteins an die Antikörper gehindert sein. Trotzdem ist der Regressionskoeffizient für diese Messung sogar noch deutlich besser als bei der vorangegangenen (vgl. Abbildung 11).

Allerdings ist bei den gewählten Bedingungen die Signalgröße allgemein sehr klein: Abbildung 13 zeigt den Verlauf des Fluoreszenzsignals während eines Analysenzyklus bei der Messung einer Faktor VIIa-Probe in Probenpuffer.

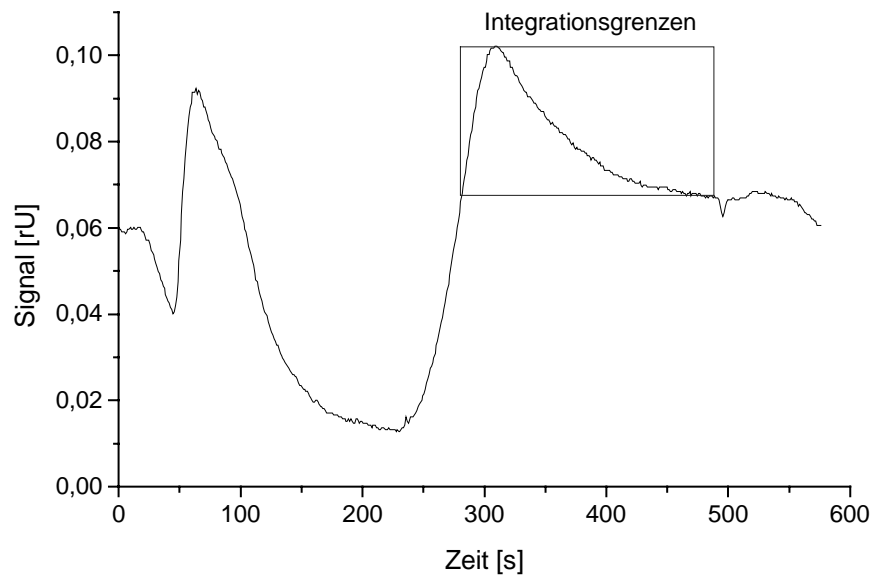


Abb. 13: Signalverlauf eines Analysenzyklus mit einer Antikörper FVII-4F9(F9A2)-Kartusche mit einem Glycin/NaCl-Puffersystem (alkalische Elution bei pH 12.3); Probe: Faktor VIIa in Puffer

Das erhaltene Elutionssignal ist deutlich kleiner als das, welches man bei der Injektion einer reinen Faktor VIIa-Probe in den Trägerstrom ohne Antikörperkartusche erhält. Durch die gewählten Bedingungen findet demnach nur eine unvollständige Elution statt, und nur ein kleiner Teil des gebundenen Antigens wird wieder eluiert. Dies führt zu einer ständigen Abnahme der Kapazität der Kartusche, so daß sie nach einiger Zeit unbrauchbar wird. Zudem wirken sich kleine absolute Schwankungen des Signals (z.B. Peristaltik der Pumpe) bei dieser geringen Signalgröße sehr schnell durch große Abweichungen im berechneten absoluten Meßwertes aus. Der Assay ist also in dieser Form nicht gut geeignet, um Faktor VIIa in Fermentationsproben über eine längere Standzeit zu detektieren.

Laut späterer Aussage von Novo Nordisk A/S [NICOLAISEN, 1998] bindet dieser Antikörper Faktor VIIa so fest, daß eine Elution nur unter sehr extremen Bedingungen, die die Antikörper nachhaltig schädigen (Denaturierung), möglich ist. Von weiteren Untersuchungen mit diesem Antikörpertyp wurde daher Abstand genommen, da er für den Einsatz in einem kontinuierlich betriebenen Immunassay nicht geeignet ist.

#### 4.2.2 Antikörper FVII-4 F7 (F7A2)

Dieser Antikörpertyp weist eine im Vergleich zu FVII-4 F9 (F9A2) geringere Affinität zu Faktor VII auf, so daß eine vollständige Elution möglich sein sollte [VALENTIN, 1998]. Untersuchungen bezüglich der Verwendung dieses Antikörpertyps in der Affinitätschromatographie haben gezeigt, daß eine Elution mit 3 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ -Lösung sehr effektiv ist [VALENTIN, 1998]. Basierend auf diesen Erfahrungen wurde zunächst folgendes Puffersystem verwendet:

10 mM Tris/100 mM NaCl (pH 7.4) // 10 mM Tris/100 mM NaCl/3 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (pH 7.4).

Es ergibt sich der in Abbildung 14 dargestellte Signalverlauf.

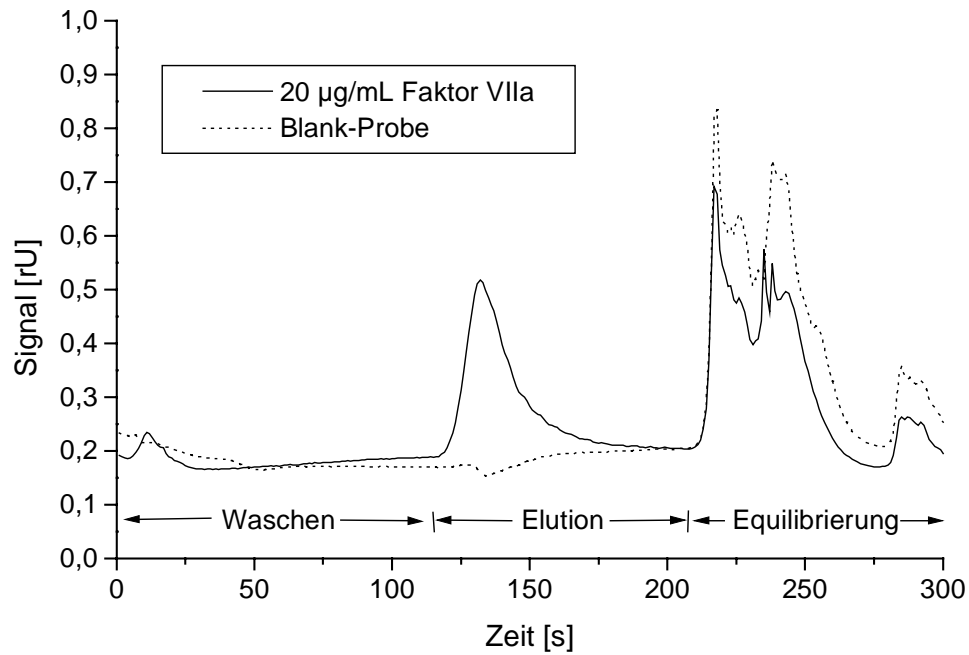


Abb. 14: Signalverlauf eines Analysenzyklus mit einer Antikörper FVII-4 F7 (F7A2)-Kartusche mit einem Tris/NaCl-Puffersystem (Elution mit 3 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ); Proben: Faktor VIIa in Puffer, Blank-Probe (Puffer ohne Faktor VIIa)

Das erhaltene Elutionssignal ist um mehr als Faktor 10 größer als bei dem vorher verwendeten Antikörper F9A4. Faktor VIIa kann in diesem Fall vollständig eluiert werden. Allerdings tritt im abschließenden Equilibrierungsschritt ein deutliches Störsignal auf, das auch nach einer gegenüber dem dargestellten Zyklus deutlich verlängerten Spülzeit erst langsam wieder auf die Basislinie zurückgeht. Die Messung einer Blank-Probe (Injektion von Trägerpuffer ohne Faktor VIIa) zeigt, daß das Störsignal nicht auf eventuelle Antikörper/Antigen-Wechselwirkungen, sondern ausschließlich auf den Wechsel von Elutions- zu Trägerpuffer zurückzuführen ist. Der Versuch, die hohe Salzkonzentration über einen Gradienten abzusenken, führt zu keiner Verringerung des Störsignals. Es ist daher vermutlich auf die starke Schlie- renbildung, die bei der Vermischung der beiden Puffer auftritt, zurückzuführen.

Zur näheren Untersuchung dieses Effekts wird die Absorption des Systems beim Wechsel zwischen Elutions- und Trägerpuffer bei 280 nm und 340 nm vermessen. Die Messung erfolgte mittels eines UV/VIS-Spektralphotometers (Uvikon 922, Kontron) in einer 80  $\mu\text{L}$ -Durchflußküvette. Der Pufferstrom wurde mit Hilfe einer Pumpe bei einer Flußrate von circa 1,0 mL/min durch das System gepumpt. Abbildung 15 zeigt den Absorptionsverlauf bei beiden Wellenlängen. Der Pufferwechsel erfolgte circa 20 Sekunden nach dem Start der Messung.

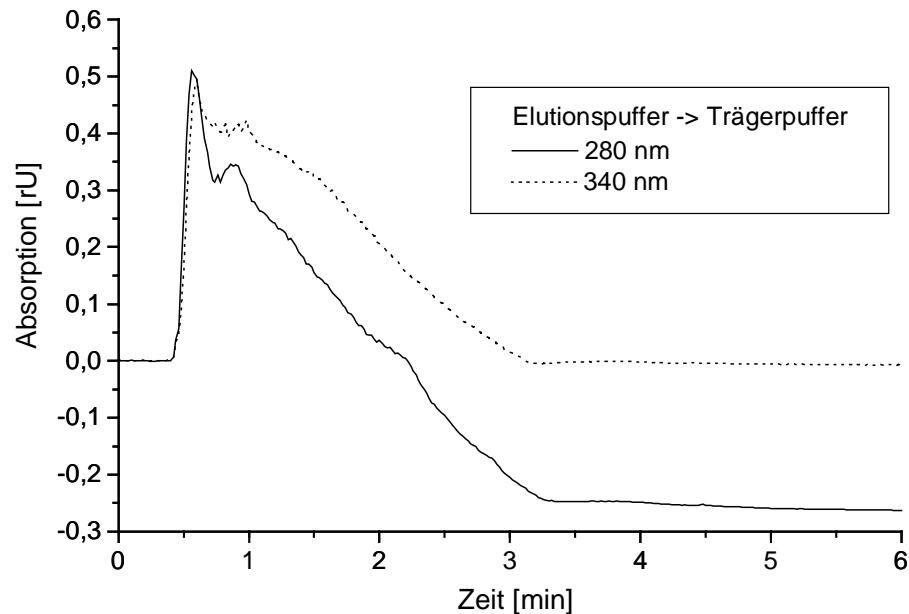


Abb. 15: Absorptionsverlauf beim Wechsel vom Elutions- zum Trägerpuffer bei 280 und 340 nm

Beim Wechsel zwischen Elutions- und Trägerpuffer tritt bei beiden Wellenlängen eine Veränderung der Transmissionseigenschaften auf, die über mehrere Minuten anhält. Die deutliche Schlierenbildung bei der Vermischung führt zur Streuung des eingestrahlen Lichts, was zu einer Zunahme der Absorption führt. Durch den apparativen Aufbau der Immun-FIA dauert dieser Effekt dort noch länger an, da die Kartusche mit den immobilisierten Antikörpern die Dispersion noch deutlich erhöht. Das mit dem Fluoreszenzspektrometer gemessene Stör-signal, welches beim Equilibrierungsschritt des Immunassays auftritt, ist also nicht auf tatsächlich emittiertes Fluoreszenzlicht, sondern vermutlich auf elastische Streuvorgänge zurückzuführen [TWARDOWSKI, 1994].

Die Verwendung von 3 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$  ist zwar unter dem Aspekt der Elution von Faktor VIIa vom Antikörper gut geeignet, die auftretenden starken Streusignale erfordern jedoch einen stark verlängerten Equilibrierungsschritt auf bis zu 20 Minuten. Dadurch ist dieses System als schnelle On-line-Analytik nicht sinnvoll einsetzbar.

Um eine Alternative für den Zusatz von  $\text{NH}_4\text{SCN}$  zu finden, wurden weitere Elutionspuffer mit anderen chaotropen Zusätzen untersucht. Die Verwendung von 60% Ethylenglykol und 4 M Guanidinhydrochlorid war allerdings nicht möglich, da diese Substanzen ebenfalls starke Streueffekte zeigen, die sich auf den Verlauf der Basislinie auswirken. Eine sinnvolle Auswertung der Messung war daher nicht möglich. Die Verwendung von einem Puffer mit niedrigem pH-Wert (2.0) führte zu keiner Elution. Der Versuch mit einem hohen pH-Wert (12.0) zu eluieren, führte zu einem Detektionssignal, da dieses aber unabhängig von der Menge an injiziertem Faktor VIIa ist, führen diese Bedingungen vermutlich zu einer Ablösung der immobilisierten Antikörper. Offenbar ist die Bindung dieses Antikörpertyps zur Trägermatrix nicht so stabil wie, zum Beispiel bei dem Antikörper F9A2. Von weiteren Untersuchungen mit diesem Antikörper wurde ebenfalls Abstand genommen, da keine sinnvollen verwendbaren Elutionsbedingungen gefunden werden konnten.

### 4.2.3 Antikörper FVIIa (F1A2)

Für die ausschließliche Bindung von korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa ist bei der Verwendung dieses Antikörpers immer die Anwesenheit von Calcium erforderlich (5-20 mM). Auch bei diesem System wurden die ersten Elutionsversuche mit einem pH-Wert-Sprung auf 12.3 vorgenommen. Dabei fand das Puffersystem 100 mM Glycin/135 mM NaCl/10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4) // 100 mM Glycin/135 mM NaCl/10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 12.3) Anwendung. Die Meßpunkte ergeben sich wieder als Mittelwert einer Doppelbestimmung.

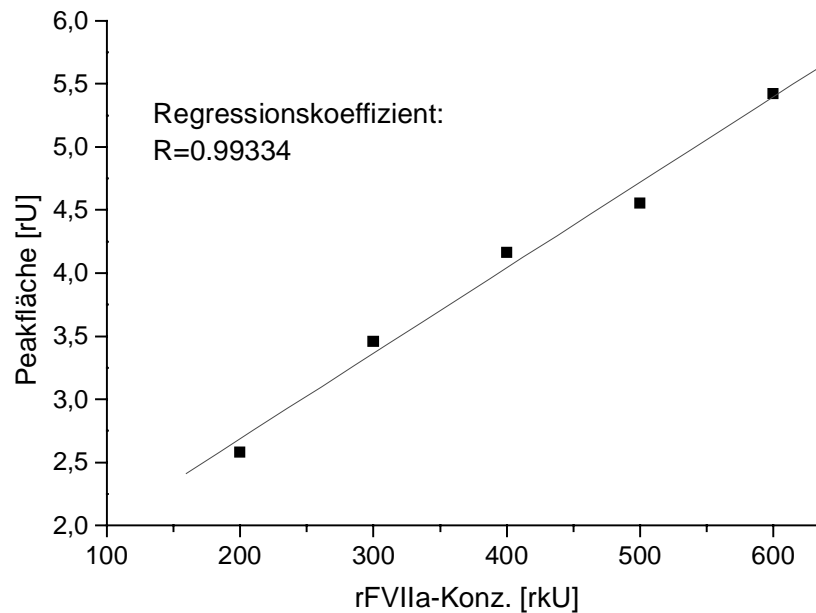


Abb. 16: Kalibrationsfunktion für den Antikörper FVIIa (F1A2) mit einem Glycin/NaCl-Puffersystem bei alkalischer Elution (pH 12.3) mit FVIIa in Probenpuffer

Abbildung 16 zeigt, daß auch für dieses System ein linearer Verlauf der Kalibrationsfunktion gefunden werden kann. Die Signalhöhe und damit die Peakfläche sind aber wie bei dem Antikörper FVII-4 F9 (F9A2) sehr klein, so daß davon ausgegangen werden muß, daß Faktor VIIa nicht vollständig eluiert wird. Damit verbleibt bei jedem Analysenzyklus eine erhebliche Menge an Protein in der Kartusche und vermindert damit deren Kapazität. Zudem vermindert das kleine Meßsignal die Genauigkeit des Systems, da kleine Schwankungen bereits zu großen Signaländerungen führen. Dieses Puffersystem ist demnach für die Durchführung des Immunassays nicht geeignet.

Die Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) verwendet diesen Antikörpertyp auch im Rahmen des Aufreinigungsprozesses von Faktor VIIa in einem Affinitätschromatographie-Schritt. Dabei wird die Antikörper/Antigen-Bindung durch einen Citrat-haltigen Puffer gelöst. Das Citrat komplexiert ("maskiert") dabei das für die Bildung des Antikörper/Antigen-Komplexes erforderliche Calcium und löst dadurch die Bindung. Die kurzzeitige Abwesenheit von Calcium bei der Elution wirkt sich nicht nachteilig auf die weitere Verwendung des Antikörpers aus; die direkte Anwesenheit von Calcium ist nur für die Bindung von Faktor VIIa erforderlich.



Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß sowohl der Wasch- als auch der Elutionsschritt bei einem physiologischen pH-Wert (7.4) vorgenommen werden können. Da die Antikörperkartusche so keinen extremen Bedingungen ausgesetzt ist, erhöht sich die Standzeit des Systems.

