

Aus der Klinik für Ophthalmologie  
(Direktor: Prof. Dr. Johann Roider)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Experimentelle Untersuchungen zur Kompatibilität von *Recombinant Tissue Plasminogen Activator*, Aflibercept und Ranibizumab in der Therapie der Altersabhängigen Makuladegeneration**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Simon Grotelüschen  
aus Lübeck

Kiel 2016

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Jost Hillenkamp*
2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Petra Ambrosch*

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.03.2017

*gez.:*

*(Vorsitzender der Prüfungskommission)*

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	2
1.1	Altersabhängige Makuladegeneration.....	2
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
1.1.2	Klassifikation.....	2
1.1.3	Signalmolekül: Vascular Endothelial Growth Factor.....	4
1.1.4	Vascular Endothelial Growth Factor-Inhibitoren.....	4
1.1.5	Therapie submakulärer Blutungen bei exsudativer AMD.....	6
1.2	Zielsetzung.....	9
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Untersuchungen der Kompatibilität von VEGF-Inhibitoren und rtPA bzw. Plasmin.....	13
2.1.1	SDS-PAGE-Gelelektrophorese: Probenvorbereitung von rtPA und VEGF-Inhibitoren.....	13
2.1.2	SDS-PAGE-Gelelektrophorese: Probenvorbereitung von Plasmin und VEGF-Inhibitoren.....	14
2.1.3	SDS-PAGE-Gelelektrophorese.....	16
2.1.4	Färbungen.....	18
2.1.5	Densitometrische Analyse.....	19
2.2	Untersuchungen der Anti-VEGF-Effektivität: Aflibercept und Ranibizumab.....	20
2.2.1	Zellkultur.....	20
2.2.2	VEGF ELISA: Probenvorbereitung von rtPA, VEGF-Inhibitoren und humanes Blut.....	21
2.2.3	VEGF ELISA: Probenvorbereitung von rtPA und VEGF-Inhibitoren.....	22
2.2.4	VEGF ELISA: Probenvorbereitung von Plasmin und VEGF-Inhibitoren.....	22
2.2.5	VEGF ELISA: Probenvorbereitung des Grenzwertes einer wirksamen Aflibercept-Konzentration.....	23
2.3	VEGF ELISA.....	25
2.3.1	Testprinzip VEGF ELISA.....	25
2.3.2	Durchführung VEGF ELISA.....	26
2.3.3	Auswertung VEGF ELISA.....	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	SDS-PAGE-Gelelektrophorese.....	29
3.1.1	Kompatibilität rtPA und VEGF-Inhibitoren.....	29
3.1.2	Kompatibilität Plasmin und VEGF-Inhibitoren.....	33
3.2	VEGF ELISA.....	47
3.2.1	Kompatibilität von rtPA - mit und ohne humanes Blut - und VEGF-Inhibitoren.....	47
3.2.2	Kompatibilität von Plasmin und VEGF-Inhibitoren.....	49
3.2.3	Einfluss von Plasmin auf den Grenzwert einer wirksamen Aflibercept-Konzentration.....	51
4	Diskussion.....	53
5	Zusammenfassung.....	57
6	Literaturverzeichnis.....	59
7	Danksagung.....	65
8	Lebenslauf.....	66
9	Publikationen.....	68

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ELISA: schematische Darstellung.....	26
Abbildung 2: rtPA und VEGF-Inhibitoren nach Coomassie-Färbung.....	29
Abbildung 3: rtPA und VEGF-Inhibitoren nach Silber-Färbung.....	30
Abbildung 4: Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Volumina nach Coomassie-Färbung .....	34
Abbildung 5: Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Volumina nach Silber-Färbung....	34
Abbildung 6: Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Mengen zur densitometrischen Auswertung nach Coomassie-Färbung.....	39
Abbildung 7: Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Mengen zur densitometrischen Auswertung nach Silber-Färbung.....	40
Abbildung 8: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Ranibizumab nach Coomassie- Färbung.....	41
Abbildung 9: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Ranibizumab nach Silber- Färbung.....	42
Abbildung 10: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Bevacizumab nach Coomassie-Färbung.....	43
Abbildung 11: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Bevacizumab nach Silber- Färbung.....	44
Abbildung 12: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Aflibercept nach Coomassie- Färbung.....	45
Abbildung 13: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Aflibercept nach Silber- Färbung.....	46
Abbildung 14: Anti-VEGF-Effektivität von Aflibercept und Ranibizumab mit rtPA.....	48
Abbildung 15: Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept und Ranibizumab mit rtPA und humanem Blut.....	49
Abbildung 16: Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept und Ranibizumab mit Plasmin.....	50
Abbildung 17: Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept mit Plasmin.....	52

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	10
Tabelle 2: Chemikalien.....	11
Tabelle 3: VEGF-Inhibitoren, rtPA und Plasmin.....	11
Tabelle 4: Puffer und Lösungen.....	12
Tabelle 5: Inhaltsstoffe der Trenn- und Sammel-Gele der SDS-PAGE-Gelelektrophorese.....	17
Tabelle 6: Inhaltsstoffe des Laufpuffers der SDS-PAGE-Gelelektrophorese.....	17
Tabelle 7: Materialien des ELISA Kits.....	28
Tabelle 8: Molekulargewicht rtPA und Ranibizumab nach Coomassie-Färbung.....	31
Tabelle 9: Molekulargewicht rtPA und Ranibizumab nach Silber-Färbung.....	31
Tabelle 10: Molekulargewicht rtPA und Aflibercept nach Coomassie-Färbung.....	32
Tabelle 11: Molekulargewicht rtPA und Aflibercept nach Silber-Färbung.....	33
Tabelle 12: Molekulargewicht Plasmin und Ranibizumab nach Coomassie-Färbung.....	35
Tabelle 13: Molekulargewicht Plasmin und Ranibizumab nach Silber-Färbung.....	36
Tabelle 14: Molekulargewicht Plasmin und Aflibercept nach Coomassie-Färbung.....	37
Tabelle 15: Molekulargewicht Plasmin und Aflibercept nach Silber-Färbung.....	38

---

## Abkürzungsverzeichnis

AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
CNV	Choroidale Neovaskularisation
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay</i>
IgG	Immunglobulin G
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
PpV	Pars-plana-Vitrektomie
RPE	Retinales Pigmentepithel
rtPA	<i>Recombinant Tissue Plasminogen Activator</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid</i>
tPA	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>
TTBS	<i>Tween Tris-Buffered Saline</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

---

# **1 Einleitung**

## **1.1 Altersabhängige Makuladegeneration**

### **1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren**

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine progredient verlaufende degenerative Erkrankung von Netzhaut, retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch'scher Membran und der Aderhaut im Bereich der Makula lutea und die häufigste Ursache einer erheblichen Minderung des zentralen Sehvermögens in den westlichen Industrienationen (Spitzer et al. 2008). In Deutschland sind schätzungsweise 4,5 Millionen Menschen von AMD betroffen, das Erkrankungsalter liegt meist über 60 Jahre (Eter et al. 2009). Alterungsprozesse des RPE, der darunter liegenden Bruch'schen Membran und der Aderhaut führen zur Degeneration der Makula. Zu den Risikofaktoren einer AMD zählt in erster Linie ein höheres Lebensalter (Bird et al. 1995). Bei der Entstehung der multifaktoriellen Krankheit spielen aber auch genetische Dispositionen, Rauchen, Adipositas und Hypertonie eine Rolle (Vingerling et al. 1995; Klein et al. 2004). Im Verlauf der Krankheit kommt es insbesondere zur Beeinträchtigung des zentralen Sehens, während das periphere Sehen auch in fortgeschrittenen Stadien meist erhalten bleibt.