Für die folgenden Messungen wurde das Puffersystem 100 mM NaCl/10 mM Tris/20 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4) // 30 mM Na<sub>3</sub>Citrat/75 mM Tris (pH 7.4) verwendet. Abbildung 17 zeigt den Fluoreszenz-Signalverlauf während einer Messung.

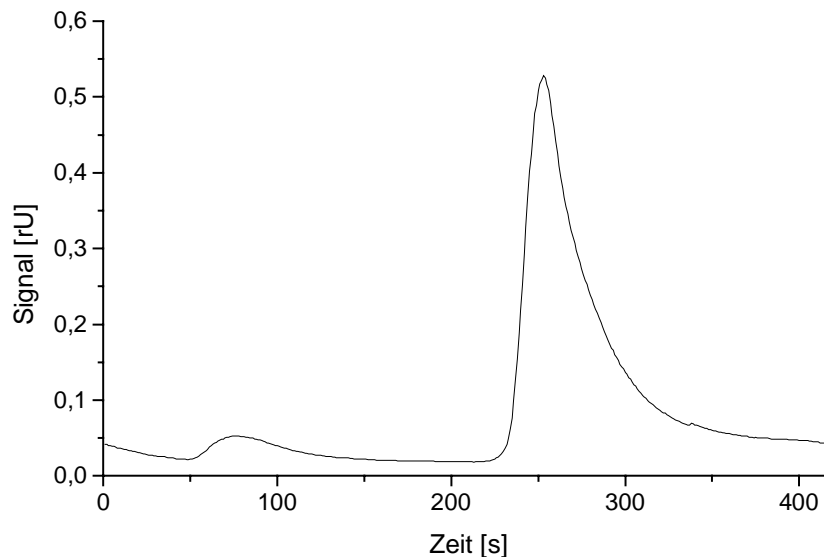


Abb. 17: Signalverlauf eines Analysenzyklus mit einer Antikörper FVIIa (F1A2)-Kartusche (Elution mit Na<sub>3</sub>-Citrat (pH 7.4)); Probe: FVIIa in Puffer

Unter diesen Bedingungen ist eine vollständige Elution des Proteins von der Antikörperkartusche möglich. Die Peakfläche des Elutionspeaks ist deutlich größer als bei vorangegangenen Untersuchungen und die Genauigkeit des Assays damit besser. Dieses Puffersystem ist demnach für die Anwendung des Assays als schnelles On-line-System gerade bei Downstream-Prozessen gut geeignet. Die weiteren Untersuchungen werden ausschließlich mit diesem Puffersystem durchgeführt.

Abbildung 18 zeigt eine mit diesem Puffersystem in Puffer aufgenommene Kalibrationsfunktion für Faktor VIIa, die über einen großen Konzentrationsbereich einen linearen Verlauf aufweist. Damit ist die Quantifizierung von Proben mit stark unterschiedlichen Konzentrationen möglich, ohne daß weitere Verdünnungsschritte vorgenommen werden müssen. Ein Einsatz dieses Assays als Analytik bei Aufreinigungsprozessen (Chromatographie), wo erheblich größere Konzentrationen als bei den Bioprozessen auftreten können, ist daher ebenfalls denkbar. Die Meßpunkte ergeben sich wieder aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung.

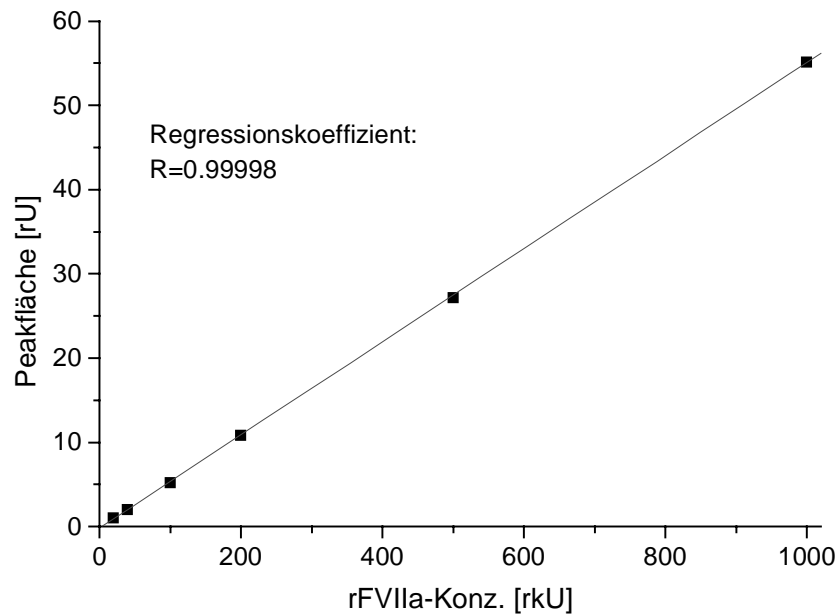


Abb. 18: Kalibrationsfunktion für den Antikörper FVIIa (F1A2) mit einem Tris-Puffersystem bei Elution über  $\text{Na}_3\text{-Citrat}$  (pH 7.4); Probe: FVIIa in Puffer

Messungen von Proben, bei denen Faktor VIIa in frisches Medium gegeben wurde, zeigen ein vergleichbar gutes Resultat auch in der Anwesenheit der anderen Proteine und Medienbestandteile.

Da dieses Puffersystem für die Anwendung des heterogenen Elutionsassays gut funktioniert, wurde es im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher charakterisiert und optimiert. Abschließend wurden unter den optimierten Bedingungen Messungen von realen Fermentationsproben zur Bioprozeßbeobachtung vorgenommen.

## 4.3 Charakterisierung des Meßsystems

Der heterogene Elutionsassay wurde zur schnellen, vollautomatischen Produktquantifizierung in Bioprozessen entwickelt. Ein Einsatz in der Routineanalytik erfordert u.a. eine gleichbleibende Präzision der Analysenergebnisse über einen längeren Zeitraum (zum Beispiel die Dauer einer Tierzellkultivierung). Die Standzeit der Kartusche sollte demnach bei gleichbleibender Genauigkeit mindestens eine Woche betragen. Alterungseffekte, Verschmutzungen und ähnliche Störungen können nach längeren Betriebszeiten zu systematisch abweichenden Meßwerten führen. Die Erkennung solcher Effekte und Einflüsse, ihre Quantifizierung sowie mögliche Minimierung waren das Ziel der folgenden Untersuchungen.

Desweiteren wurden verschiedene Aspekte der Probeninjektion näher untersucht und optimiert, um eine möglichst hohe Analysenfrequenz bei guter Reproduzierbarkeit zu erzielen.

### 4.3.1 Stabilität der Kartusche

Um die Stabilität der immobilisierten Antikörper ohne großen Einfluß der Elutionsbedingungen und der Probenzusammensetzung zu untersuchen, wurde eine Kartusche über einen Zeitraum von zehn Tagen je einmal pro Tag kalibriert und dann wieder bei 4°C in Trägerpuffer (100 mM NaCl/10 mM Tris/20 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4)) gelagert. Die Messungen erfolgten als Vierpunkt-Kalibrationen. Für alle Meßwerte wurde eine Doppelbestimmung mit Faktor VIIa in frischem Medium durchgeführt.

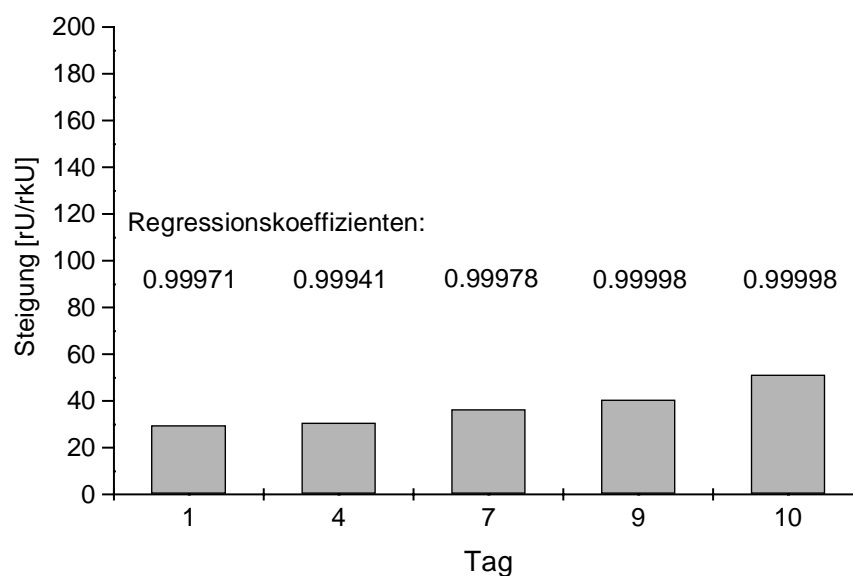


Abb. 19: Steigung der Kalibrationsgeraden über einen Zeitraum von 10 Tagen

Normalerweise sollte man hier eine Abnahme in der Steigung der Kalibrationsfunktion erwarten, da ein Teil der Antikörper bei der Elution geschädigt oder sogar ausgewaschen werden können. Offenbar ist aber der Antikörperüberschuß so groß, daß dieser Aspekt im untersuchten Zeitintervall noch keine Rolle spielt. Die leichte Zunahme der Steigung ist darauf zurückzuführen, daß bei der letzten Messung ein neuer Standard verwendet wurde, dessen Aktivität noch nicht durch lange Lagerung und mehrmaliges Auftauen abgenommen hat. Die Antikörperkartusche zeigt eine gute Stabilität über den untersuchten Zeitraum. Der Regressionskoeffizient ist mit  $\geq 0.99941$  für alle durchgeführten Kalibrationsmessungen ebenfalls sehr gut.

Wie die Untersuchung zeigt, ist sowohl die Langzeitstabilität als auch die Empfindlichkeit der Immunkartusche auch über einen längeren Zeitraum ausgezeichnet. Dies ist zu einem großen Anteil auf die milden Elutionsbedingungen zurückzuführen.

### 4.3.2 Reproduzierbarkeit der Meßdaten

Da sowohl die Elutionsbedingungen als auch der hohe Proteinanteil der Medienproben die Antikörper beeinträchtigen können, muß das Meßsystem mit der Antikörperkartusche bei längeren Messungen regelmäßig rekali­briert werden, um eine gleichbleibende Genauigkeit garantieren zu können. Dadurch können auch Effekte aufgrund von Temperaturschwankungen und Veränderungen des Volumenstroms durch Alterung der Schläuche ausgeglichen werden.

Für diese Langzeittests wurden Faktor VIIa-Proben mit gleichbleibender Konzentration über einen Zeitraum von über 24 Stunden injiziert und analysiert. Die Integration erfolgte automatisch über die Software in festgelegten Integrationsgrenzen, ein manueller Eingriff wurde während der Messungen nicht vorgenommen. Die Untersuchung wurde mit Proben in Puffer und mit Medium-Proben durchgeführt.

#### 4.3.2.1 Langzeitmessung mit Faktor VIIa in Puffer

Für diese Meßreihe wurden 200 Proben mit einer gleichbleibenden Konzentration an Faktor VIIa injiziert. Die einzelnen Meßzyklen wurden nach folgender Methode durchlaufen:

Injektion der Probe	20 s
Spülen	110 s
Elution	200 s
Equilibrierung	80 s

Die Gesamtzeit eines Zyklus betrug einschließlich aller Schaltvorgänge 438 Sekunden. Die Integration erfolgte für alle Zyklen im Zeitintervall von der 220. bis 360. Sekunde. Während der Messung wurde die Probe mit Eis gekühlt, um die Denaturierung oder einen enzymatischen Abbau des Zielanalyten zu minimieren.

Im Idealfall, das heißt keine Beeinflussung der Messung über den gesamten Versuchszeitraum, sollte man eine parallel zur Abszisse verlaufende Gerade erhalten. Abbildung 20 zeigt den experimentell ermittelten Kurvenverlauf.

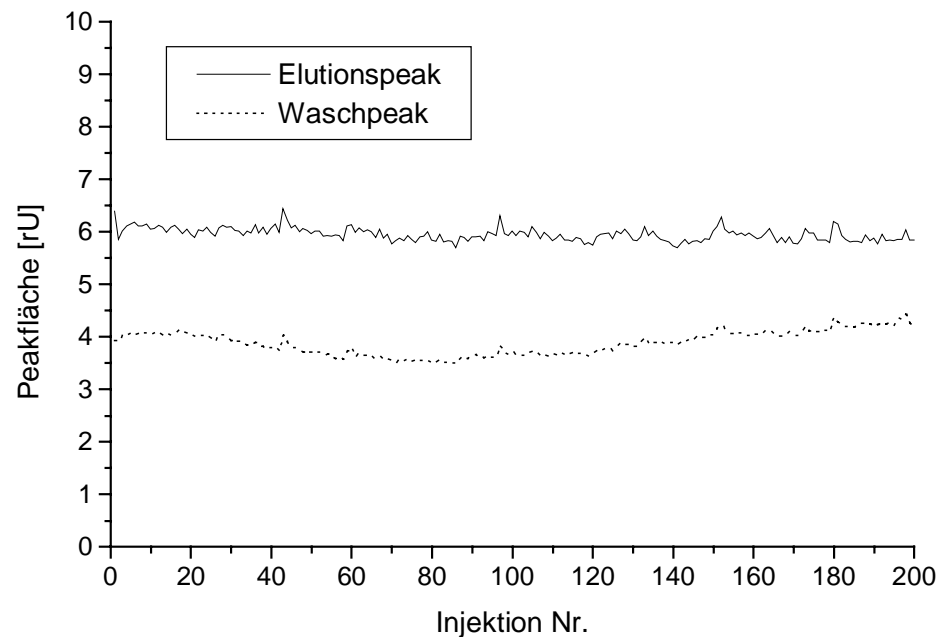


Abb. 20: Verlauf des Integrals von Elutions- und Waschpeak während der Langzeitmessung in Puffer

Das Signal zeigt nur einen schwachen negativen Drift und eine leichte Streuung der Werte über den gesamten Meßzeitraum. Dies gilt sowohl für den Elutions- als auch den Waschpeak. Die Standardabweichung des Assays für die Quantifizierung von Faktor VIIa liegt bei 0,12 rkU, das entspricht einem relativen Fehler von 2.08 Prozent, für den gesamten Untersuchungszeitraum. Dieser Wert ist für eine solche Anwendung ausgesprochen gering und spricht für die hohe Präzision und Genauigkeit des Systems im Rahmen der gewählten Bedingungen. Der normale ELISA-Test zur Quantifizierung von Faktor VII hat einen relativen Fehler von 5-10 Prozent und liegt somit deutlich über dem hier erzielten Ergebnis. Die leichte Streuung der Meßwerte kann unterschiedliche Ursachen haben. Eine wichtige Rolle dabei spielt der nicht pulsationsfreie Volumenstrom, Inhomogenitäten in der Kartusche, sowie eventuell Intensitätsschwankungen der Detektorlampe.

Anhand der Meßdaten wird deutlich, daß für den Assay mit Faktor VIIa in Puffer unter den gewählten Bedingungen eine gleichbleibende Genauigkeit über einen längeren Zeitraum gewährleistet ist.

#### 4.3.2.2 Langzeitmessung mit Faktor VIIa in Medium

Für diese Meßreihe wurden 183 Proben mit einer konstanten Faktor VIIa-Konzentration injiziert. Die einzelnen Meßzyklen wurden nach folgender Methode durchlaufen, wobei der Waschschrift wegen des höheren Anteils an Nebenbestandteilen im Vergleich zu der vorhergehenden Messung verlängert werden mußte:

Injektion der Probe	20 s
Spülen	220 s
Elution	200 s
Equilibrierung	80 s

Die Gesamtzeit eines Zyklus betrug 548 Sekunden. Die Integration erfolgte für alle Zyklen im Zeitintervall von der 300. bis 450. Sekunde. Die Integration der Waschpeaks war in diesem Fall nicht möglich, da sie den Meßbereich überschritten haben.