### **1.1.2 Klassifikation**

Die AMD wird in zwei Formen unterteilt, die trockene (atrophe) und die feuchte (exsudative) altersabhängige Makuladegeneration.

#### ***Trockene (atrophe) Makuladegeneration***

Die trockene (atrophe) AMD tritt bei 80-90 % der AMD-Patienten auf, verursacht aber nur 5-10 % der durch AMD verursachten Blindheit. Sie beginnt mit Ablagerungen von Lipofuszin- und Lipid-Aggregaten, sogenannten Drusen, die durch einen ineffektiven Transport von Stoffwechselprodukten von den Photorezeptorzellen zur Aderhaut zwischen der

Bruch'schen Membran und dem RPE entstehen (Bird et al. 1995). Zusätzlich liegt bei der atrophischen AMD ein ineffektiver Transport von Nährstoffen von der Aderhaut zu den Photorezeptorzellen vor (Zarbin 1998).

An einem kritischen Punkt konfluieren die größer werdenden Drusen, begleitet von RPE-Veränderungen, zumeist Hyperpigmentierungen. Konfluierende Drusen konnten in 100 % der Augen nachgewiesen werden, bei denen sich durch flächigen Zelltod eine geographische Atrophie des RPE entwickelte (Klein et al. 2008).

### ***Feuchte (exsudative) Makuladegeneration***

Die feuchte (exsudative) AMD tritt in 10-15 % der AMD-Fälle auf, ist aber für 90 % der klinisch relevanten, durch AMD verursachte Blindheit verantwortlich (Klein R/Klein BEK/Linton 1993, Green/Wilson 1986). Typische pathologische Merkmale sind neu gebildete Blutgefäße, sogenannte choroidale Neovaskularisationen (CNV), die aus der Aderhaut die Bruch'sche-Membran durchbrechen und unter die Netzhaut wachsen (Avery et al. 1996). CNV verursachen Leckagen und Ödeme im Bereich der retinalen Schichten und können den Visus stark beeinträchtigen (de Jong 2006). Darüber hinaus neigen CNV zu submakulären Blutungen, die im Verlauf zu einer Makula-Narbe führen können (Avery et al. 1996). Submakuläre Blutungen gehören zu den häufigsten Komplikationen einer feuchten AMD mit einer besonders ungünstigen Prognose (Feltgen 2012). Die durch submakuläre Blutungen verursachten Schädigungen des retinalen Gewebes sind mit einer verminderten Passage von Nährstoffen zur Netzhaut assoziiert (Glatt/Machemer 1982), einem Schwund der äußeren Schichten der Netzhaut aufgrund von Blutgerinnseln (Glatt/Machemer 1982) und einem Freisetzen von toxischen Substanzen wie Fibrin (Toth et al. 1991), Eisen (Bhisitkul et al. 2008) und Hämosiderin (El Baba/Jarrett 1986). Bereits 24 Stunden nach einer Blutung können toxische Effekte in der Netzhaut beobachtet werden (Glatt/Machemer 1982).

Im Gegensatz zur atrophischen Form führt die exsudative AMD zur raschen Zunahme einer Sehstörung mit verzerrter Wahrnehmung der Umwelt, sogenannten Metamorphopsien, und kann schließlich zu einem kompletten Visusverlust des zentralen Sehens führen (de Jong 2006).

### **1.1.3 Signalmolekül: *Vascular Endothelial Growth Factor***

In der Pathogenese der CNV nimmt das Signalmolekül *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) eine entscheidende Rolle ein (Spilsbury 2000). Von der VEGF-Familie sind verschiedene Formen bekannt: VEGF A bis F, sowie *Placental Growth Factor* (PlGF). Der wichtigste endogene Faktor, VEGF-A, im Weiteren als VEGF bezeichnet, ist der stärkste Aktivator der Angiogenese. Er liegt als Dimer vor und weist zwei Bindungsstellen für seine VEGF-Rezeptoren, membrangebundene Tyrosinkinasen (Ylä-Herttuala et al. 2007), auf. Bei gleichzeitiger Bindung beider Rezeptoren wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die über weitere Schritte zur Proliferation und Migration von Endothelzellen führt (Ferrara et al. 2006). Eine Überexpression von VEGF in retinalem Gewebe steht in Zusammenhang mit dem Wachstum choroidaler Blutgefäße, einer Undichtigkeit der Gefäße, der Entwicklung von CNV und einer neuronalen Degeneration der Netzhaut (Spilsbury 2000).

### **1.1.4 *Vascular Endothelial Growth Factor*-Inhibitoren**

Seit Entwicklung der VEGF-Pharmakotherapie umfasst der Therapiestandard der exsudativen AMD die Verabreichung von VEGF-Inhibitoren. Mittels einer intravitrealen Injektion stellt sie eine sichere und effektive Behandlung der exsudativen AMD dar (Ip et al. 2008, Schouten et al. 2009). Eine weitere Form der Applikation bei akuter submakulärer Blutung ist die subretinale Injektion im Bereich der Blutung (Treumer et al. 2010, Treumer et al. 2012). Zu den etablierten VEGF-Inhibitoren der AMD zählen Ranibizumab (Lucentis<sup>®</sup>, Novartis), Aflibercept (Eylea<sup>®</sup>, Bayer) sowie das in zulassungsüberschreitender Anwendung (*off-label-use*) eingesetzte Krebsmedikament Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>, Roche).

#### ***Bevacizumab***

Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper aus der Gruppe der Immunglobuline (IgG1). Er enthält sowohl ein Fab- als auch ein Fc-Fragment und hat ein Molekulargewicht von 150 kDa. Seine Wirkung erzeugt er durch Bindung an VEGF, so dass dieser nicht mehr an seine Zielmoleküle (VEGF-Rezeptoren) binden kann und dadurch die

Angiogenese der pathologischen Blutgefäße gehemmt wird (Stefanini et al. 2010).

### ***Ranibizumab***

Ranibizumab ist ein humanisiertes, rekombinantes Fab-Fragment ohne Fc-Fragment und wurde speziell für die Behandlung der exsudativen AMD entwickelt. Mit hoher Affinität bindet es alle Isoformen des VEGF, welches als Schlüsselmolekül bei der Entstehung der exsudativen AMD gilt (Ferrara et al. 2006). Durch VEGF-Bindung verhindert Ranibizumab die Aktivierung der Rezeptoren VEGF-Rezeptor-1 und VEGF-Rezeptor-2 auf der Oberfläche der Endothelzellen.

Aufgrund der im Vergleich zu Bevacizumab geringeren Molekülgröße von 48,4 kDa kann Ranibizumab nach intravitrealer Gabe bei akuter submakulärer Blutung leichter als Bevacizumab durch die Netzhaut diffundieren (Gaudreault et al. 2005) und somit direkt zur CNV, der Blutungsquelle, gelangen.

### ***Aflibercept***

Aflibercept ist ein sogenanntes *VEGF-Trap*-Molekül, ein rekombinanter, künstlicher VEGF-Rezeptor. *VEGF-Trap* setzt sich aus einer Kombination der bindenden Domänen der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 und dem Fc-Fragment von Immunglobulin G zusammen. Es weist eine sehr hohe Affinität für VEGF auf und bindet alle VEGF-Isoformen (VEGF-A, -B, -C und PlGF (Holash et al. 2002, Dowlati 2010)).

Nach refraktärer Therapie unter Ranibizumab bei Patienten mit exsudativer AMD konnte durch Aflibercept eine verbesserte Sehfähigkeit erreicht werden (Saito et al. 2014). Im Vergleich zu Ranibizumab und Bevacizumab zeigte Aflibercept eine verlängerte VEGF-Inhibition (Klettner/Recher/Roider 2014). Außerdem wurde unter der Aflibercept-Therapie ein deutlich niedrigerer intraokularer Druck ermittelt, was möglicherweise ein besseres intraoperatives Druckprofil zur Folge hat (Rusu et al. 2014).

Welcher VEGF-Inhibitor hinsichtlich Wirksamkeit, Sicherheit und Wirtschaftlichkeit überlegen ist, ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Bevacizumab wird aufgrund deutlich

niedrigerer Kosten weltweit am häufigsten zur Behandlung der feuchten AMD eingesetzt. Vor allem Aflibercept überzeugt mit einer bis zu fünfzigfach höheren Affinität zum VEGF-Molekül gegenüber Ranibizumab und Bevacizumab und könnte mit einer Verlängerung der Injektionsintervalle maßgeblich die Belastung der Patienten verringern und die Compliance verbessern (Holash et al. 2002).

### **1.1.5 Therapie submakulärer Blutungen bei exsudativer AMD**

In der Therapie der submakulären Blutung bei exsudativer AMD wurden bislang unterschiedliche Verfahren angewendet: Ein etabliertes, allgemein anerkanntes operatives Therapieverfahren gibt es nicht. Die subretinale CNV-Extraktion mit Ausspülung der Blutung ist aufgrund schlechter funktioneller Ergebnisse wieder aufgegeben worden (Vander et al. 1999, Bressler et al. 2004). Zur Verdrängung der submakulären Blutung aus der Fovea wurde stattdessen *Recombinant Tissue Plasminogen Activator* (rtPA) eingesetzt.

Das gentechnisch entwickelte rtPA (Alteplase) imitiert die Wirkung des natürlichen gewebespezifischen Plasminogenaktivators (*Tissue Plasminogen Activator*, tPA) einer Serinprotease, die als körpereigener Aktivator der Fibrinolyse aus den Endothelzellen der Gefäßwände freigesetzt wird. Das Hauptsubstrat von rtPA ist Plasminogen, das durch rtPA zu aktivem Plasmin gespalten wird. Plasmin (ebenfalls eine Serinprotease) spaltet wiederum Fibrinpolymere, die Thromben vernetzen.

Neben Plasmin werden allerdings auch andere Proteine wie *Hepatocyte Growth Factor* (Mars/Zarnegar/Michalopoulos 1993) oder *Platelet Derived Growth Factor* (Su et al. 2008) durch rtPA gespalten. Deshalb ergab sich die Frage, ob rtPA selbst, durch rtPA aktiviertes Plasmin oder auch unbestimmte, während der Fibrinolyse aktivierte Proteasen intraoperativ Aflibercept oder Ranibizumab bei einer Ko-Applikation spalten und damit funktionell inaktivieren können.

Zur Injektion von rtPA sind bisher grundsätzlich zwei Verfahren beschrieben worden: die intravitreale Injektion einer rtPA-Lösung und einer Gasblase einerseits (Chen et al. 2007, Hesse/Schmidt/Kroll 1999, Handwerger et al. 2001) sowie die subretinale Injektion von rtPA während einer *pars-plana*-Vitrektomie (ppV), gefolgt von einer intravitrealen Gastamponade

(Hauptert/McCuen/Jaffe 2001, Olivier/Chow/Packo 2004, Hillenkamp et al. 2010, Treumer et al. 2010, Treumer/Roider/Hillenkamp 2012). Der Vorteil der intraokularen rtPA-Injektion gegenüber einer CNV-Extraktion mit Ausspülung der submakulären Blutung ist eindeutig. Zum einen wird das Risiko eines möglichen Traumas der subretinalen Manipulation minimiert, zum anderen kommt es bei der CNV-Extraktion unvermeidlich auch zur Extraktion des RPE (Vander et al. 1991, Bressler et al. 2004).

Nach erfolgreicher Verdrängung der submakulären Blutung durch rtPA verbesserte sich die Sehfähigkeit der Patienten zunächst häufig, fiel dann aber wieder ab, weil die der submakulären Blutung zugrunde liegenden CNV weiter fortschritt. In Anbetracht der Entwicklung neuer VEGF-Inhibitoren gilt daher das Verfahren der kombinierten subretinalen oder intravitrealen Applikation von rtPA mit Bevacizumab, Ranibizumab oder Aflibercept als vielversprechendes Therapiekonzept der Behandlung einer CNV im Rahmen einer submakulären Blutung. Während rtPA die Blutung aus der Fovea zu verdrängen vermag und toxische Effekte des Blutes reduziert (Treumer et al. 2010, Treumer et al. 2012, Meyer et al. 2008, Guthoff et al. 2011), hemmt der VEGF-Inhibitor das Fortschreiten der CNV zu einem möglichst frühen Zeitpunkt.

Intravitreale Applikationen von rtPA und VEGF-Inhibitoren haben gegenüber einer subretinalen Injektion allerdings den Nachteil, dass die Wirkstoffe zunächst durch die Netzhaut diffundieren müssen, um ihre Wirkung am Ort der submakulären Blutung entfalten zu können. Während Ranibizumab aufgrund seiner Molekülgröße keine Schwierigkeiten haben dürfte, die Netzhaut zu durchdringen (Mordenti et al. 1999), zeigte sich nach rtPA-Injektionen in den Glaskörper von Hasen, dass rtPA nicht durch die gesunde Netzhaut diffundierte (Kamei/Misono/Lewis 1999). Des Weiteren könnten Blutgerinnsel einer submakulären Blutung eine transretinale Diffusion einschränken und den Transport der Wirkstoffe in den subretinalen Raum zum Ort der CNV behindern.

Klinische Studien über eine kombinierte subretinale Ko-Applikation von rtPA und Bevacizumab im Rahmen einer ppV gefolgt von einer intravitrealen Gastamponade erzielten demgegenüber bereits vielversprechende Ergebnisse (Treumer et al. 2010, Treumer et al. 2012). Die direkte Injektion der Therapeutika zum Ort der CNV im subretinalen Raum scheint eine optimale therapeutische Effektivität der Wirkstoffe zu ermöglichen. Während die

Kompatibilität von rtPA und Bevacizumab bereits erfolgreich untersucht werden konnte (Klettner et al. 2012), galt es, nun auch die Kompatibilität von rtPA und Ranibizumab bzw. Aflibercept in einem *in-vitro*-Modell ihrer subretinalen Ko-Applikation experimentell zu untersuchen.