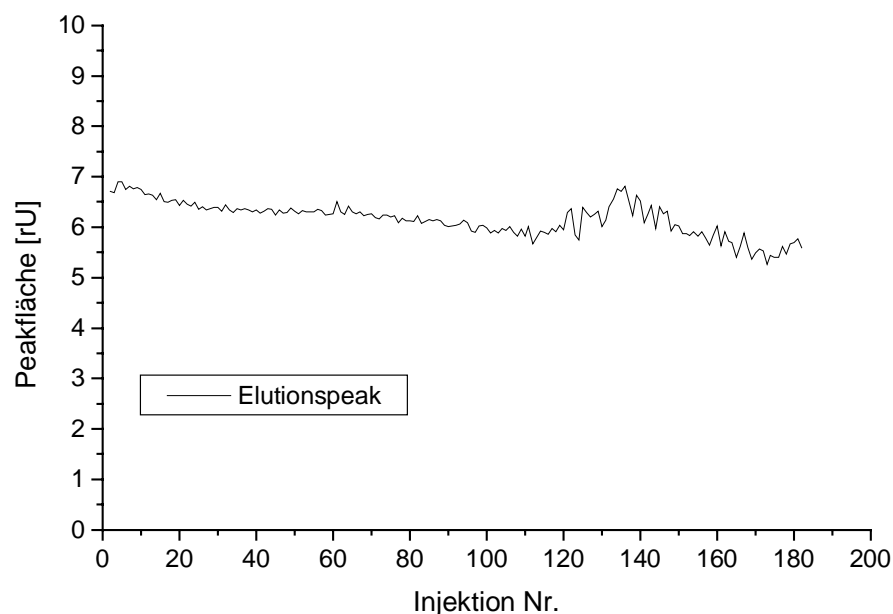


Abb. 21: Verlauf des Integrals vom Elutionspeak während der Langzeitmessung in Medium

Bei der in Abbildung 21 dargestellten Messung von Medium-Proben ist der negative Drift von Anfang an wesentlich stärker als bei der Messung mit Faktor VIIa in Puffer und ab der 110. Injektion nimmt die Unpräzision, d.h. die Streuung, ebenfalls stark zu. Die starke Schwankung etwa bei Messung 130 ist vermutlich auf eine Luftblase im System zurückzuführen, die durch Kanalbildung in der Kartusche auch die folgenden Messungen nachhaltig stört. Die Standardabweichung über alle Messungen beträgt 0,337 rKU, das entspricht einem relativen Fehler von 5.5 Prozent. Betrachtet man allerdings nur die Werte bis zur 110. Messung, liegt die Standardabweichung mit 0,245 rKU (relativer Fehler 3.8 Prozent) deutlich niedriger. Für den Drift sind die Denaturierung und das Ausspülen der immobilisierten Antikörper verantwortlich. Offenbar ist der Einfluß der anderen Medienbestandteile auf die Antikörper doch relativ groß. Die möglichen Ursachen für die Streuung sind die gleichen, wie unter 4.3.2.1 aufgeführt.

Trotz der stärkeren Abweichung bei dieser Meßreihe ist das Ergebnis für den Immunassay immer noch bezüglich der Standardabweichung im gleichen Größenordnungsbereich wie der des ELISA-Tests und kann somit die gleiche Genauigkeit gewährleisten.

### 4.3.3 Statistische Auswertung der Langzeitmessungen

#### 4.3.3.1 Differenztest

Ein mögliches Verfahren zur Erkennung von Ungenauigkeiten stellt die statistische Qualitätskontrolle dar, bei der zur Bewertung der Ergebnisse entsprechende statistische Methoden herangezogen werden. Mit ihrer Hilfe können sowohl zufällige als auch systematische Abweichungen ermittelt werden.

Ein häufig verwendetes Verfahren zur Ermittlung systematischer Fehler ist der Differenztest. Dabei wird die Differenz  $d_i = x_{(i+1)} - x_i$  jedes Meßwertes ( $x_i$ ) mit seinem Nachfolger ( $x_{(i+1)}$ ) gebildet und diese Differenz unter Berücksichtigung des Vorzeichens gegen die laufende Peaknummer aufgetragen [CHEESEMAN, 1978]. Die Zentral- beziehungsweise Mittellinie entspricht dabei dem Erwartungswert der Differenz, d.h. dem Wert Null. Eine einseitige Streuung der Werte um die Nulllinie ist dann ein deutlicher Hinweis für einen systematischen Fehler. Die Differenzuntersuchung der für die Messung in Puffer ermittelten Werte zeigt Abbildung 22.

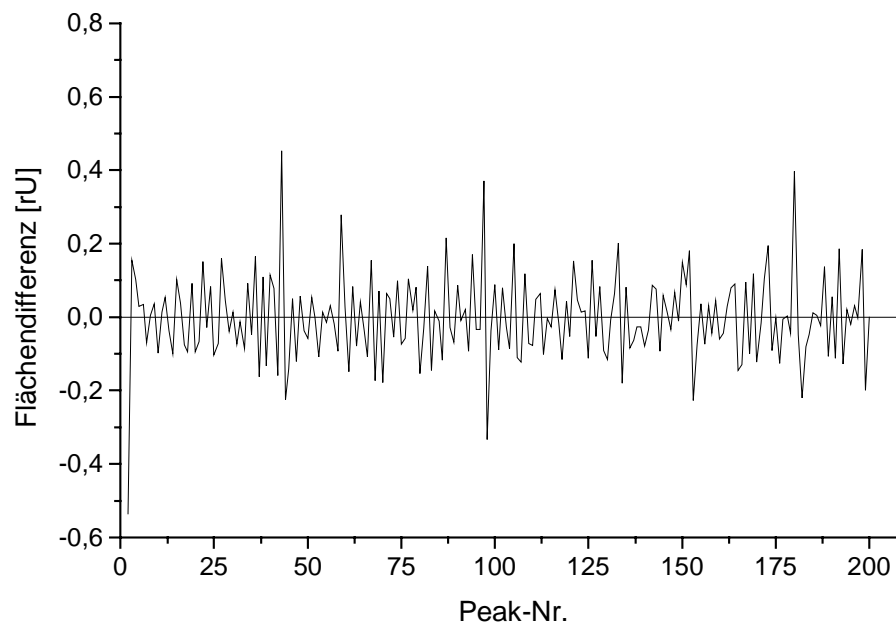


Abb. 22: Differenzauswertung der Langzeitmessung in Puffer

Der Differenztest verdeutlicht, daß die Meßwerte eine starke ungleichmäßige Streuung um die Nulllinie zeigen, die bei der einfachen Betrachtung der Meßwerte nicht sichtbar ist. Tabelle 1 zeigt die Auswertung der Differenzenanalyse. N steht dabei für die Anzahl der Messungen mit der entsprechenden positiven oder negativen Abweichung und  $\Sigma N$  für die Summe der absoluten Abweichungen.

Tab. 1: Auswertung der Meßwerte (Puffer) nach positiven und negativen Differenzen

$N < 0$	$N > 0$	$\Sigma N < 0$	$\Sigma N > 0$
107	92	-9.0932	8.5474

Es fällt auf, daß eine größere Anzahl an Meßwerten eine Abweichung nach unten zeigt als nach oben. Dieses Verhalten weist auf eine systematische Abweichung hin. Auch die Summe der absoluten negativen Abweichungen ist größer als die der positiven. Beide Ergebnisse machen den negativen Drift des Gesamtverlaufs der Meßwerte deutlich, der auch schon anhand der eigentlichen Meßwerte erkennbar ist. Über die tatsächliche Ursache der Störung lassen die errechneten Differenzen jedoch keine Aussage zu.

Die Differenzanalyse für die Messung von Faktor VIIa in Medium führt zu einem ähnlichen Ergebnis. Hier ist es jedoch sinnvoll, den Signalverlauf bei der weiteren Betrachtung in zwei verschiedene Intervalle einzuteilen: Das Intervall mit dem nur leicht negativen Drift bis zur 110. Messung und in ein Zweites, in dem die starke Streuung auftritt.

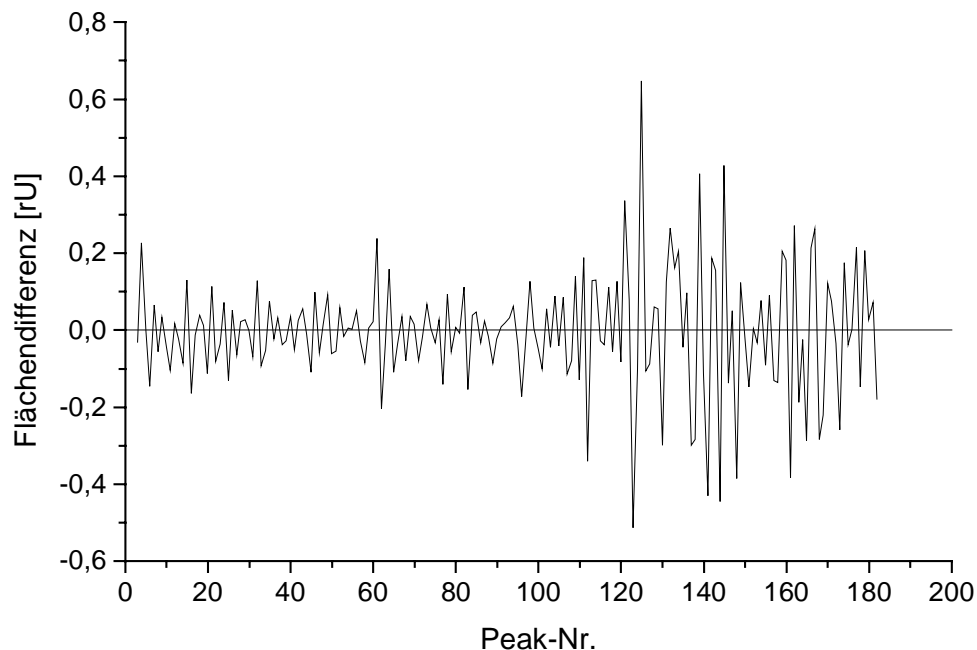


Abb. 23: Differenzauswertung der Langzeitmessung in Medium

Die Differenzauswertung in Abbildung 23 zeigt auch hier eine unregelmäßige Streuung um die Mittellinie. Bis zur 110. Messung ist diese nicht sehr stark, sondern vergleichbar mit der in Abbildung 22. Die Streuung nimmt aber ab dem Meßpunkt 110 deutlich zu, was, wie bereits erwähnt, vermutlich auf die Injektion einer Luftblase in die Kartusche zurückzuführen ist. Allerdings ist in diesem ersten Intervall die Differenz der Summen aller negativer und positiver Abweichungen ( $\Sigma N < 0 + \Sigma N > 0$ ) deutlich kleiner als 0, was den im Vergleich zu der vorherigen Messung stärkeren negativen Drift in diesem Bereich verdeutlicht (vergleiche Tabelle 2).



Tab. 2: Auswertung der Meßwerte (Medium) nach positiven und negativen Differenzen

Peak-Nr.	N < 0	N > 0	$\Sigma N < 0$	$\Sigma N > 0$
1-182	93	88	-14.3764	9.8108
1-110	58	51	-7.9259	2.9684
110-182	35	37	-6.4505	6.2124

Im zweiten Intervall ist die Gesamtabweichung (die Summe der Beträge der Einzelabweichungen:  $|\Sigma N < 0| + |\Sigma N > 0|$ ) durch die stärkeren Schwankungen der Meßwerte zwar größer, aber über den gesamten Bereich ist die Summe der positiven und negativen Abweichungen ( $\Sigma N < 0 + \Sigma N > 0$ ) etwa gleich groß. Dieses Ergebnis läßt auf ein geringeres Driftverhalten schließen, was durch die bloße Betrachtung der Meßwerte nicht deutlich wird.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich das Verfahren zur Feststellung systematischer Fehler (hier: Driftverhalten) innerhalb von Mehrfachbestimmungen nutzen läßt. Damit ist eine leichtere Suche nach Fehlerquellen möglich, da sich bestimmte Effekte gut auf konkrete Eigenschaften des Analysensystems zurückführen lassen.

Ein Vergleich der beiden Messungen mit verschiedenen Probenarten ist ebenfalls möglich. So zeigen die Ergebnisse, daß bei der Messung mit Mediumproben im ersten der beiden Intervalle der auftretende Drift deutlich größer ist als bei der Messung in Puffer. Der Assay ist aber auch für die Messung von Fermentationsproben gut geeignet, wenn durch entsprechende Kalibrationsroutinen eine Kompensation des negativen Drifts vorgenommen wird.

#### 4.3.3.2 Kalibrierhäufigkeit

Der Einsatz des heterogenen Elutionsassays in der Produktanalytik von Fermentationsprozessen erfordert eine gleichbleibende Genauigkeit der Analyseergebnisse über einen längeren Zeitraum. Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt, kann ein Drift oder andere störende Effekte (wie z.B. Luftblasen) die Genauigkeit nachhaltig beeinflussen. Zur Abschätzung, wie oft das System bei der Messung von Fermentationsproben erneut kalibriert werden muß, werden die experimentellen Ergebnisse des Langzeittests mit den Mediumproben verschiedenen Kalibrationsroutinen unterzogen. Die Ergebnisse der Untersuchung mit Pufferproben werden nicht weiter untersucht, da das Verhalten des Assays während der Messungen zum einen deutlich besser ist und zum anderen das System vornehmlich nicht für Messungen von Proben in Puffer, sondern für Mediumproben eingesetzt werden soll.

Für diese Untersuchung wurden in acht verschiedenen Routinen jeweils der 5. (bzw. 10., 15., 20., 25., 30., 40., 50.) Meßwert der Datenreihe quasi als "Kalibrierung" gleich dem Wert 100 gesetzt. Die diesem Wert folgenden 4 (bzw. 9, 14, 19, 24, 29, 39, 49) Werte wurden dann entsprechend transformiert, um die Abweichungen von dem "Kalibrationswert" ermitteln zu können.

Die folgenden Auftragsungen (Abbildung 24-26) zeigen beispielhaft den unterschiedlichen Verlauf des Meßsignals für die Anwendung der Kalibrationsroutinen nach jeweils 5, 20 und 50 Messungen. Ergänzend sind die Abweichungsgrenzen von 10 Prozent, die für den ELISA-Test gelten, als gestrichelte Linien mit eingezeichnet. Somit können einzelne Meßwerte, die diesen Schwellenwert überschreiten, leichter erkannt werden.

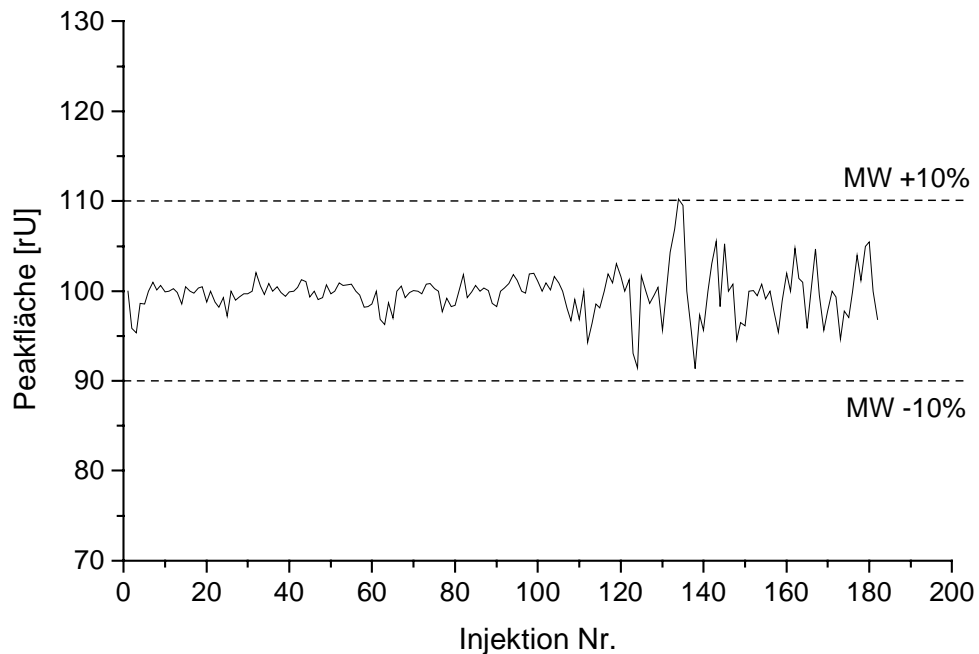


Abb. 24: Verlauf des transformierten Signals bei einer Kalibration alle 5 Meßwerte

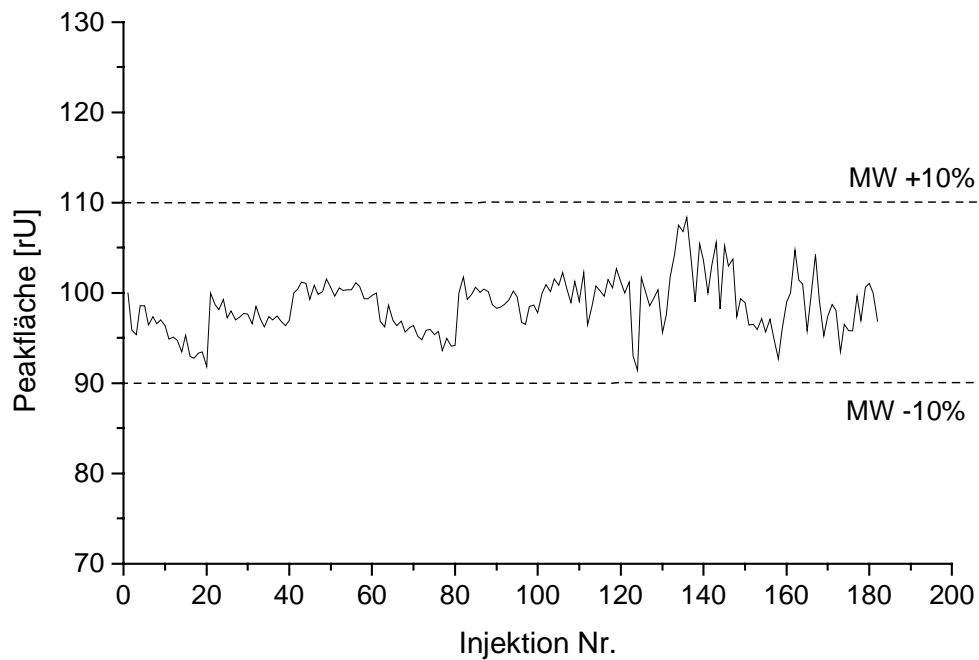


Abb. 25: Verlauf des transformierten Signals bei einer Kalibration alle 20 Meßwerte