## 1.2 Zielsetzung

Akute submakuläre Blutungen sind eine häufige Ursache plötzlichen Sehverlustes bei neovaskulärer altersabhängiger Makuladegeneration. Ein klinisch vielversprechender Ansatz ist die kombinierte subretinale Ko-Applikation von rtPA mit einem VEGF-Inhibitor (Aflibercept oder Ranibizumab) im Rahmen einer Standard-pars-plana-Vitrektomie (ppV), gefolgt von einer intravitrealen Gastamponade. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, dieses therapeutische Verfahren im Labor zu simulieren und die Kompatibilität und Wirksamkeit einer Ko-Applikation von rtPA und Ranibizumab bzw. Aflibercept in einem entsprechenden *in-vitro*-Modell experimentell zu untersuchen.

Daher stellt sich zunächst Frage a): Werden Aflibercept bzw. Ranibizumab nach Ko-Inkubation mit enzymatisch wirksamen rtPA oder Plasmin gespalten? RtPA und Aflibercept bzw. Ranibizumab, sowie Plasmin aus humanem Plasma und Aflibercept bzw. Ranibizumab werden dazu in unterschiedlichen Konzentrationen ko-inkubiert, in einer Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE-Gelelektrophorese) elektrophoretisch aufgetrennt und auf die Bildung von Spaltprodukten hin analysiert.

Weiterhin stellt sich die Frage b): Wird die direkte enzymatische Wirkung von rtPA und/oder Plasmin Aflibercept bzw. Ranibizumab in ihrer therapeutischen Funktion als VEGF-Inhibitor funktionell beeinträchtigen? Aus einer Zellkultur wird dazu von konfluierenden, VEGF-sezernierenden RPE-Zellen Medium gewonnen, in welchem jeweils rtPA und VEGF-Inhibitoren sowie Plasmin und VEGF-Inhibitoren ko-inkubiert werden. Die VEGF-Bindung von Aflibercept bzw. Ranibizumab wird daraufhin im VEGF *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) quantifiziert.

Schließlich stellt sich die Frage c): Werden Aflibercept bzw. Ranibizumab durch indirekte Wirkung von rtPA über die Konversion von Plasminogen zu enzymatisch aktivem Plasmin oder anderen, während der Fibrinolyse aktivierten Proteasen beeinflusst? Zur Simulation einer intraoperativen Anwendung der Therapeutika werden daraufhin rtPA und VEGF-Inhibitoren in humanem Blut ko-inkubiert und im VEGF ELISA analysiert. Dazu wird das Volumen von typischen submakulären Blutungen zugrunde gelegt.

## 2 Material und Methoden

### Geräte

Bezeichnung	Firma
Abzug Systemlabor (Abzug)	Köttermann, Uetze
Antair BS (Abzug)	A. Sternkopf, Lübeck
Bio-Image System (Geldokumentation)	ChemoBis, Biostep, Jahnsdorf
Brutschrank	Labotect, Göttingen
Cellophan (Zellulose)	Roth, Karlsruhe
Centrifuge 5414 (Zentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge Tubes (Falcon-Röhrchen)	VWR International, Radnor, USA
Electrophoresis-power-supply (Stromversorgungsgerät)	Consort, Turnhout, Belgien
Elx50™ Washer (Streifenwascher)	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
Elx800 (Absorptions-Reader)	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
Heraeus Fresco 17 (Zentrifuge)	Thermo Elektron Corporation, Erlangen
Mini-Protean® (Gelkammersystem und Glasplatten)	Bio-Rad Laboratories, München
Quantikine® (VEGF ELISA Kit)	R & D Systems, Wiesbaden
Research® (Pipetten)	Eppendorf, Hamburg
Rocking Platform (Schüttler)	VWR International, Radnor, USA
Spectralis HRA+OCT	Heidelberg Engineerin, Heidelberg
Thermomixer Comfort (Heizblock)	Eppendorf, Hamburg
TotalLab Software	Nonlinear Dynamics, Durham, USA
Vacusaft comfort (Saugpumpen)	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Vortex-Genie 2 (Vortexer)	Scientific Industries, New York, USA
Waage	Kern & Sohn, Balingen
Whatmanfilter (Filterpapier)	Macherey-Nagel, Düren

Tabelle 1: Geräte

Dargestellt sind die in den Versuchen verwendeten Geräte, ihre Bezeichnungen und Firmensitze.

## Material und Methoden

---

### **Chemikalien**

Bezeichnung	Firma
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol 99%	Büfa Chemikalien, Hude
Glycerin 87% (Glycin)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt

Tabelle 2: Chemikalien

Dargestellt sind die in den Versuchen verwendeten Chemikalien, ihre Bezeichnungen, Firmen und Firmensitze.

### **VEGF-Inhibitoren, rtPA und Plasmin**

Bezeichnung	Firma
Actilyse® (rtPA)	Boehringer, Ingelheim
Avastin® (Bevacizumab)	Roche Deutschland Holding, Grenzach-Wyhlen
Eylea® (Aflibercept)	Bayer, Leverkusen
Lucentis® (Ranibizumab)	Novartis, Basel, Schweiz
Plasmin from human plasma	Sigma, München

Tabelle 3: VEGF-Inhibitoren, rtPA und Plasmin

Dargestellt sind die VEGF-Inhibitoren, rtPA und Plasmin.

## Material und Methoden

---

### **Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Firma
30% Acrylamide/Bis Solution	Bio-Rad Laboratories, München
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Color Reagenz A (Substrat-Lösung)	R & D Systems, Wiesbaden
Color Reagenz B (Substrat-Lösung)	R & D Systems, Wiesbaden
Coomassie Brilliant Blue R-250 Destain Solution	Bio-Rad Laboratories, München
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	Bio-Rad Laboratories, München
Roti®-Mark STANDARD (Molekulargewichtsmarker)	Roth, Karlsruhe
Precision Plus Protein™ Prestained Standard (Molekulargewichtsmarker)	Bio-Rad Laboratories, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
4x SDS Sample Buffer	Merck, Darmstadt
Silver Stain Developer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Silver Stain Enhancer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Silver Stain Sensitizer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Silver Stain	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris gepufferte Salzlösung (TBS)	Merck, Darmstadt
Trizma®Base	
Trizma®Hydrochlorid (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween-20	Merck, Darmstadt

Tabelle 4: Puffer und Lösungen  
Dargestellt sind die Puffer und Lösungen.

## **2.1 Untersuchungen der Kompatibilität von VEGF-Inhibitoren und rtPA bzw. Plasmin**

In den Experimenten der SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurde die Ko-Applikation von rtPA und Aflibercept, rtPA und Ranibizumab, Plasmin und Aflibercept, Plasmin und Ranibizumab sowie zusätzlich Plasmin und Bevacizumab untersucht. In den Versuchsreihen wurden 40 mg/ml Aflibercept (*Eylea*<sup>®</sup>, Bayer), 10 mg/ml Ranibizumab (*Lucentis*<sup>®</sup>, Novartis), 25 mg/ml Bevacizumab (*Avastin*<sup>®</sup>, Roche) und 0,2 mg/ml rtPA (*Actilyse*<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim) verwendet.