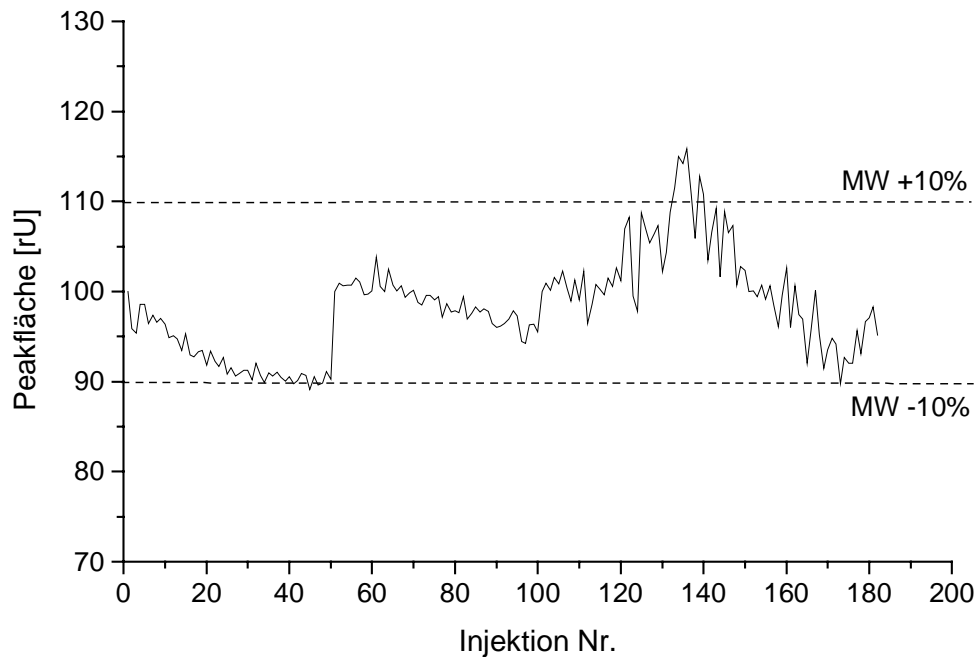


Abb. 26: Verlauf des transformierten Signals bei einer Kalibration alle 50 Meßwerte

Mit zunehmender Kalibrierhäufigkeit nimmt die Streuung des Signal wie erwartet ab. Vor allem bei der Kalibrierung nach jeweils 50 Messungen ist der negative Drift des ursprünglichen Meßsignals deutlich zu erkennen. Das stark abweichende Signal bei der circa 130. Messung beeinflusst das Ergebnis in diesem Bereich signifikant. Wenn bei der statistischen Untersuchung genau dieser Meßwert zur Kalibration herangezogen wird, ist die Abweichung der folgenden Werte sehr viel größer als normalerweise. So sind die einzigen Ausreißer aus den mit 10 Prozent Abweichung vom Mittelwert bezeichneten Bereichen um dieses Signal herum zu beobachten. Abgesehen von diesem Effekt, ist die Stabilität und damit die Genauigkeit des Assays, auch wenn nur nach jedem 50. Meßwert kalibriert wird, immer noch im Bereich des relativen Fehlers des ELISA-Tests.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die bei dieser Untersuchung ermittelten statistischen Daten für alle Kalibrationsroutinen [HARTUNG, 1995]. Die hier nicht in Form einer Abbildung dargestellten Verläufe liegen tendenziell immer genau zwischen den hier abgebildeten transformierten Signalen. So nimmt die Schwankung in dem Bereich um den 130. Meßwert mit zunehmender Kalibrationshäufigkeit ab. Bei der statistischen Auswertung variiert die Anzahl der berücksichtigten Werte, da die Meßpunkte, die auf den Wert 100 gesetzt wurden, nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen sind.

Tab. 3: Statistische Auswertung zu den unterschiedlichen Kalibrationsroutinen

<b>Kalibrationshäufigkeit [jeder i-te Wert]</b>	<b>Werte gesamt</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standard- abweichung</b>	<b>Relativer Fehler [%]</b>
5	145	99,64	2,80	2.81
10	163	99,71	2,88	2.89
15	169	97,95	3,06	3.12
20	172	98,54	3,07	3.11
25	174	98,75	3,49	3.53
30	175	97,38	3,48	3.57
40	177	97,45	3,79	3.89
50	178	98,19	5,59	5.69

Der relative Fehler gibt hier die durchschnittliche prozentuale Abweichung der Meßwerte vom Mittelwert an. Diese Abweichung nimmt erwartungsgemäß mit abnehmender Kalibrationshäufigkeit zu. Zieht man den ELISA-Test mit einem relativen Fehler von 10 Prozent heran, ist der heterogene Immunassay diesem deutlich überlegen. Selbst wenn nur alle 50 Messungen kalibriert wird, liegt der relative Fehler bei unter 6 Prozent. Bei der direkten Betrachtung der einzelnen Meßwerte liegen bei dieser Routine nur 3.9 Prozent aller Meßwerte außerhalb des 10 Prozent-Toleranzbereichs des ELISA. Diese Ausreißer resultieren zudem ausschließlich aus der eingeschleppten Luftblase, die zu dem starken Streusignal führt. Durch den Einbau einer geeigneten Blasenfalle und der Sättigung der Puffer mit Argon läßt sich dieses Risiko reduzieren und ein deutlich besseres Ergebnis erzielen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der, vermutlich durch Kapazitätsabnahme bedingte, negative Drift der Analysenwerte durch wiederholtes Kalibrieren des Systems kompensiert werden kann. Damit bleibt die Richtigkeit des Analysenergebnisses über einen langen Zeitraum gewährleistet. Anhand der statistischen Untersuchungen ist eine erneute Kalibration alle 25-30 Meßwerte empfehlenswert. Die Genauigkeit des Systems ist der des ELISA-Tests auch bei seltener durchgeführter Kalibrierung deutlich überlegen. Somit stellt der heterogene Elutionsassay eine gute Kombination aus hoher Genauigkeit und geringem Zeitaufwand durch hohe Automatisierbarkeit dar.

### 4.3.4 Optimierung des Injektionsverfahrens

Die Injektion der Probe in den Trägerstrom ist ein wichtiger Aspekt bei der Optimierung eines FIA-Assays. So spielt beim heterogenen Elutionsassay das Volumen der Probenschleife eine große Rolle bezüglich der Genauigkeit des Systems. Je größer das Volumen der injizierten Probe ist, desto größer ist auch die Menge an Analyt und somit das erhaltene Signal. Mit einer Zunahme der auswertbaren Peakfläche sinkt die Fehleranfälligkeit, da kleine Schwankungen, z.B. durch ungleichmäßige Pumpleistung oder Luftblasen, sich im Verhältnis zur Gesamtpeakgröße nicht mehr so stark auswirken.

Allerdings steigt mit einer größeren Probenmenge auch die für das Spülen und Eluieren erforderliche Zeit. Da dieses Meßsystem zur schnellen On-line-Detektion eingesetzt werden soll, ist es erforderlich, zu prüfen, inwieweit sich eine Vergrößerung der Probenschleife auf die zeitlichen Anforderungen an die Zyklusschritte auswirkt.

Dazu wurde eine Probe mit konstantem Faktor VIIa-Gehalt in Probenpuffer über drei Probenschleifen mit verschiedenen Volumina (50, 75 und 100  $\mu\text{L}$ ) in den Trägerstrom injiziert und vermessen. Die Spülzeit vor der Injektion betrug jedes Mal 2,5 Probenschleifen-Volumina [DOLAN, 1989].

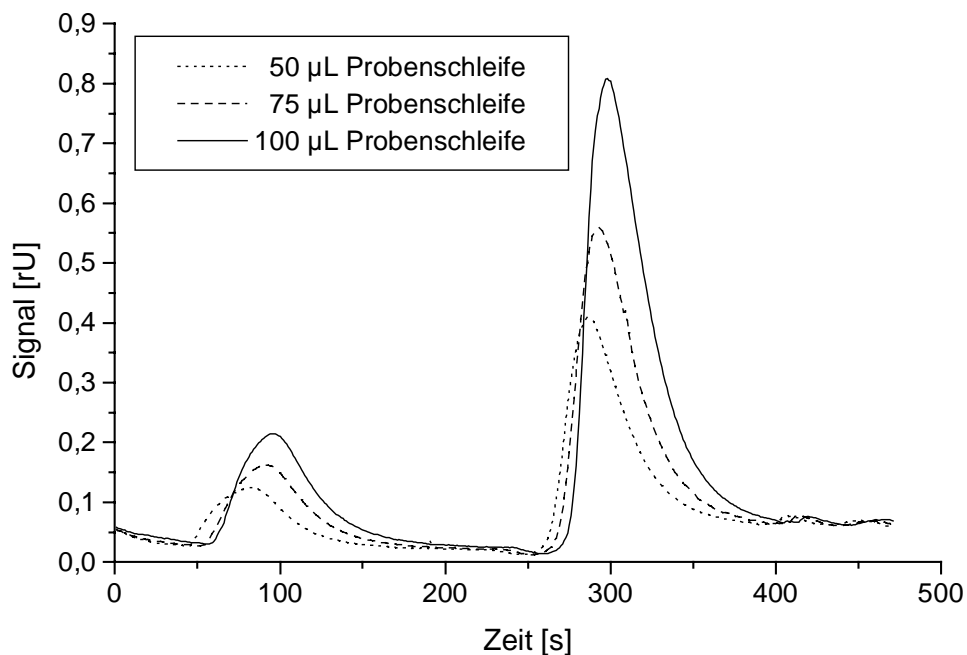


Abb. 27: Signalverlauf der Meßzyklen bei der Injektion verschiedener Probenvolumina (50, 75 und 100  $\mu\text{L}$ )

Abbildung 27 zeigt, daß sich die Vergrößerung der Probenschleife auf die Erfordernisse an Wasch- und Elutionszeit nur minimal auswirkt. Die Grundlinien werden im Vergleich zur Gesamtzykluszeit nur unwesentlich später erreicht. Werden allerdings Mediumproben vermessen, kann die Auswirkung auf die Waschzeit nicht vernachlässigt werden, da eine deutlich größere Menge an Fremdproteinen ausgewaschen werden muß. Das Integral des Elutionspeaks steigt jedoch mit jede Volumenvergrößerung um den Faktor 1.4, so daß eine deutliche Verbesserung der Genauigkeit erzielt werden kann.

Allerdings nehmen mit der Zunahme des Volumens der Probenschleife auch die erforderlichen Zeiten zum Befüllen und Injizieren zu. Da aber mit der verwendeten Software CAFCA das Spülen und Befüllen der Probenschleife bereits synchron während des Equilibrierungsschrittes ausgeführt werden kann, spielt diese Zeiterfordernis nur eine untergeordnete Rolle.

Abbildung 28 zeigt die Kalibrationsfunktionen, die sich bei der Verwendung der unterschiedlichen Probenschleifen (50, 75 und 100  $\mu\text{L}$ ) bei der Kalibrierung mit Faktor VIIa-Proben in Puffer ergeben haben. Die Meßwerte ergeben sich als Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

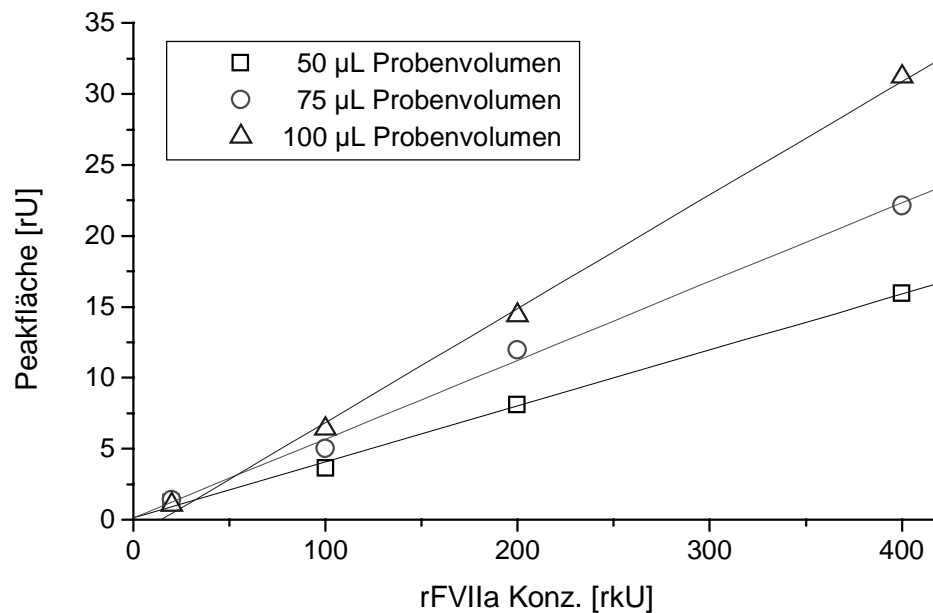


Abb. 28: Kalibrationsgeraden bei der Verwendung verschiedener Probenschleifen (50, 75 und 100  $\mu\text{L}$ )

Tab. 4: Übersicht über die verschiedenen Kalibrationsfunktionen

Probenvolumen	Kalibrationsfunktion	
50 $\mu\text{L}$	$Y = 0,14 + 0,0395 * X$	$R = 0,99883$
75 $\mu\text{L}$	$Y = 0,14 + 0,0555 * X$	$R = 0,99794$
100 $\mu\text{L}$	$Y = -1,15 + 0,08 * X$	$R = 0,99913$

Für alle drei in Tabelle 4 dargestellten Kalibrationsfunktionen ist der Regressionswert mit größer als 0.997 sehr gut, was für die gute Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Assays spricht. Die Steigung der Kalibrationsgeraden nimmt mit zunehmendem Probenvolumen etwa um den Faktor 1.4 zu. Dieses Ergebnis untermauert noch einmal die Aussage, daß eine Vergrößerung des injizierten Probenvolumens zu einer deutlichen Signalvergrößerung und damit zu einer Verbesserung der Genauigkeit des Assays führt.

Zur besseren Erläuterung dieser Annahme wird hier das folgende Beispiel berechnet: Eine kleine Luftblase, die beispielsweise das Signal um 1 rU vergrößert, führt je nach Volumen der Probenschleife zu sehr unterschiedlichen absoluten Abweichungen in der Faktor VIIa-Konzentration (siehe Tabelle 5).

Tab. 5: Übersicht der absoluten Abweichungen bei der Bestimmung der Faktor VIIa-Konzentration bei einer angenommenen Schwankung des Meßsignals von 1 rU

<b>Probenvolumen</b>	<b>Abweichung der FVIIa-Konz.</b>
50 µL	25.4 rkU
75 µL	18.0 rkU
100 µL	12.6 rkU

Diese absolute Abweichung spielt natürlich bei einer geringen Konzentration des Zielproteins in der Probe und damit kleinem Signal eine sehr viel größere Rolle, als bei großen Konzentrationen. Mit einer Verdoppelung des Volumens der Probenschleife halbiert sich jedoch die absolute Abweichung der zugeordneten Faktor VIIa-Konzentration, so daß in Bezug auf diesen Aspekt, wenn möglich, immer eine größere Probenschleife verwendet werden sollte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die verwendete Probenschleife anhand von zwei Aspekten ausgewählt werden sollte: Zum einen sollte ein möglichst großes Analytsignal angestrebt werden, um eine hohe Genauigkeit zu erzielen. Zum anderen darf aber auch die erforderliche Spülzeit, um die nicht gebundenen Proteine im Waschschrift auszuwaschen, nicht unverhältnismäßig ansteigen, da das System sonst nicht mehr die geforderten Attribute eines schnellen On-line-Systems erfüllt. Die Entscheidungsmöglichkeiten werden allerdings meist schon dadurch eingeschränkt, daß nur eine begrenzte Menge an Probenmaterial zur Verfügung steht. Alle Messungen werden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt und es muß auch ein 2-3faches Volumen der Probenschleife zum Spülen zur Verfügung stehen. Damit ergibt sich für eine Doppelbestimmung mit einer 100 µL-Probenschleife die Erfordernis von mindestens 1 mL Probe pro Quantifizierung.

Diese Menge kann bei einem Batch mit geringem Volumen und einer langen Kultivierungsdauer bei regelmäßiger Probennahme schon zu einer deutlichen Abnahme des Fermentationesamt volumens und damit zu einer geringeren Produktausbeute führen.