Zur Simulation der intraoperativen Bedingungen wurden gleiche Volumina der entsprechenden VEGF-Antagonisten und rtPA verwendet. Folglich wurden in allen Versuchen 5 µl (1 µg) rtPA, 5 µl (50 µg) Ranibizumab und 5 µl (200 µg) Aflibercept in einem Gesamtvolumen von 10 µl inkubiert.

Die Interaktion von Aflibercept und Plasmin, Ranibizumab und Plasmin sowie Bevacizumab und Plasmin wurde unter Verwendung von  $\geq 2$  Units/mg Protein menschlichen Plasmas (*Plasmin From Human Plasma*, Sigma) untersucht. Da die *in-situ* vorliegende Konzentration von Plasmin in einer mit rtPA und Aflibercept oder rtPA und Ranibizumab behandelten submakulären Blutung unbekannt ist, wurden in den Versuchen zwei Konzentrationen von Plasmin verwendet. Folglich wurden in allen Experimenten 0,2 U oder 2 U Plasmin mit 5 µl (200 µg) Aflibercept sowie 5 µl (50 µg) Ranibizumab in einem Gesamtvolumen von 10 µl inkubiert. Unter Verwendung von 50 µg Aflibercept, 50 µg Ranibizumab sowie zusätzlich 50 µg Bevacizumab wurden neben gleichen Volumina auch der Effekt von 2 U Plasmin auf gleiche Mengen der jeweiligen VEGF-Antagonisten untersucht.

### **2.1.1 SDS-PAGE-Gelelektrophorese: Probenvorbereitung von rtPA und VEGF-Inhibitoren**

Zur Untersuchung der Kompatibilität von rtPA und Aflibercept bzw. Ranibizumab wurden ko-inkubiert:

- ▲ 5 µl (1 µg) rtPA und 5 µl (200 µg) Aflibercept

- ♣ 5 µl (1 µg) rtPA und 5 µl (50 µg) Ranibizumab

Als Kontrolle dienten jeweils 5 µl rtPA (1 µg), 5 µl (200 µg) Aflibercept und 5 µl (50 µg) Ranibizumab.

Alle Proben wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl für zwei Stunden bei 37 °C im Thermomixer (*Thermomixer Comfort, Eppendorf*) inkubiert. Anschließend wurden jeweils 9 µl der Proben mit 3 µl Sample Buffer (*4x SDS Sample Buffer, Merck*) versehen und für fünf Minuten bei 95 °C im Thermomixer inkubiert.

Sample Buffer üben als Probenpuffer unterschiedliche Funktionen aus. Zum einen stabilisieren sie den pH-Wert der Proben, zum anderen erhöhen sie die Dichte der Proben, die dadurch in die Taschen der Gele einsinken. Darüber hinaus vereinfacht der Farbstoff Bromphenolblau die Auswertung der angefärbten Banden im Anschluss an die SDS-PAGE-Gelelektrophorese.

In der SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurden die Proben in Konzentrationen von 1:10 und 1:100 aufgetragen.

### **2.1.2 SDS-PAGE-Gelelektrophorese: Probenvorbereitung von Plasmin und VEGF-Inhibitoren**

Zur Untersuchung der Kompatibilität von Plasmin und Aflibercept bzw. Ranibizumab wurden ko-inkubiert:

- ♣ 5 µl (200 µg) Aflibercept und 0,2 U Plasmin
- ♣ 5 µl (200 µg) Aflibercept und 2 U Plasmin
- ♣ 5 µl (50 µg) Ranibizumab und 0,2 U Plasmin
- ♣ 5 µl (50 µg) Ranibizumab und 2 U Plasmin

Als Kontrolle dienten jeweils 0,2 U Plasmin, 2 U Plasmin, 5 µl (200 µg) Aflibercept und 5 µl (50 µg) Ranibizumab.

Alle Proben wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl für zwei Stunden bei 37 °C im

Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 9 µl der inkubierten Proben mit 3 µl Sample Buffer versehen und bei 95 °C für fünf Minuten im Thermomixer inkubiert.

In der SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurden die Proben in Konzentrationen von 1:10 und 1:100 aufgetragen.

### ***Vergleich gleicher Konzentrationen***

Um einen direkten Vergleich der Dichte der Banden aller VEGF-Inhibitoren darzustellen, wurde neben gleichen Volumina auch der Effekt von Plasmin auf identische Mengen aller VEGF-Inhibitoren - inklusive Bevacizumab - untersucht. Es wurden also die Versuche der Gelelektrophorese aus 3.1.2 wiederholt und jeweils eine Menge von 50 µg Aflibercept und 50 µg Ranibizumab sowie zusätzlich 50 µg Bevacizumab in Ko-Inkubation mit 2 U Plasmin verwendet.

Folglich wurden ko-inkubiert:

- ▲ 1,25 µl (50 µg) Aflibercept und 2 U Plasmin
- ▲ 5 µl (50 µg) Ranibizumab und 2 U Plasmin
- ▲ 2 µl (50 µg) Bevacizumab und 2 U Plasmin

Als Kontrolle dienten 2 U Plasmin, 1,25 µl (50 µg) Aflibercept, 5 µl (50 µg) Ranibizumab und 2 µl (50 µg) Bevacizumab.

Alle Proben wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl für zwei Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 9 µl der inkubierten Proben mit 3 µl Sample Buffer versehen und bei 95 °C für fünf Minuten im Thermomixer inkubiert.

In der SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurden die Proben in Konzentrationen von 1:10 und 1:100 aufgetragen.

### **2.1.3 SDS-PAGE-Gelelektrophorese**

#### ***Testprinzip der SDS-PAGE-Gelelektrophorese***

Bei der SDS-PAGE-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die der Auftrennung von Molekülen, insbesondere von Proteinen dient.

Das SDS nimmt die Funktion eines Detergens ein und führt zu einer Denaturierung und Komplexbildung der Proteine. Im elektrischen Feld der SDS-PAGE-Gelelektrophorese ermöglicht eine negative Gesamtladung des SDS-Protein-Komplexes die Trennung der SDS-Protein-Komplexe nach ihrer Größe: Je größer die Komplexe sind, desto mehr werden sie in der Polyacrylamid-Matrix abgebremst.

Zunächst werden die SDS-Protein-Komplexe im Sammel-Gel zu Banden formiert und anschließend im Trenn-Gel ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt.

Mit Hilfe von Markerproteinen kann die SDS-PAGE-Gelelektrophorese darüber hinaus zur Abschätzung der Molekülmasse von Proteinen verwendet werden. Als Molekulargewichtsmarker wurde entweder *Precision Plus Protein™ Prestained Standard* (Bio-Rad Laboratories) oder *Roti®-Mark STANDARD* (Carl Roth) verwendet.

#### ***Aufbau der SDS-PAGE-Gelelektrophorese***

Das Gel der SDS-PAGE-Gelelektrophorese ist zusammengesetzt aus zwei miteinander verbundenen Abschnitten, dem Sammel-Gel einerseits und dem Trenn-Gel andererseits, die verschiedene Dichten aufweisen.