Für die Messungen der Fermentationsproben wird im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich eine 75 µL-Probenschleife verwendet, da diese im zu messenden Konzentrationsbereich die oben genannten Anforderungen erfüllt.

## 4.4 Messung von Fermentationsproben

Alle Fermentationsproben wurden von der Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt und stammen aus Prozessen der Entwicklungsabteilung. Alle Konzentrationsangaben erfolgen daher in relativen Einheiten [rkU]. Allerdings wird zur besseren Vergleichbarkeit und Diskussion der Meßergebnisse immer der selbe Umrechnungsfaktor verwendet. Die zur Verfügung gestellten Proben stammen aus Fed-Batch-Kultivierungen mit unterschiedlicher Medienzusammensetzung. Wegen der unterschiedlichen Konzentration anderer Bestandteile in den Proben, mußte die Länge des Waschschrilles immer entsprechend angepaßt werden, um einen optimalen Kompromiß zwischen vollständigem Ausspülen der Nebenbestandteile und kurzen Analysenzyklen zu finden.

Die erste Messung mit dem neu entwickelten System erfolgte mit einigen Proben einer Fed-Batch-Kultivierung. Die Proben wurden an verschiedenen Tagen entnommen und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung unter den in Kapitel 4.2 und 4.3 optimierten Bedingungen. Vor der Messung wurde das System mit Faktor VIIa-Standard in Medium kalibriert.

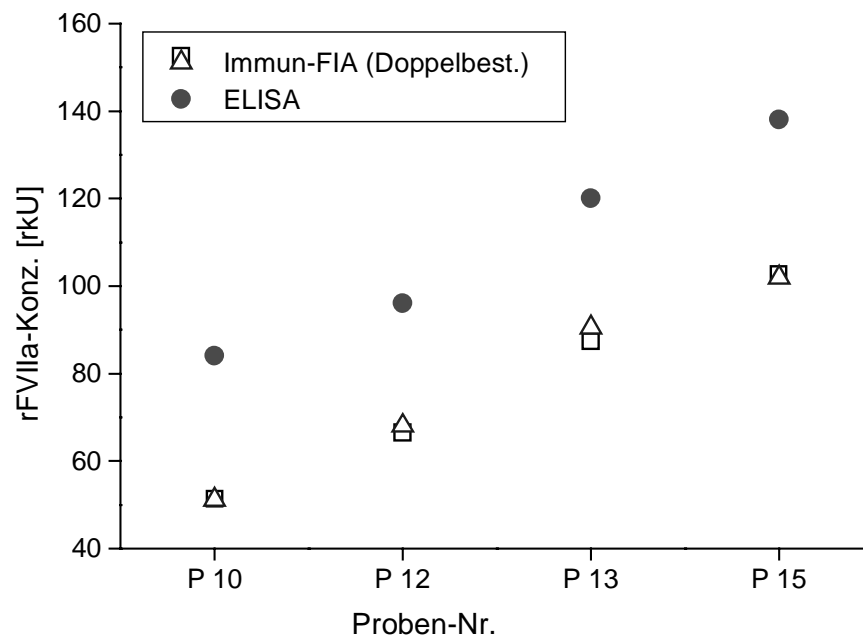


Abb. 29: rFaktorVIIa-Konzentration in Fermentationsproben gemessen mit der Immun-FIA und dem ELISA

Die mit der Immun-FIA ermittelten Werte sind deutlich niedriger als die, die mit dem ELISA, der üblicherweise als Standardanalytik verwendet wird, erhalten wurden. Dieses Ergebnis ist jedoch verständlich, da der in dem ELISA-Test verwendete Antikörpertyp sowohl die korrekt  $\gamma$ -carboxylierte als auch alle anderen aktivierten und nicht aktivierten Formen von Faktor VII bindet und diese somit auch detektiert werden. Der in dem heterogenen Immunassay verwendete Antikörpertyp bindet dagegen nur die korrekt  $\gamma$ -carboxylierte Form von Faktor VIIa, die nur einen Teil der exprimierten Gesamtmenge des Proteins ausmacht.

Die Berechnung des Verhältnisses zwischen den beiden Konzentrationen führt zu dem in Tabelle 6 dargestellten Ergebnis:



Tab. 6: Übersicht über die mit der Immun-FIA und dem ELISA ermittelten Konzentrationswerte

Proben-Nr.	Mittelwert der Doppelbestimmung [rkU]	ELISA [rkU]	Anteil an korrekt $\gamma$ -carbox. FVIIa [%]
P 10	51,2	84	61.0
P 12	67,2	96	70.1
P 13	89,0	120	74.1
P 15	102,4	138	74.2

Demnach beträgt der Anteil an korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa in den Proben circa 70 Prozent. Dies entspricht auch dem Erfahrungswert, der sich aus dem Aufreinigungsprozeß ergibt. Dabei findet als erster Aufreinigungsschritt ein Affinitäts-chromatographischer Schritt mit dem gleichen Antikörpertyp (F1A2) statt. Die Ausbeute bei diesem Schritt beträgt etwa 60 Prozent korrekt  $\gamma$ -carboxylierten Faktor VIIa, bezogen auf die per ELISA vorab bestimmte Gesamtmenge des Proteins [CHRISTENSEN, 1998]. Da bei solchen chromatographischen Schritten, auch bei der Verwendung einer Affinitätssäule, nie hundertprozentige Ausbeuten erzielt werden können, entspricht der hier gemessene Anteil von circa 70 Prozent wahrscheinlich dem tatsächlichen Wert. Eine Bestimmung des Anteils an korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa ist routinemäßig nicht möglich, da der entsprechende, in der Immun-FIA verwendete Antikörpertyp sich nicht für einen ELISA-Test eignet und daher keine direkten Vergleichswerte zur Verfügung stehen.

Im zweiten Fall wurden Proben aus der Anfangsphase einer weiteren Fed-Batch-Kultivierung, die eine deutlich geringere Faktor VIIa-Konzentration enthalten, vermessen. Die Medienzusammensetzung entspricht der der vorangegangenen Messung. Die Proben wurden wiederum an verschiedenen Tagen entnommen und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Messung erfolgte als Mehrfachbestimmung der Einzelproben.

An dem Ergebnis (Abbildung 30) fällt auf, daß bei dieser Untersuchung der mit der Immun-FIA bestimmte Konzentrationswert für Faktor VIIa leicht über dem mit dem ELISA gemessenen Wert, beziehungsweise im gleichen Größenordnungsbereich liegt. Dies kann mehrere Ursachen haben: Zum einen ist die Konzentration des Zielanalyten hier deutlich geringer als bei der vorherigen Untersuchung und liegt im unteren Konzentrationsbereich für den das System kalibriert ist. Dadurch wirken sich, wie in Kapitel 4.3.5 bereits ausführlich geschildert, kleine Schwankungen des Signals bereits in großen Änderungen des absoluten Konzentrationswertes aus. Zum anderen ist der als Referenz verwendete ELISA-Test ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich, da die Proben mehrfach verdünnt werden müssen, nicht mehr so genau wie bei höheren Konzentrationen.

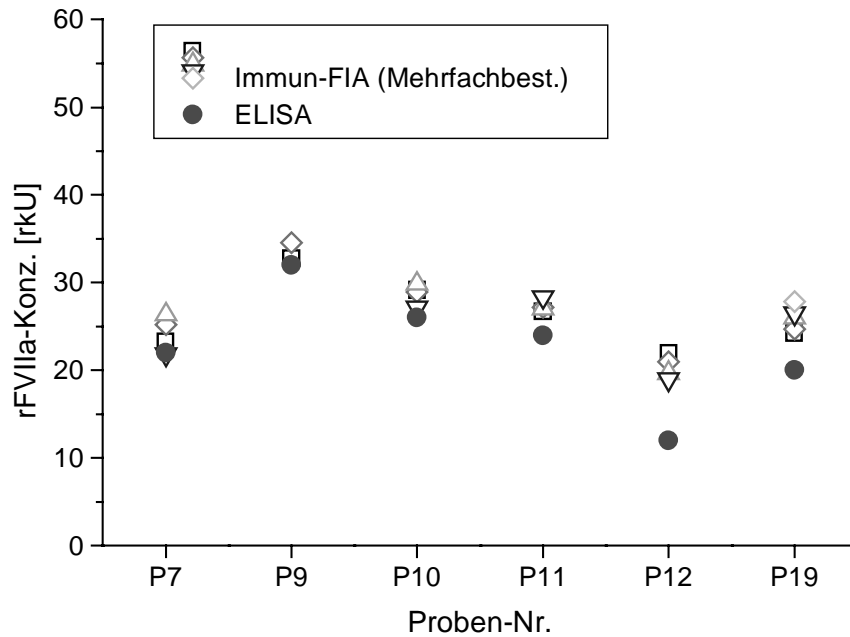


Abb. 30: rFaktorVIIa-Konzentration in Fermentationsproben gemessen mit der Immun-FIA und dem ELISA

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung dieses Ergebnisses ist, daß die Zellen am Anfang der Kultivierung, wenn erfahrungsgemäß noch keine sehr hohen Produktionsraten vorliegen, eventuell sogar überwiegend das korrekt  $\gamma$ -carboxylierte Produkt bilden. Bei höheren Produktionsraten, wenn die Zellen unter größerem "Produktionsdruck/-streß" stehen, nimmt dann eventuell die Zahl der fehlerhaften posttranslatorischen Modifikationen zu, so daß der Anteil an korrekt exprimiertem Produkt abnimmt. Zur Untermauerung dieser These sind konkrete Kenntnisse über den Metabolismus und das Expressionsverhalten der Zelllinie erforderlich, die jedoch leider nicht verfügbar sind.

In einer weiteren Messung wurden wiederum Proben aus einer Fed-Batch-Kultivierung untersucht. Allerdings wurde hier ein verändertes Medium, das zusätzlich noch mit Aminosäuren und Vitaminen angereichert wurde, verwendet. Die Faktor VIIa-Konzentration in den Proben war wieder in einem höheren Konzentrationsbereich. Die Quantifizierung sollte daher einen Wert unterhalb des ELISA-Ergebnisses ergeben. Die Proben wurden wiederum an verschiedenen Tagen entnommen und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Messung erfolgte, da nur ein geringes Probenvolumen zur Verfügung stand, als Einzelbestimmung der Proben.

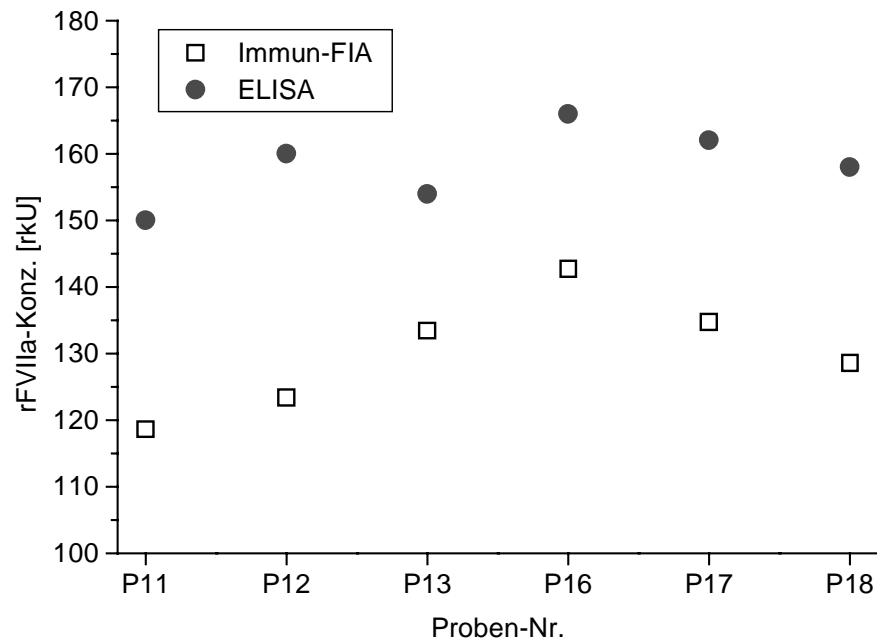


Abb. 31: rFaktorVIIa-Konzentration in Fermentationsproben gemessen mit der Immun-FIA und dem ELISA

Die Ergebnisse dieser Messung entsprechen tendenziell wieder der ersten Untersuchung. Die Meßwerte für die Faktor VIIa-Konzentration liegen bei der Quantifizierung über die Immun-FIA wieder deutlich unterhalb der mit dem ELISA gemessenen Werten. Der berechnete Anteil an korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Übersicht über die mit der Immun-FIA und dem ELISA ermittelten Konzentrationswerte

Proben-Nr.	Wert der Einzelbestimmung [rkU]	ELISA [rkU]	Anteil an korrekt $\gamma$ -carbox. FVIIa [%]
P11	118,62	150	79.1
P12	123,35	160	77.1
P13	133,42	154	86.6
P16	142,71	166	86.0
P17	134,73	162	83.2
P18	128,57	158	81.4

Der Anteil an  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa in den Proben beträgt im Mittel circa 80 Prozent. Dieser Wert ist etwas höher als in den Proben des ersten Fermentationsprozesses. Dieses Ergebnis ist allerdings aufgrund der veränderten Mediumzusammensetzung plausibel, da dieses die Produktion beeinflussen kann. Die ELISA-Werte liegen im Vergleich zur ersten Messung selbst beim direkten Vergleich der selben Kultivierungstage deutlich höher, so daß in jedem Fall von einem anderen Produktionsverhalten ausgegangen werden kann.

Bei den beiden folgenden Messungen wurden die Zellen in zwei von den bisherigen Untersuchungen verschiedenen Medientypen kultiviert, so daß auch hier ein völlig anderes Produktionsverhalten vorliegen kann. Beide Medien enthalten einen großen Zusatz an Aminosäuren und Vitaminen allerdings in unterschiedlichen Mengenverhältnissen. Bei beiden Fermentationsläufen wurden die Proben über einen längeren Zeitraum und auch über einen weiten Konzentrationsbereich entnommen, so daß hier auch die These bezüglich der Qualität des produzierten Faktor VIIa weiter untersucht werden kann.

Für die erste Messung wurden über einen Zeitraum von 12 Tagen Proben aus der Kultivierung entnommen und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung der Einzelproben. Vor der Messung wurde eine Kalibration mit rFaktor VIIa in frischem Medium durchgeführt. Dabei ist anzumerken, daß das bei der Kalibration verwendete Medium nicht mit dem der Fermentationsproben übereinstimmt. Allerdings sind die daraus zu erwartenden Effekte auf das Meßergebnis gering. Abbildung 32 zeigt das Ergebnis für die Messung mit dem ELISA und der Immun-FIA.

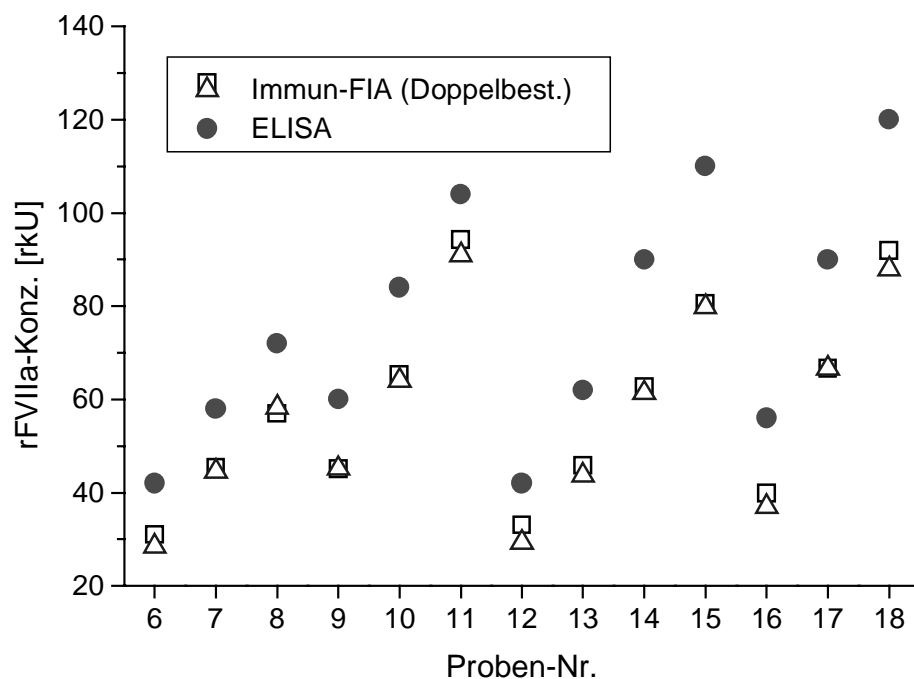


Abb. 32: rFaktorVIIa-Konzentration in Fermentationsproben gemessen mit der Immun-FIA und dem ELISA

Bei dieser Fermentation kann wiederum eine sehr gute Korrelation der mit der Immun-FIA gemessenen Faktor VIIa-Konzentration mit den von Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) ermittelten ELISA-Werten festgestellt werden. Der Anteil an korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa beläuft sich im Mittel auf 75 Prozent. Ein Übersicht über die Meßwerte gibt Tabelle 8.