## Material und Methoden

---

### Zusammensetzung Trenn- und Sammel-Gel

Inhaltsstoffe	Trenn-Gel	Sammel-Gel
Acrylamid	2 ml	335 µl
Aqua bidest.	1,75 ml	1,15 ml
Trenngelpuffer*	1,3 ml	
Sammelpuffer**		500 µl
APS (10 %)	40 µl	15 µl
Temed	5 µl	5 µl

\* 4 x Trenngelpuffer: 18,17 g Tris Base (pH auf 8,8 mit HCl), 0,4 g SDS  
\*\* 2 x Sammelpuffer: 3,0 g Tris Base (pH auf 6,8 mit HCl), 0,2 g SDS

Tabelle 5: Inhaltsstoffe der Trenn- und Sammel-Gele der SDS-PAGE-Gelelektrophorese  
Dargestellt sind die Inhaltsstoffe der Trenn- und Sammel-Gele der SDS-PAGE-Gelelektrophorese.

Zunächst wurde das Trenn-Gel, anschließend das Sammel-Gel mit einer jeweiligen Trocknungszeit von mindestens 30 Minuten gegossen. Der Acrylamid-Anteil im Trenn-Gel betrug 12 %. Daraufhin wurde das Gel in ein Gelkammersystem (*Mini-Protean®*, *Bio-Rad Laboratories*) eingespannt. Das Gelkammersystem wurde anschließend mit Laufpuffer befüllt.

### Zusammensetzung Laufpuffer (pH 8,3)

Inhaltsstoffe	Konzentration/Menge
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,10%

Tabelle 6: Inhaltsstoffe des Laufpuffers der SDS-PAGE-Gelelektrophorese  
Dargestellt sind die Inhaltsstoffe des Laufpuffers der SDS-PAGE-Gelelektrophorese.

### ***Durchführung der SDS-PAGE-Gelelektrophorese***

In jedes Gel wurden 5 µl eines der Molekulargewichtsmarker (*Precision Plus Protein™ Prestained Standard* oder *Roti®-Mark STANDARD*) mit definierten Proteinen einer jeweiligen Größe gegeben. Anschließend wurden jeweils 12 µl der vorbereiteten Proben in jeweils eine der Geltaschen aufgetragen. Die Proben durchliefen zunächst für mindestens 30 Minuten das Sammel-Gel mit 150 Watt, 150 Volt und 12 Milliampere pro Gel, anschließend für mindestens 60 Minuten das Trenn-Gel mit 150 Watt, 150 Volt und 24 Milliampere pro Gel. Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

### **2.1.4 Färbungen**

Zur Detektion zusätzlicher Banden wurden unabhängig voneinander zwei Färbungen der Gele angefertigt und ausgewertet.

#### ***Coomassie-Färbung***

Zur Anfärbung mit der *Coomassie*-Färbung wurden die Gele vorsichtig aus dem Gelkammersystem heraus gelöst und für etwa zehn Sekunden mit *Tween Tris-Buffered Saline* (TTBS) gewaschen.

Die Anfärbung erfolgte mit *Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution* (Bio-Rad Laboratories) über Nacht. Anschließend wurden die Gele für etwa 60 Minuten mit *Coomassie Brilliant Blue R-250 Destain Solution* (Bio-Rad Laboratories) entfärbt. Es folgte eine Festigung der Gele mit 2-prozentigem Glycerin für zehn Minuten.

#### ***Silber-Färbung***

Zur Anfärbung mit der Silber-Färbung wurden die Gele vorsichtig aus dem Gelkammersystem heraus gelöst und für zwei Mal fünf Minuten in ultrareinem Wasser (*Aqua bidest., Ampuwa® Spüllösung, Fresenius Kabi*) gewaschen. Anschließend erfolgte für zwei Mal 15 Minuten eine Fixierung durch eine Lösung mit 30-prozentigem Ethanol und 10-prozentiger Essigsäure.

Nach einer Behandlung in 10-prozentigem Ethanol für zwei Mal fünf Minuten erfolgte ein abermaliger Waschschrift in Aqua bidest für zwei Mal fünf Minuten. Nach einer einminütigen Behandlung der Gele in *Sensitizer Working Solution* (12 ml Aqua bidest plus 25 µl *Silver Stain Sensitizer*, (Thermo Fisher Scientific)) wurden die Gele zwei Mal für eine Minute in Aqua bidest gewaschen.

Die Anfärbung der Gele erfolgte in *Working Solution* (12,5 ml *Silver Stain* plus 250 µl *Silver Stain Enhancer* (Thermo Fisher Scientific)). Nach zweimaligem kurzen Waschen in Aqua bidest erfolgte die Behandlung der Gele mit *Developer Working Solution* (12,5 ml *Silver Stain Developer* (Thermo Fisher Scientific) plus 250 µl *Silver Stain Enhancer*) die etwa 30 Sekunden dauerte. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Gele für zehn Minuten mit 5-prozentiger Essigsäure behandelt. Abschließend folgte das Festigen der Gele mit 2-prozentigem Glycin für zehn Minuten.

### 2.1.5 Densitometrische Analyse

Alle Gele wurden mit dem *Bio-Image-System* (*ChemoBis*, *Biostep*<sup>®</sup>) photographiert und anschließend konserviert. Hierfür wurden die Gele mit 2-prozentiger Glycerin-Lösung behandelt und in Zellulose (*Cellophan*, *Roth*) aufgespannt, welches zuvor mit 5-prozentiger Glycerin-Lösung vorbehandelt worden war.

Das Molekulargewicht und die Dichte der Banden wurden unter Verwendung der *TotalLab-Software* (*Nonlinear Dynamics*) ausgewertet. In den Abbildungen ist die Dichte der Banden auf der y-Achse in Abhängigkeit zum mittleren Molekulargewicht der Banden auf der x-Achse dargestellt. Die Balken der Abbildungen stehen für Mittelwerte und Standardabweichungen der densitometrischen Dichte der Banden.

Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

## **2.2 Untersuchungen der Anti-VEGF-Effektivität: Aflibercept und Ranibizumab**

Zur Quantifizierung der VEGF-inhibitorischen Effektivität von Aflibercept und Ranibizumab nach Inkubation jeweils mit rtPA, rtPA mit geronnenem Blut oder Plasmin wurde ein VEGF ELISA (*Quantikine, R&D Systems*) verwendet.

### **2.2.1 Zellkultur**

Zur Vorbereitung der Proben für den ELISA wurde Medium von konfluierenden RPE-Zellen gesammelt, da diese eine signifikante Menge an VEGF in das Medium sezernieren (Klettner et al. 2008).

Frische Schweineaugen zur Verfügung gestellt von einem regionalen Schlachthof wurden innerhalb von sechs Stunden nach dem Tod des Tieres präpariert. Die Augäpfel wurden kurz in antiseptischer Lösung eingelegt. Durch einen Schnitt im Bereich der *pars plana*, einem Abschnitt zwischen dem äußeren Rand der Netzhaut und dem Ziliarkörper, konnte die vordere Seite des Auges und der Glaskörper entnommen werden. Um die Interzellularverbindungen zu lösen, wurde anschließend Trypsin für fünf Minuten bei 37 °C in den Augenbecher gegeben und für 45 Minuten bei ebenfalls 37 °C durch Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure ersetzt. Die gelösten RPE-Zellen konnten daraufhin vorsichtig von der Aderhaut abpipettiert und in Medium gesammelt und gewaschen werden. RPE-Zellen von sechs Augen wurden nun auf einem 60 mm großen Nährboden ausgesät. Kultiviert wurden die Zellen in einem standardisierten Nährmedium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/DMEM*) und mit Penicillin/Streptomycin (1%), L-Glutamin, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES, 25 mM), Natrium-Pyruvat (110 mg/ml) und 10-prozentigem fetalem Kalbsserum (*Linares*) ergänzt.

Um einen identischen Anteil an VEGF in den Medien zu erhalten, wurden RPE-Zellen für jeweils vier Stunden mit frischem Nährmedium versorgt. Anschließend wurden mehrere Milliliter des entstandenen Mediums entnommen, abzentrifugiert und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C eingefroren.

### **2.2.2 VEGF ELISA: Probenvorbereitung von rtPA, VEGF-Inhibitoren und humanes Blut**

Zur *in-vitro*-Simulation einer intraoperativen Situation wurde einem gesunden volljährigen, männlichen Probanden (Betreuer, J.H.) venöses Blut aus der *Vena mediana cubiti* entnommen und davon zehn Tropfen für mindestens 15 Minuten in einem verschlossenen Eppendorf Röhrchen bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Gerinnung belassen. Anschließend erfolgte die Ko-Inkubation von rtPA und Aflibercept sowie rtPA und Ranibizumab in Konzentrationen, wie sie auch intraoperativ eingesetzt werden:

- ♣ 10 Tropfen Blut, 50 µl (10 µg) rtPA und 50 µl (2 mg) Aflibercept
- ♣ 10 Tropfen Blut, 50 µl (10 µg) rtPA und 50 µl (0,5 mg) Ranibizumab

Als Kontrolle dienten 10 Tropfen Blut mit 50 µl (10 µg) rtPA.

Alle Proben wurden für 30 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 5.600 Umdrehungen pro Minute (UpM) in der Zentrifuge (*Centrifuge 5414, Eppendorf*) zentrifugiert. 20 µl des jeweiligen Überstandes wurden mit 500 µl des in der Zellkultur gewonnenen Mediums aus dem RPE-Zellüberstand in folgender Kombination zusammengesetzt:

- ♣ 500 µl Medium und 20 µl Überstand aus rtPA, Blut und Aflibercept
- ♣ 500 µl Medium und 20 µl Überstand aus rtPA, Blut und Ranibizumab

Als Kontrolle dienten 20 µl (800 µg) Aflibercept, 20 µl (100 µg) Ranibizumab und 20 µl (4 µg) rtPA, die getrennt voneinander mit jeweils 500 µl Medium gemischt wurden. Alle Proben wurden für 15 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 13.000 UpM in der Zentrifuge zentrifugiert. 500 µl der Überstände stellten die Proben für den VEGF ELISA dar und wurden bei -20 °C bis zu ihrer Verwendung eingefroren.

### **2.2.3 VEGF ELISA: Probenvorbereitung von rtPA und VEGF-Inhibitoren**

Es wurden rtPA und Aflibercept bzw. Ranibizumab in Mischungsverhältnissen ko-inkubiert,

wie sie auch intraoperativ eingesetzt werden:

- ♣ 10 µl (2 µg) rtPA und 10 µl (400 µg) Aflibercept
- ♣ 10 µl (2 µg) rtPA und 10 µl (100 µg) Ranibizumab

Als Kontrolle dienten 10 µl (2 µg) rtPA, 10 µl (400 µg) Aflibercept und 10 µl (100 µg) Ranibizumab, die getrennt voneinander in Eppendorf Röhren mit 0,9-prozentigem Natriumchlorid auf Volumina von 20 µl aufgefüllt wurden. Alle Proben wurden für zwei Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 500 µl des Mediums aus RPE-Zellüberstand hinzugefügt und für weitere 15 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Alle Proben wurden daraufhin für fünf Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert. 500 µl der Überstände stellten die Proben für den VEGF ELISA dar und wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C eingefroren.

### **2.2.4 VEGF ELISA: Probenvorbereitung von Plasmin und VEGF-Inhibitoren**

Aufgrund der unbekanntes klinisch relevanten Konzentration von Plasmin in einer mit rtPA und Aflibercept bzw. Ranibizumab behandelten submakulären Blutung wurden wiederum zwei Konzentrationen von Plasmin verwendet. Es wurden ko-inkubiert:

- ♣ 0,2 U Plasmin und 10 µl (400 µg) Aflibercept
- ♣ 2 U (2 µg) Plasmin und 10 µl (400 µg) Aflibercept
- ♣ 0,2 U (0,2 µg) Plasmin und 10 µl (100 µg) Ranibizumab
- ♣ 2 U (2 µg) Plasmin und 10 µl (100 µg) Ranibizumab

Als Kontrolle dienten 0,2 U Plasmin, 2 U Plasmin, 10 µl (400 µg) Aflibercept und 10 µl (100 µg) Ranibizumab, die getrennt voneinander in Eppendorf Röhren mit 0,9-prozentigem Natriumchlorid zu einem Volumen von 20 µl aufgefüllt wurden. Alle Proben wurden für zwei Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 500 µl des Mediums aus dem RPE-Zellüberstand hinzugefügt und für weitere 15 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Alle Proben wurden daraufhin für fünf Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert. 500 µl der Überstände stellten die Proben für den VEGF ELISA dar und wurden

bei -20 °C bis zu ihrer Verwendung eingefroren.

### **2.2.5 VEGF ELISA: Probenvorbereitung des Grenzwertes einer wirksamen Aflibercept-Konzentration**

Zur Untersuchung des Einflusses von Plasmin auf den Grenzwert einer VEGF-inhibitorisch wirksamen Konzentration von Aflibercept wurde zunächst eine minimale, noch anti-VEGF-wirksame Konzentration von Aflibercept bestimmt, die anschließend mit Plasmin ko-inkubiert wurde.

Zunächst wurde Aflibercept mit 0,9-prozentigem Natriumchlorid vorverdünnt und für zwei Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 500 µl des Mediums aus dem RPE-Zellüberstand mit folgenden Konzentrationen von Aflibercept zusammengesetzt:

- ♣ 500 µl Medium und 10 ng/ml Aflibercept
- ♣ 500 µl Medium und 50 ng/ml Aflibercept
- ♣ 500 µl Medium und 100 ng/ml Aflibercept
- ♣ 500 µl Medium und 150 ng/ml Aflibercept
- ♣ 500 µl Medium und 200 ng/ml Aflibercept
- ♣ 500 µl Medium und 400 ng/ml Aflibercept
- ♣ 500 µl Medium und 800 ng/ml Aflibercept

Als Kontrolle diente 500 µl des Mediums. Alle Proben wurden für 15 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. 500 µl der Überstände stellten die Proben dar wurden im VEGF ELISA ausgewertet. Da 200 ng/ml als minimale VEGF-inhibitorisch wirksame Aflibercept-Konzentration beschrieben werden konnte (s. Ergebnisse 3.2.3), wurde Aflibercept mit 0,9-prozentigem Natriumchlorid vorverdünnt und 200 ng mit 4 U Plasmin zusammengesetzt. Als Kontrolle dienten jeweils 4 U Plasmin und 200 ng Aflibercept.