Tab. 8: Übersicht über die mit der Immun-FIA und dem ELISA ermittelten Konzentrationswerte

Proben-Nr.	Mittelwert der Doppelbestimmung [rkU]	ELISA [rkU]	Anteil an korrekt $\gamma$ -carbox. FVIIa [%]
P6	29,74	42	70.8
P7	44,93	58	77.5
P8	57,59	72	79.9
P9	45,13	60	75.2
P10	64,66	84	76.9
P11	92,60	104	89.0
P12	31,15	42	74.2
P13	44,76	62	72.2
P14	62,02	90	68.9
P15	80,18	110	72.9
P16	38,44	56	68.6
P17	66,69	90	74.1
P18	89,85	120	74.9

Die in Abbildung 32 aufgetragenen Meßwerte zeigen auf den ersten Blick keine signifikante Tendenz bezüglich des Anteils an korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa. Trägt man allerdings die mit dem ELISA und die mit der Immun-FIA ermittelten Konzentrationen direkt gegeneinander auf, so zeigt sich eine deutliche Tendenz der Meßwerte (Abbildung 33).

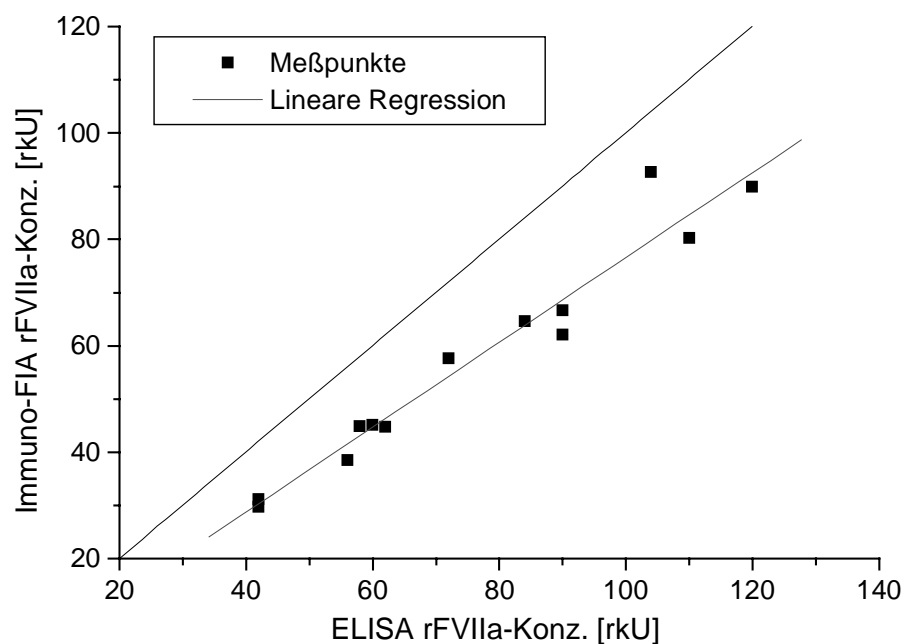


Abb. 33: Direkte Auftragung der mit dem ELISA und der Immun-FIA gemessenen rFaktorVIIa-Konzentrationen aus den Fermentationsproben

Die Auftragung macht deutlich, daß die Zunahme der Gesamtkonzentration von Faktor VIIa in der Probe mit einer Abnahme des Anteils an korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa einhergeht. Die gemessenen maximalen Faktor VIIa-Konzentrationen liegen auch nicht außerhalb des in Kapitel 3.4.2. dargestellten linearen Meßbereichs des Assays (vergleiche Abbildung 18), so daß die Abweichung nicht auf derartige Effekte zurückzuführen ist. Die Steigung der an die Meßwerte angenäherten linearen Funktion beträgt 0.8.

Das hier gewonnenen Ergebnis untermauert die These, daß der Anteil von  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa von der Gesamtmenge an exprimiertem Faktor VIIa abhängt. Die bereits bei geringeren Konzentrationen auftretende stärkere Abweichung bei dieser Messung (im Vergleich zu Abbildung 30) ist vermutlich auf die veränderte Medienzusammensetzung zurückzuführen, die das Produktionsverhalten der Zellen beeinträchtigen kann.

Der bei der Fermentation der folgenden Messung verwendete Medientyp enthält zwar auch einen großen Zusatz an Vitaminen und Aminosäuren aber weniger als die letztgenannte Untersuchung. Für diese Messung wurden über einen Zeitraum von 20 Tagen Proben entnommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Messung aller Proben erfolgte als Doppelbestimmung. Die Kalibration vor der Messung wurde mit rFaktor VIIa in frischem Medium durchgeführt, wobei dieses wiederum nicht mit dem der Fermentationsproben übereinstimmt. Im Laufe der Messung wurde keine weitere Kalibration durchgeführt.

Abbildung 34 zeigt das Ergebnis der Quantifizierung von Faktor VIIa mittels ELISA und dem Immunassay.

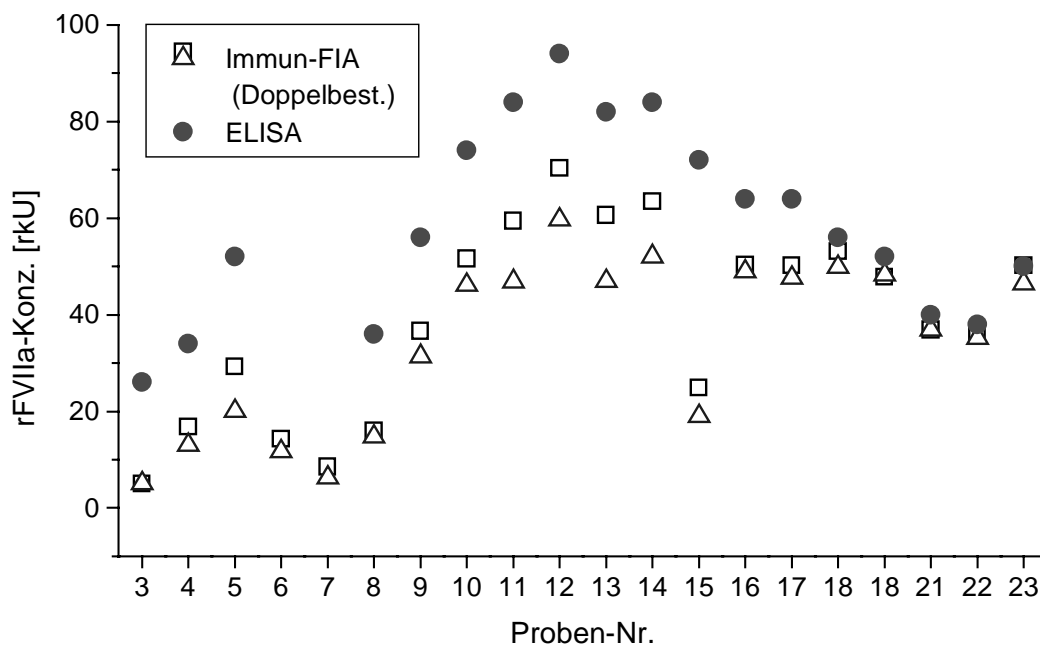


Abb. 34: rFaktorVIIa-Konzentration in Fermentationsproben gemessen mit der Immun-FIA und dem ELISA

Der stark abweichende Meßwert bei der Probe Nr. 15 kann als Ausreißer gewertet werden, da kein weiterer Meßwert mit dieser Tendenz auftritt. Ansonsten stimmt auch bei dieser Messung der Gesamtverlauf der Meßdaten wieder gut mit dem der Werte überein, die mit dem ELISA ermittelt wurden. Allerdings ist bei dieser Untersuchung eine wesentlich stärkere Abweichung der einzelnen Meßwerte des Immun-Assays zu beobachten als bei allen vorangegangenen Untersuchungen. Auffällig ist, daß bei anfänglich sehr geringen Faktor VIIa-Konzentrationen die Abweichung der mit der Immun-FIA ermittelten Werte sehr viel größer ist, als bei allen vorangegangenen Untersuchungen. Dieser Effekt kann darauf zurückzuführen sein, daß sich die Zellen erst auf diese Medienzusammensetzung einstellen müssen und ihren Metabolismus leicht umstellen. Dies kann zu dem verstärkten Auftreten von Fehlern bei der posttranslatorischen Modifikation des Zielproteins führen. Für diese These spricht, daß im weiteren Verlauf der Anteil an korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa deutlich zunimmt (siehe Abbildung 35). Der Wert bei Probe Nr. 15 stellt einen Ausreißer dar.

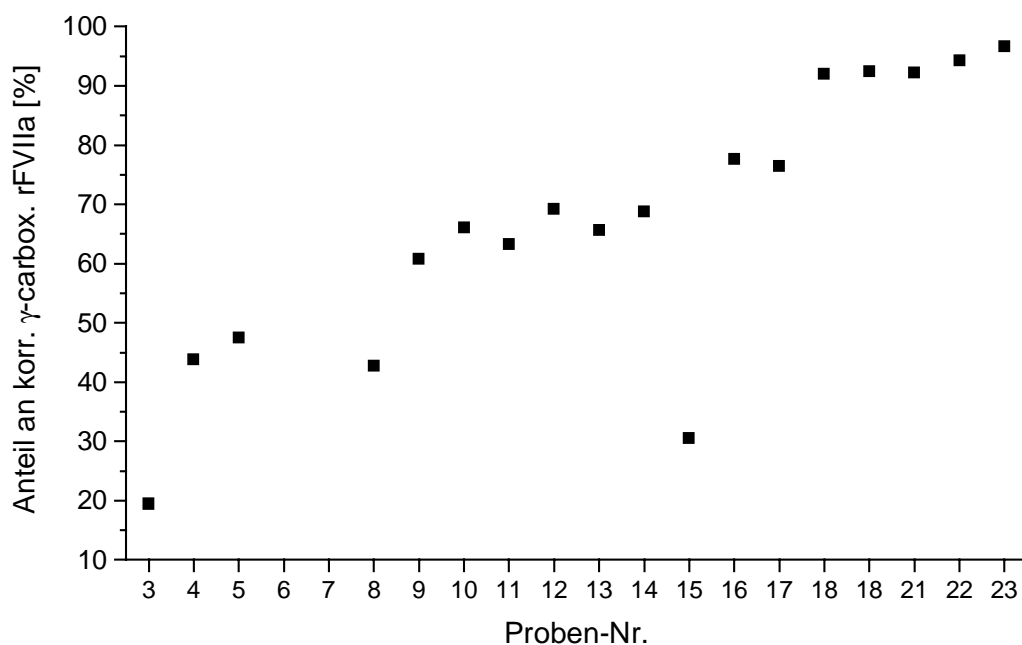


Abb. 35: Auftragung des über das Verhältnis ELISA-/Immun-FIA-Konzentration ermittelten Anteils an korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem rFaktorVIIa in den Fermentationsproben

Da für die mit der Immun-FIA bestimmten Konzentrationswerte von  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa allerdings keine Vergleichswerte vorliegen, kann es sich auch um einen Effekt handeln, der durch die Immunkartusche hervorgerufen wird. Allerdings liegt die Anzahl der Messungen mit 40 immer noch im Rahmen der unter 4.3.4 ermittelten Kalibrationsroutinen. Zudem ist gegen Ende der Messung keine zunehmende Abweichung der Meßwerte innerhalb einer Doppelbestimmung zu beobachten, was ebenfalls gegen eine Beeinflussung der Meßwerte durch die hohe Meßzahl spricht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der entwickelte heterogene Immunassay für die Messung von Fermentationsproben gut geeignet ist. Die gemessenen Konzentrationsverläufe stimmen bei allen Untersuchungen mit denen, die mit dem ELISA ermittelt wurden, überein. Die auftretenden Abweichungen der Meßergebnisse zu niedrigeren Konzentrationen als die ELISA-Werte sind plausibel, da der Immunassay durch die Verwendung eines anderen Antikörpers nur korrekt  $\gamma$ -carboxylierten Faktor VIIa bindet.

Unter der Annahme, daß die Meßergebnisse des heterogenen Immunassays korrekt sind, können bei den einzelnen Fermentationen sehr interessante Erkenntnisse über die Produktqualität und das Expressionsverhalten gewonnen werden. Allerdings wäre es zur Untermauerung der getroffenen Aussagen für weitere Untersuchungen wichtig, eine entsprechende Referenzanalytik für korrekt  $\gamma$ -carboxylierten Faktor VIIa zu finden. Ein von Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) für diese Zwecke entwickelter ELISA zeigt eine dermaßen hohe Standardabweichung, daß er für die Quantifizierung nicht herangezogen werden kann. Untersuchungen zur Trennung der verschiedenen Glykoformen von Faktor VIIa mittels Kapillarelektrophorese (CE) haben zwar zu guten Ergebnissen geführt, erlauben aber keine absolute Quantifizierung der einzelnen Formen. Zudem ist diese Methode für die Messung der Fermentationsproben nicht geeignet, da eine Mindestkonzentration von 250  $\mu\text{g/mL}$  Faktor VIIa in den Proben vorhanden sein muß [RIECHEL, 1998].



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Herstellung pharmakologisch relevanter Proteine durch biotechnologische Verfahren gewinnt mehr und mehr an Bedeutung. Dabei spielen besonders Tierzellkultivierungen zur Herstellung komplexer Verbindungen (z.B. Blutgerinnungsfaktoren) eine immer größer werdende Rolle. Die zur Produktanalytik standardmäßig verwendeten ELISA-Tests zeichnen sich zwar durch eine hohe Empfindlichkeit aus, sind aber sehr zeit- und arbeitsintensiv und schlecht automatisierbar. Schnellere und vollständig automatisierbare Analysensysteme lassen sich durch die Kombination von Fließinjektionsanalysensystemen mit immunchemischen Detektionsverfahren realisieren. Dadurch ist es möglich, den hohen Anforderungen bezüglich einer hohen Selektivität gerecht zu werden und gleichzeitig eine einfache Handhabung des Systems zu gewährleisten. Vollständige Automatisierung ermöglicht eine kontinuierliche Prozeßbeobachtung, die ein schnelles Eingreifen während der Prozeßführung erlaubt. Beispielsweise kann die Effizienz einer im industriellen Maßstab durchgeführten Kultivierung durch die genaue Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes erhöht werden. Dies führt zu einer höheren Gesamtzahl an Prozessen und damit zu einer deutlichen Effektivitätssteigerung der industriellen Anlage.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für den von der Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) in Tierzellkultivierungen hergestellten rekombinanten Blutgerinnungsfaktor Faktor VIIa ein in eine FIA integrierter Immunassay entwickelt. Das verwendete System basiert auf einem bereits bei anderen Analyten erfolgreich eingesetzten Verfahren, dem heterogenen Elutionsassay.

Bei diesem Assay werden die Antikörper im Überschuß auf einem festen Trägermaterial immobilisiert und in einer Durchflußkartusche im Fließsystem implementiert. Nach der Injektion einer Probe in den Trägerpuffer wird diese in die Kartusche transportiert, wo das Antigen (Zielanalyt) quantitativ an die immobilisierten Antikörper bindet. Die anderen Bestandteile der Probe werden vollständig ausgewaschen, und so eine vollständige Isolierung des Analyten erreicht. Anschließend wird die Antikörper/Antigen-Bindung durch die Anwendung eines entsprechenden Elutionsschrittes aufgebrochen und das Antigen eluiert. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Proteineigenfluoreszenz und die anschließende Integration des Meßsignals. Für diese Methode ist es nicht erforderlich Substanzen zu markieren. Nach einem kurzen Equilibrierungsschritt kann bereits der nächste Meßzyklus durchgeführt werden. Die Steuerung und die gesamte Datenaufnahme des Systems erfolgt über einen PC mit der Software CAFCA, die am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover entwickelt wurde und kommerziell erhältlich ist. Die Datenauswertung wird nach vorangegangener Kalibration ebenfalls on-line vorgenommen, das heißt, die Konzentration des Analyten in der letzten Probe ist sofort zugänglich.

Da das System vollständig automatisiert ist, kann es als stand-alone Meßanalytik betrieben werden. Es kann entweder direkt über eine zellfreie Probennahme on-line an den Bioprozeß angeschlossen oder mit einem Autosampler gekoppelt werden. Eine On-line-Anbindung ist allerdings eher bei Prozessen mit sich schnell ändernden Produktkonzentrationen, wie z.B. Fermentationen von Hefen und Bakterien, sinnvoll. Bei den tierischen Zellkulturen liegt das mögliche Einsatzfeld eher im Bereich der Off-line-Überwachung und Dokumentation der Prozesse. Hier wäre zum Beispiel eine Analysenstation, die gleichzeitig mehrere Bioprozesse überwacht, denkbar.

Dieser Immunassay hat gegenüber der konventionellen ELISA-Methode einige entscheidende Vorteile:

- Durch die Immobilisierung stehen die verwendeten Antikörper für eine hohe Zahl von Meßzyklen zur Verfügung, wodurch die Kosten für Verbrauchsmittel pro Analyse sehr niedrig bleiben.
- Die Analysenzeiten pro Bestimmung liegen bei 5-10 Minuten für eine Einzelbestimmung. Dieser Wert liegt beträchtlich unter dem Aufwand für einen konventionellen ELISA, bei dem eine Vielzahl von Arbeitsschritten (Inkubation, Waschen, etc.) notwendig ist.
- Für eine Messung mit der Immun-FIA können die unverdünnten Proben direkt injiziert werden, da der lineare Meßbereich des Assays sehr groß ist. Dies vermindert die Fehler-rate, da keine weiteren Verdünnungsschritte vorgenommen werden müssen. Eine Vergrößerung des Meßbereichs ist ohne großen Aufwand durch die Vergrößerung des Probevolumens möglich (kumulativer Effekt), da der Assay nicht von der Gesamtprotein-Konzentration, sondern nur von der Menge an Antigen (Zielprotein) abhängig ist.

Zur Entwicklung eines einsatzfähigen Assays standen drei verschiedene Antikörpertypen zur Verfügung, von denen zwei alle Formen von Faktor VII mit unterschiedlicher Affinität binden und einer nur die korrekt  $\gamma$ -carboxylierte Form. Einer der erst genannten Antikörpern (mab FVII-4 F9 (F9A2)) zeigte im Verlauf der Untersuchungen eine so große Affinität zu Faktor VIIa, daß er für den Einsatz in einem Elutionsassay nicht geeignet ist. Für den anderen Typ (mab FVII-4 F7 (F7A2)) konnten im Rahmen der Untersuchungen keine Bedingungen gefunden werden, die das Antigen schnell eluieren und dabei nicht zu starken Störsignalen führen.

Für den dritten, selektiven Antikörpertyp (mab FVII (F1A2)) konnte ein funktionierender Assay etabliert werden, der eine schnelle und automatisierte Quantifizierung erlaubt. Zur Elution wird dabei ein Citrat-haltiger Puffer verwendet, der dem Antikörper/Antigen-Komplex das zur Bindung notwendige  $\text{Ca}^{2+}$  entzieht und so die Bindung löst. Der große Vorteil dieser Methode liegt in der Elution bei einem neutralen pH-Wert, durch die die biologische Aktivität der immobilisierten Antikörper auch über eine große Zahl von Meßzyklen hinweg erhalten bleibt. Auch konnte für diesen Assay über einen großen Konzentrationsbereich eine lineare Kalibrationsfunktion aufgenommen werden.

Die hohe Langzeitstabilität des entwickelten Assays konnte durch Messung mit Puffer- und Mediumproben gezeigt werden. Dies bezieht sich sowohl auf die Stabilität der immobilisierten Antikörper als auch auf die Reproduzierbarkeit des Meßsignals während einer Dauermessung über mehr als 24 Stunden. Die Standardabweichung des Assays lag bei all diesen Untersuchungen unterhalb der für den ELISA-Test ermittelten Standardabweichung von zehn Prozent. Die gute Stabilität ist zu einem großen Teil auf die milden Elutionsbedingungen zurückzuführen.

Durch die Anwendung verschiedener statistischer Verfahren und deren Interpretation konnte gezeigt werden, daß die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse durch den Einsatz geeigneter Kalibrationsroutinen sogar noch gesteigert werden kann. Der auftretende relative Fehler liegt, selbst wenn nur alle 50 Meßwerte neu kalibriert wird, immer noch unter 6 Prozent, und damit unterhalb des relativen Fehlers des ELISA. Das Signal zeigt in diesem Bereich allerdings schon einen deutlichen negativen Drift. Eine regelmäßige Neukalibration des Systems alle 25-30 Messungen ist aber voll ausreichend, um eine gleichbleibend gute, über der des ELISA liegende Genauigkeit zu gewährleisten.

Die Messung von Fermentationsproben mit dem entwickelten heterogenen Immunassay war ohne Schwierigkeiten möglich und zeigte sehr gute Ergebnisse. Die ermittelten Konzentrationswerte zeigen in allen untersuchten Fällen die gleichen Verläufe, aber etwas niedrigere Absolutwerte als die Ergebnisse des ELISA-Tests. Dieses Ergebnis ist jedoch verständlich, da der in dem ELISA-Test verwendete Antikörpertyp sowohl die korrekt  $\gamma$ -carboxylierte als auch alle anderen aktivierten und nicht aktivierten Formen von Faktor VIIa bindet und detektiert. Der in dem heterogenen Immunassay verwendete Antikörpertyp bindet dagegen nur die korrekt  $\gamma$ -carboxylierte Form von Faktor VIIa, die nur einen Teil der exprimierten Gesamtmenge des Proteins ausmacht. Aus der Betrachtung dieses Verhältnisses der beiden Ergebnisse können interessante Erkenntnisse über das Produktionsverhalten der verwendeten Zellen unter den gewählten Kultivierungsbedingungen gezogen werden. Die Ergebnisse zeigen, daß der durchschnittliche Anteil von korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa bei 70-80 Prozent liegt. Allerdings nimmt dieser Anteil mit zunehmender Gesamtkonzentration an Faktor VIIa ab. Dies legt die Vermutung nahe, daß mit zunehmender Produktivität auch der Anteil an Protein mit fehlerhaften Modifikationen zunimmt. Bei einem anderen Prozeß mit einer veränderten Medienzusammensetzung nimmt der Anteil von korrekt  $\gamma$ -carboxyliertem Faktor VIIa erst im Laufe der Zeit zu. Möglich ist, daß sich die Zellen diesen neuen Bedingungen erst anpassen mußten, bevor sie optimal produzieren konnten. Zum Beweisen dieser Schlußfolgerung wäre allerdings eine verlässliche Referenzanalytik für korrekt  $\gamma$ -carboxylierten Faktor VIIa erforderlich. Eine solche Analytik ist derzeit aber leider noch nicht verfügbar. Dennoch liefern die gewonnenen Ergebnisse interessante neue Erkenntnisse und Ansätze, die in Zukunft weiter verfolgt werden sollten.

Die verwendete Meßtechnik kann in einigen Punkten noch weiter optimiert werden. So ist durch eine Erhöhung des Volumenstroms eine schnellere Meßfrequenz möglich. Dies würde den Einsatz des Systems in der Analytik von Aufreinigungsprozessen interessant machen. Im Moment ist eine Analysenzeit von circa fünf Minuten für Faktor VIIa in Puffer zu lang, um zum Beispiel den Durchbruchpunkt eines neuen Säulenmaterials on-line zu bestimmen. Ein

erhöhter Volumenstrom würde allerdings auch einen höheren Druck in der Anlage bewirken und unter anderem andere Kartuschen und Trägermaterialien, wie Fast-Flow-Materialien erfordern. Bei einer Steigerung des Volumenstroms muß allerdings auch berücksichtigt werden, daß die Verweilzeit des Antigens in der Kartusche abnimmt, was zur Abnahme der Kapazität führen kann.

Da das Meßsystem zur Untersuchung von Kultivierungsproben eingesetzt wird, müssen Maßnahmen gegen den Bewuchs mit Mikroorganismen getroffen werden. Dazu ist es bei langen Meßreihen sinnvoll, das gesamte System regelmäßig mit beispielsweise einem hohen pH-Wert oder Natriumazid-haltigem Trägerpuffer zu spülen. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Antikörper möglichst nicht geschädigt werden. Diese Maßnahme wurde bisher unterlassen, da das System bei den vorgenommenen Messungen nicht länger als 26 Stunden in Betrieb war. Nach Beendigung der Messungen wurde das ganze System ohne Antikörperkartusche einem Waschschrift mit Mucosol-Lösung unterzogen, der alle Mikroorganismen ausspült.

Der Anwendungsbereich für den heterogenen Immunassay ist jedoch nicht nur auf biotechnologische Prozesse beschränkt. Auf der Basis der Antikörper/Antigen-Reaktion erschließt sich ein weites Feld für weitere Anwendungen. So ist zum Beispiel in der medizinischen Diagnostik ein Einsatz in der Blut-, Serum- oder Urinanalytik denkbar. Die Proben sind ähnlich komplex wie Fermentationsmedien und können ähnlich hohe Schwankungsbreiten in der Analytkonzentration zeigen. Der bereits erwähnte kumulative Effekt des Assays kann auch zur Analyse von Fremdstoffen in Wasser oder Nahrungsmitteln herangezogen werden. Durch das Injizieren großer Probenvolumina können so auch Substanzen, die nur in Spuren vorhanden sind, in der Kartusche angereichert und anschließend detektiert werden.

Aufgrund seiner Vielseitigkeit, Schnelligkeit und guten Reproduzierbarkeit ist der heterogene Immunassay den standardmäßig eingesetzten Analysenverfahren gleichwertig oder gar überlegen. Das System kann somit eine wertvolle Ergänzung der bisherigen Verfahren darstellen, insbesondere, wenn bei der Entwicklung und Optimierung der Prozesse aktuelle Informationen über die Produktkonzentration erforderlich sind. Allerdings ist die Akzeptanz automatisierter immunochemischer Systeme für industrielle Applikationen immer noch relativ gering. Zukünftige Forschungsaktivitäten sollten an diesem Punkt ansetzen und versuchen, immunochemische On-line-Verfahren in der Industrie weiter zu etablieren.

## 6 Anhang

### 6.1 Immobilisierung der Antikörper

Für ein Gelvolumen von 1 mL werden 350 mg lyophilisiertes Trägermaterial zur Aktivierung der Bindungsgruppen in 1 mM HCl suspendiert und über eine Fritte mit weiteren 60 mL 1 mM HCl gewaschen. Die Antikörper werden in 1.6 mL Immobilisierungspuffer gelöst und zu dem aktivierten Trägermaterial gegeben. Diese Suspension wird dann 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend in eine 1 mL MoBiTec-Durchflußkartusche (Göttingen, Deutschland) überführt. Ungebundene Antikörper werden mit 5 mL Immobilisierungspuffer ausgewaschen, bevor das Gel zum Blocken der verbleibenden aktiven Gruppen für 2 h bei Raumtemperatur in 1.0 M Ethanolamin (pH 8.0) gegeben wird. Danach wird die Matrix je dreimal mit saurem und basischem Spülpuffer gewaschen.

### 6.2 Entsalzen des Faktor VIIa-Standards

Das von Novo Nordisk A/S gelieferte Faktor VIIa Lyophilisat enthält Reste von Mannitol und Glycylglycin, die vor der Verwendung des Proteins als Standard entfernt werden müssen. Dazu wird eine NAP-5 Säule (Pharmacia; Uppsala, Schweden) verwendet. Die 2.4 mg Protein werden in 500 µL Wasser (bidest.) gelöst und auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgt mit 500 µL Faktor VII-Probenpuffer. Die Lösung wird mit dem gleichen Puffer auf eine Konzentration von 1.0 mg/mL Protein verdünnt und in Aliquoten von 100 µl bei -20°C gelagert. Die Überprüfung der rFaktor VIIa-Konzentration des Standards erfolgt über das kommerziell erhältliche ELISA-Kit der Firma DAKO (Glostrup, Dänemark)

### 6.3 Geräteliste

6-Port-Injektionsventil (Injektor)	Knauer, No. V7042, Version 0790
7-Port-Schaltventil (Selektor)	Knauer, No. 7227, Version 0191
Peristaltikpumpen	flocon
Spektrofluorometer	Merck-Hitachi, F-1050
1 mL Kartusche	MoBiTec
Blasenfänger	Trace AG
Computer	386SX-16, mit A/D-Wandler
Steuerungs-/Auswertungssoftware	Anasyscon, CAFCA

## 6.4 Chemikalienliste

### 6.4.1 Immunchemikalien

Faktor VIIa	Novo Nordisk A/S
mab FVII-4 F9 (F9A2)	Novo Nordisk A/S
mab FVII (F1A2)	Novo Nordisk A/S
mab FVII-4 F7 (F7A2)	Novo Nordisk A/S

### 6.4.2 Feinchemikalien

BrCN-aktivierte Sepharose 4B	Sigma
Tris	Fluka
NaCl	Fluka
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
Na <sub>3</sub> -Citrat	Fluka
NaHCO <sub>3</sub>	Fluka
Na-Acetat	Fluka
Bis-Tris-Propan	Fluka
Tween 20	Fluka
NaSCN	Fluka
Ethanolamin	Merck
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka
Glycin	Fluka

## 6.5 Puffer und Reagenzien

Trägerpuffer	10 mM Tris 0.1M NaCl 20 mM CaCl <sub>2</sub>	pH 7.5
Elutionspuffer	30 mM Na <sub>3</sub> -Citrat 75 mM Tris	pH 7.5
Immobilisierungspuffer	0.1 M NaHCO <sub>3</sub> 0.5 M NaCl	pH 8.3
saurer Spülpuffer	0.1 M Na-Acetat 0.5 M NaCl	pH 4.0
basischer Spülpuffer	0.1 M Tris-HCl 0.5 M NaCl	pH 8.0
Probenpuffer Faktor VIIa	10 mM Tris 10 mM Bis-Tris-Propan 2 mM CaCl <sub>2</sub> 0.1 mg/ml Tween 20	pH 8.0

## 7 Literaturverzeichnis

- Amit, A.G.; Marinzza, R.A.; Phillipp, S.E.V.; Poljack, R.J., Three-dimensional structure of an antigen-antibody-complex at 2.8 Å resolution, *Science*, **233**, 747-753 (1986)
- Beyer, K.; Reinecke, M.; Noe, W.; Scheper, T., Immunobased elution assay for process control, *Anal. Chim. Acta*, **309**, 301-305 (1995)
- Bjoern, S.; Christensen, M.; Nicolaisen, E.M.; Lund-Hansen, T.; Pedersen, A.H.; Hedner, U., Amino acid sequence and posttranslational modifications of human factor VIIa from plasma and BHK cells, *Biochemistry*, **27**, 7785-7793 (1988)
- Bjoern, S.; Foster, D.C.; Thim, L.; Wiberg, F.C.; Christensen, M.; Komiyama, Y.; Pedersen, A.H.; Kisiel, W., Human plasma and recombinant factor VII, *J. Biol. Chem.*, **266**, 11051-11057 (1991)
- Boyer, C.; Wolf, M.; Rothschild, C.; Migaud, M.; Amiral, J.; Mannucci, P.M.; Meyer, D.; Larrieu, M.J., An enzyme linked immunoassay (ELISA) for quantitation of human factor VII, *Thromb. Haemostas.* **56**, 250-255 (1986)
- Brandes, W.; Maschke, H.E.; Scheper, T., Specific flow injection sandwich binding assay for IgG monitoring using protein A and a fusion protein, *Anal. Chem.*, **65**, 3368-3371 (1993)
- Brecht, A.; Gauglitz, G., Lable free immunoprobes for pesticide detection, *Anal. Chim. Acta*, **347**, 219-233 (1997)
- Broadhurst, P.; Kelleher, C.; Hughes, L.; Imeson, J.; Raferty, E., Fibrinogen factor VII clotting activity and coronary artery disease severity, *Atherosclerosis*, **85**, 169-173 (1990)
- Broze, G.; Majerus, P., Human factor VII, *Methods Enzymol.*, **80**, 228-237 (1982)
- Broze, G.; Majerus, P., Purification and properties of human coagulation factor VII\*, *J. Biol. Chem.*, **255**(4) 1242-1247 (1980)
- Burd, J.F., The homogenous substrate-labeled fluorescence immunoassay, *Methods Enzymol.*, **74**, 79-84 (1981)
- Cerskus, A.J.; Ofosu, F.A.; Birchall, K.J.; Clarke, B.J.; Modi, G.J.; Johnston, M.; Blajchman, M.A., The immunodepletion of factor VII from human plasma using a monoclonal antibody, *Brit. J. Haemost.*, **61**, 467-475 (1985)
- Cheesemann, R.V.; Wilson, A.L., Manual on analytical quality-control for water industry, Water research centre, technical report, **TR 66**, Medmenham (1978)
- Christensen, J., mündliche Mitteilung (1998)
- Christian, G.D.; Ruzicka, J.; Sample handling and pretreatment using FIA, *Anal. Chem.*, **21**, 357-375 (1992)
- Colman P.M.; Laver, W.G.; Vargehese, J.N.; Baker, A.T.; Tulloch; P.A.; Air, G.M.; Webster, R.G., Three-dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase, *Nature*, **326**, 358-361 (1987)



- Coppola, R.; Tombesi, S.; Belotti, R.; Alborali, S.; Gobbi, M.; Manucci, P.M.; Albertini, A., Preliminary characterization of a panel of monoclonal antibodies to human factor VII in: Albertini, A.; Lenfant, C.L.; Mannucci, P.M.; Sixma, J.J. (eds.), Biotechnology of Plasma Proteins, Curr. Stud. Hematol. Blood Transf., Karger, Basel, **58**, 187-193 (1991)
- DAKO, Factor VII EIA kit, Productinformation, Version 1 (1994)
- Degelau, A.; Freitag, R.; Linz, F.; Middendorf, C.; Scheper, T.; Bley, T.; Müller, S.; Stoll, P.; Reardon, K., Immuno- and flow cytometric analytical methods for biotechnological research and process monitoring, J. Biotechnol., **25**, 115-144 (1992)
- Dolan, J.W.; Snyder, L.R., Troubleshooting LC Systems, Humana Press, Clifton (1989)
- Engval, E.; Pearlman, P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochemistry, **8**, 871-874 (1971)
- Fair, D.S., Quantitation of factor VII of normal and warfarin-treated individuals by radio-immunoassay, Blood, **62**, 784-91 (1983)
- Fintschenko, Y.; Wilson, S., Flow Injection Immunoassays: a review, Mikrochim. Acta, **129**, 7-18 (1998)
- Fotiou, F.K., Automated rate nephelometric determination of apolipoproteins AI and B in human serum by consecutive addition of antibodies, Anal. Chem., **64**, 1698-1701 (1992)
- Freitag, R., Entwicklung und Automatisierung von immunochemischen Nachweisverfahren zur On-line-Detektion hochmolarer Medienkomponenten in Fermentationsprozessen, Dissertation, Universität Hannover (1989)
- Freitag, R.; Fenge, C.; Scheper, T.; Schügerl, K.; Spreinat, S.; Antranikian, G.; Fraune, E., Immunological on-line detection of specific proteins during fermentation processes, Anal. Chim. Acta, **249**, 113-122 (1991b)
- Freitag, R.; Scheper, T., Schnell genug für eine Prozeßanalytik, Chem. Industrie, **9**, 62-66 (1992)
- Freitag, R.; Scheper, T.; Brandes, W.; Dullau, T.; Holzhauer-Rieger, K.; Schügerl, K., Development of a turbidimetric immunoassay for on-line monitoring of proteins in cultivation processes, Enzym. Microb. Technol., **13**, 969-975 (1991)
- Gartner, A.; Cares, C.; Montagne, P.; Cuilière, M.; Duheille, J., A microparticle enhanced nephelometric immunoassay applied to thymulin measurement, J. of Immuno-assay, **12**(4), 521-542 (1991)
- Gebbert, A.; Alvarez-Icaza, M.; Peters, H.; Jäger, V.; Bilitewski, U.; W.; Schmid, R.D., On-line monitoring of monoclonal antibody production with regenerable flow injection immuno systems, J. Biotechnol., **32**, 213-220 (1994)
- Gebbert, A.; Alvarez-Icaza, M.; Stöcklein, W.; Schmid, R.D., Real-time monitoring of immunochemical interactions with a tantalum capacitance flow-through cell, Anal. Chem., **64**, 997-1003 (1992)
- Gressner, A.M., Entwicklungstendenzen nephelometrischer und turbidimetrischer Immunoassays, GIT Labor-Medizin, **9/90**, 419-429 (1990)
- Hage, D.S., Immunoassays, Anal. Chem. **67**(12) 455-462 (1995)
- Hagedorn, J., Entwicklung und Optimierung von Biosensorsystemen zur Bioprozeßüberwachung, Dissertation, Universität Hannover (1998)

- Hagen, F.S.; Gray, C.L.; O'Hara, P.; Grand, F.J.; Saari, G.C.; Woodbury, R.G.; Hart, C.E.; Insley, M.; Kisiel, W.; Kurachi, K.; Davie, E.W., Characterization of a cDNA coding for human factor VII, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 2412-2416 (1986)
- Hall, E., Entwicklungen in der Biosensor-Technologie, *BioEngineering*, **1/88**, 21-26 (1988)
- Hansen, E.H., Flow-injection-analysis I. New concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145-157 (1975)
- Hartung, J., Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik, 10. durchgesehene Auflage, R. Oldenbourg, München (1995)
- Hayes, T.E.; Pike, J.; Tracy, R.P., Factor VII assays, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **117**, 52-57 (1993)
- Hearn, M.T.W.; Davids, J.R., Evaluation of factors which affect column performance with immobilized monoclonal antibodies. Model studies with a lysozyme-antilysozyme system, *J. Chromatogr.*, **512**, 23-39 (1990)
- Heidelberger, M.; Kendal, F.E., The precipitin reaction between type III pneumococcus-polysaccharide and homologous antibody III. A quantitative study and theorie of the reaction mechanism, *J. Exp. Med.*, **61**, 563-591 (1935)
- Hemmilä, I., Fluorescenceimmunoassays and immunofluorimetric assays, *Clin. Chem.*, **31**, 359-370 (1985)
- Hitzmann, B.; Löhn, A.; Reinecke, M.; Schulze, B.; Scheper, T., The automation of immun-FIA-systems, *Anal. Chim. Acta*, **313**, 55-62 (1995)
- Hoffmann, C.; Miller, R.; Lawson, W.; Hultin, M., Evaluation of factor VII activity and mass in young adults at the risk of ischemic heart disease, *J. Am. Coo. Cardiol.*, **14**, 941-946 (1989)
- Homola, J.; Yee, S.S.; Gauglitz, G., Surface plasmon resonance sensors: a review, *Sensors Actuators B*, **54**, 3-15 (1999)
- Hsieh, Y.S.; Crouch, S.R., A stopped/continuous-flow method for kinetic determinations, *Anal. Chim. Acta*, **309**, 277-288 (1995)
- Johnson, A.M., Nephelometric immunoassay, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **5**, 803-809 (1987)
- Kelly, T.A.; Christian, G.D., Homogenous enzymatic fluorescence immunoassay of serum IgG by continuous flow injection analysis, *Talanta*, **29**, 1109-1112 (1984)
- Kitchen, S.; Malia, R.G.; Prestom, F.E., A comparison of methods for the measurement of activated factor VII, *Thromb. Haemost.*, **68**(3), 301-305 (1992)
- Köhler, G.; Milstein, C., Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **356**, 495-497 (1975)
- Lammers, F., Neue Enzymthermistoren für die On-line-Prozeßkontrolle in der Biotechnologie, Dissertation, Universität Hannover (1996)
- Liddell, E.; Weeks, I., Antibody Technology, Bios Scientific Publishers, Oxford (1995)
- Lindemann, C., Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektrskopie zur Bioprozeßbeobachtung, *Fortschr.-Ber.*, Reihe 17, Nr. 171, VDI Verlag, Düsseldorf (1998)
- Lund-Hansen, T.; Olsen, A.A.; Selmer, J., A double monoclonal ELISA for human coagulation factor VII, Abstract no. 135, XIIth IS TH congress in Tokyo, Japan (1989)
- Lundström, I., Real-time biospecific interaction analysis, *Biosensors Bioelectron.*, **9**, 725-736 (1994)

- Mariani, G.; Mazzucconi, M.; Hermans, J., Factor VII deficiency: immunological characterization of genetic variants and detection of carriers, *Br. J. Haematol.*, **48**, 7-14 (1981)
- Masseyeff, R.F.; Albert, W.H.; Staines, N.A. (eds.), Methods of Immunological analysis, Vol. 1, VCH, New York (1993)
- Matthiasson, B.; Håkanson, H., Immunochemically based assays for process control, *Advances Biochem. Engin./Biotechnol.*, **46**, 81-102 (1992)
- Meade, T.; Brozovik, M.; Chakrabarti, R., Haemostatic function and ischaemic heart disease: principle results of the Northwick Park Heart Study, *Lancet*, **2**, 533-537 (1986)
- Meili, E.O.; Dazzi, H.; von Felten, A., Rekombinater aktivierter Faktor VII (Novoseven<sup>TM</sup> Novo Nordisk) zur Blutstillung bei erworbener Hemmkörper-Hämophilie, *Schweiz. Med. Rundschau*, **125**, 405-411 (1995)
- Mernagh, D.R.; Janseak, P.; Firman, K.; Kneale, G.G., Protein-protein and protein-DNA interactions in the type I restriction endonuclease R.ECOR1241, *Biol. Chem.*, **379**, 497-503 (1998)
- Middendorf, C.; Schulze, B.; Freitag, R.; Scheper, T.; Howaldt, M.; Hoffmann, H., On-line immunoanalysis for bioprocess control, *J. Biotechnol.*, **31**, 395-403 (1993)
- Mikami, S.; Tuddenham, E.G.D., Studies on immunological assay of vitamin K dependent factors. Measurement of factor VII antigen by radioimmunoassay, *Br. J. Haematol.*, **62**, 171-181 (1986)
- Miles, L.E.M.; Hales, C.N., Labeled antibodies and immunological assay systems, *Nature*, **219**, 186-189 (1968)
- Montagne P.; Varcin, P.; Cuilière, M.; Duheille, J., Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay with microsphere-antigen conjugates, *Bioconjugate Chem.*, **3**, 187-193 (1992)
- Moon, B., Biosensors: chemical sensing with light, *Sensor Review*, **8**, 121-14 (1988)
- Morrison, L.E., Time-resolved detection of energy-transfer: Theory and application to immunoassays, *Anal. Chem.*, **174**, 101-120 (1988)
- Najjar, S.M.; Weintraub, B.D. in: De Pablo, F.; Scanes, C.G.; Weintraub, B.D. (eds.) Handbook of endocrine research techniques, Academic, San Diego, 3-23 (1993)
- Nakamura, R.M., Fluorescent immunoassay in: Bogulaski, E.; Mazzio, T; Nakamura, R.M. (eds.) Clinical immunochemistry: Principles of methods and applications, Little, Brown & Co, Boston, 1-24 (1984)
- Nakamura, R.M.; Kashara, Y.; Rechnitz, G.A. (eds.), Immunochemical assays and biosensors for the 90's, Am. Soc. Microbiol., Washington DC (1992)
- Nakane, P.K.; Kawaoi, A., Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084-1091 (1974)
- Nemerson, Y., Tissue factor and Haemostasis, *Blood*, **71**, 1-8 (1988)
- Nicolaisen, E.M., mündliche Mitteilung (1998)

- Nilsson, M.; Håkanson, H.; Matthiasson, B., Process monitoring by flow-injection immunoassay. Evaluation of a sequential competitive binding assay, *J. Chromatogr.*, **579**, 383-389 (1992)
- Nilsson, M.; Matthiasson, G.; Matthiasson, B., Automated immunochemical binding assay (flow-ELISA) based on repeated use of an antibody column placed in a flow-injection system, *J. Biotechnol.*, **31**, 381-394 (1993)
- Nishimura, H.; Kawabata, S.; Kisiel, W.; Hase, S.; Ikenaka, T.; Takao, T.; Shiminoshi, Y.; Iwanaga, S., Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl<sub>2</sub>-Glc) O-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factor VII and IX and protein Z and bovine protein Z\*, *J. Biol. Chem.*, **264**, 20320-20325 (1989)
- Novo Nordisk A/S, Facts about haemophilia and recombinant Factor VIIa,  
URL: <http://health.novo.dk/health/cd/facts.asp>, accessed 19/08/1999 (a)
- Novo Nordisk A/S, US Food and Drug Administration approves NovoSeven® for treatment of haemophilia patients with inhibitors,  
URL: <http://press.novo.dk/press/nowuk/50.asp>, accessed 19/08/1999 (b)
- Novo Nordisk A/S, Healthreport 1998,  
URL: [www.health.novo.dk/health/hereport/rta4.asp](http://www.health.novo.dk/health/hereport/rta4.asp), accessed 21/09/1999 (c)
- Oellerich, M., Enzyme immunoassays in clinical chemistry: present status and trends, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **18**, 197-208 (1980)
- Pedersen, A.; Lund-Hansen, T.; Bisgard-Frantzen, H.; Olsen, F.; Pedersen, L., Auto-activation of human recombinant coagulation factor VII, *Biochemistry*, **28**, 9331-9336 (1989)
- Pharmacia Biotech, Affinity Chromatography - Principles and methods, 117-119 (1996)
- Polzius, R.; Bier, F.F.; Billtewski, U.; Jäger, V.; Schmid, R.D., Online monitoring of monoclonal antibodies in animal cell culture using a grating coupler, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1287-1292 (1993)
- Price, C.P.; Spencer, K.; Whicher, J., Light-scattering immunoassays of specific proteins: a review, *Anal. Clin. Biochem.*, **20**, 1-14 (1983)
- Puchades, R.; Maquieira, A., Recent developments in flow injection immunoanalysis, *Critical Rev. Analyt. Chem.*, **26**(4), 195-218 (1996)
- Puchades, R.; Maquieira, A.; Atenza, J., A comprehensive overview on the application of flow injection techniques in immunoanalysis, *Critical Rev. Analyt. Chem.*, **23**(4), 301-321 (1992)
- Reinecke, M., Entwicklung neuer immunochemischer Methoden nach dem FIA-Prinzip zur Analyse von biotechnologisch hergestellten Proteinen, Dissertation, Universität Hannover (1993)
- Reinecke, M.; Scheper, T., Fast on-line flow injection analysis system for IgG monitoring in bioprocesses, *J. Biotechnol.*, **59**, 145-153 (1997)
- Riechel, P., Entwicklung und Einsatz kapillarelektrophoretischer Methoden zur Produktkontrolle wirtschaftlich und pharmazeutisch relevanter Proteine und Wirkstoffe aus der biotechnologischen Produktion, Dissertation, Universität Hannover (1998)

- Ruzicka, J.; Hansen, E.H., Flow injection analysis in: Winefordner, J.D (ed.), Chemical analysis, Bd. 62, 2. Aufl., John Wiley & sons, New York (1988)
- Scheper, T., Bioanalytik, Vieweg-Verlag, Braunschweig (1991)
- Scheper, T.; Brandes, W.; Haschke, H; Plötz, F.; Müller, C., Two FIA-based biosensor systems studied for bioprocess monitoring, *J. Biotechnol.*, **31**, 345-356 (1993)
- Schmid, R.D.; Scheller, F. (eds.), Biosensors: Fundamentals, technologies and applications, GBF Monographs, VCH, Weinheim (1993)
- Schoemaker. H.; Wal, M.; Zurawska., V., The emergence of the monoclonal antibody in the diagnostics and therapy, *The World Biotech Report 1984*, Vol. 1: Europe, Online Publications Ltd., Pinner (1984)
- Schügerl, K., Analytische Methoden in der Biotechnologie, Vieweg Verlag, Braunschweig (1991)
- Schulze, B; Middendorf, C.; Reinecke, M.; Scheper, T.; Noe, W.; Howaldt, M., Automated immunanalysis systems for monitoring cell cultivation processes, *Cytotechn.* **15**, 259-269 (1994)
- Seligson, U.; Osterud, B.; Rapaport, S., Coupled amidolytic assay for factor VII: its use with a clotting assay to determine the activity state of factor VII, *Blood*, **52**, 978-988 (1978)
- Severs, A.H.; Schasfoort, R.B.M.; Salden, M.H.L., An immunosensor for syphilis screening based on surface plasmon resonance, *Biosensors Bioelectron.*, **8**, 185-189 (1993)
- Sota, H.; Hasegawa, Y.; Iwakura, M., Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance, *Anal. Chem.*, **70**, 2019-2024 (1998)
- Stryer, L., Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg (1996)
- Takase, T.; Tuddenham, E.; Chand, S.; Goodall, A., Monoclonal antibodies to human factor VII: a one step immunoradiometric assay for VII:Ag, *J. Clin. Pathol.*, **41**, 337-341 (1988)
- Thim, L.; Bjoern, S.; Christensen, M.; Nicolaisen, E.M.; Lund-Hansen, T.; Pedersen, A.H.; Hedner, U., Amino acid sequence and posttranslational modifications of human factor VII<sub>a</sub> from plasma and transfected BHK cells, *Biochem.*, **27**, 7785-7793 (1988)
- Trutnau, H.H., Biomolekulare Interaktionsanalytik, LaborPraxis, **2**, 17-21 (1998)
- Twardowski, J.; Anzenbacher, P., Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry, Ellis Horwood, Chichester (1994)
- Valentin, S., mündliche Mitteilung (1998)
- Van den Tweel, J.G., u.a., Immunologie. Das menschliche Abwehrsystem, Spektrum Verlag, Heidelberg (1991)
- Van Oss, C.J., Nature of antigen antibody interaction, *J. Chromatogr.*, **376**, 11-119 (1986)
- Whicher, J.T.; Price, C.P.; Spencer, K., Immunonephelometrie and immunoturbididmetric immunoassays for proteins, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **18**, 213-260 (1983)
- Wimalasena, R.L.; Wilson, G.S., Factors affecting the specific activity of immobilized antibodies and their biologically active fragments, *J. Chromatogr.*, **572**, 85-102 (1991)
- Yalow, R.S.; Berson, S.A., Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, *Nature (London)*, **184**, 1648-1649 (1959)
- Zur, M.; Radcliff, R.D.; Oberdick, J.; Nemerson, Y., The dual role of factor VII in blood coagulation, *J. Biol. Chem.*, **257**(10), 5623-5631 (1982)