Alle Proben wurden mit 0,9 prozentigem Natriumchlorid auf ein Volumen von 20 µl

aufgefüllt und für zwei Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 500 µl des Mediums aus RPE-Zellüberstand hinzugefügt und für weitere 15 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Alle Proben wurden daraufhin für fünf Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert. 500 µl der Überstände stellten die Proben für den VEGF ELISA dar und wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C eingefroren.

## 2.3 VEGF ELISA

### 2.3.1 Testprinzip VEGF ELISA

Der in dieser Arbeit verwendete VEGF ELISA ist ein Sandwich-ELISA und detektiert porcine VEGF<sub>165</sub>-Konzentrationen in Zellkulturmedien, Plasma und Serum. Sandwich-ELISA verwenden zwei Antikörper, die beide spezifisch, jedoch an unterschiedlichen Epitopen des nachzuweisenden Antigens binden.

Der erste sogenannte *Capture*-Primärantikörper liegt gebunden in Vertiefungen (*wells*) einer Mikrotiterplatte vor. In diese *wells* werden Proben des nachzuweisenden Antigens gegeben, die spezifisch an den Antikörper binden. Durch einen Waschschrift werden ungebundene Bestandteile der Probe entfernt. Daraufhin wird ein zweiter, ebenfalls spezifisch an das Antigen bindender *Detection*-Sekundärantikörper in die *wells* gegeben, an welchem ein Reporterenzym gekoppelt ist. Durch einen erneuten Waschschrift werden überschüssige Antikörper herausgewaschen. Nun wird ein zum Reporterenzym passendes Substrat beigefügt, welches vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Dieses Reaktionsprodukt kann durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden.

Alle verwendeten Substanzen der VEGF ELISA stammen vom selben Hersteller (*R&D Systems GmbH*) wie der ELISA Kit und gehörten derselben Charge an.

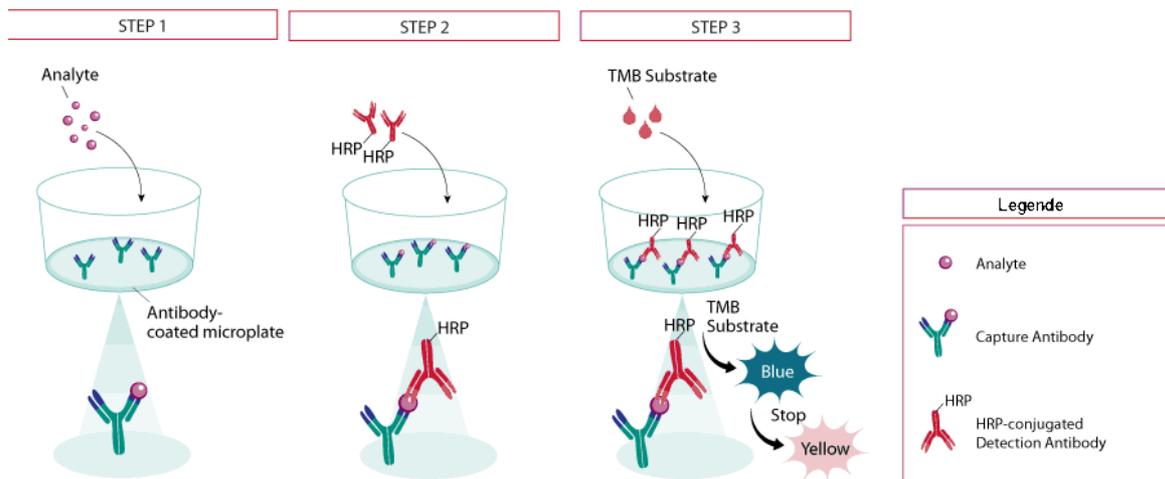


Abbildung 1: ELISA: schematische Darstellung

Aus: R&D Systems, ELISA Reference Guide & Catalog, Minneapolis, USA, 2012. Step 1: Auftragen der Probe des nachzuweisenden Antigens auf den „Capture“-Primärantikörper. Step 2: Auftragen des enzymtragenden Detection-Antikörpers. Step 3: Zugabe des Substrates des an den Sekundärantikörper gekoppelten Reporterenzym mit nachfolgendem Farbumschlag.

### 2.3.2 Durchführung VEGF ELISA

Zunächst wurde der in Pulverform vorliegende VEGF-Standard (*R&D Systems*) in einem ml Calibrator Diluent RD5K (*R&D Systems*) gelöst. Es entstand eine Stammlösung von 2000 pg/ml, die für 15 Minuten auf dem Schüttler (*Rocking Plattform, VWR International*) gemischt wurde. Um den exakten VEGF-Gehalt einer Probe in einem ELISA bestimmen zu können, wurde nun eine Standard-VEGF-Verdünnungsreihe erstellt. Hierzu wurden fünf Eppendorf-Röhrchen jeweils mit 500 µl *Calibrator Diluent RD5K* befüllt und die Stammlösung anschließend auf eine VEGF<sub>165</sub>-Konzentration von 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml und 62,5 pg/ml verdünnt.

#### *Auftragen der Proben*

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese aufgetaut, auf Raumtemperatur gebracht und durch wiederholtes auf- und abpipettieren gemischt. In jedes well einer Mikrotiterplatte wurden sodann 50 µl eines ELISA-aktivierenden *Assay Diluent RDIW* (*R&D Systems*)

vorgelegt und anschließend jeweils 500 µl der Proben gegeben. Zur Kontrolle wurden sowohl die Proben als auch die Standardverdünnungsreihe doppelt aufgetragen. Zum Schutz vor Kontamination von außen wurde die Mikrotiterplatte (*VEGF-Microplate, R&D Systems*) mit transparentem Klebeband verschlossen.

Die Mikrotiterplatte wurde anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. In dieser Zeit kam es zur Antikörper-Antigenbindung zwischen den Primärantikörpern auf der Mikrotiterplatte und den in der Probe nachzuweisenden Antigenen (s. Testprinzip VEGF ELISA).

Zur Herstellung von 500 ml Waschpuffer wurden 20 ml *Wash Buffer Concentrate (R&D Systems)* in 480 ml Aqua bidest gelöst. Hiermit wurden die *wells* dreimal in einem Streifenwascher (*ELx50 Washer, Biotek Instruments*) gewaschen. Im Anschluss wurden 200 µl *VEGF Conjugate (R&D Systems)*, welches den Sekundärantikörper enthielt, in die *wells* pipettiert. Wiederum wurde die Mikrotiterplatte mit transparentem Klebeband verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. In dieser Zeit kam es zur Bindung zwischen dem Sekundärantikörper und dem Primärantikörper-Antigenkomplex (s. Testprinzip VEGF ELISA). Die *wells* wurden erneut dreimalig mit dem Waschpuffer im Streifenwascher gewaschen.

Zur Herstellung der Substratlösung wurden 11 ml *Color Reagent A and B (R&D Systems)* in einem 50 ml-Röhrchen im Verhältnis 1:1 gemischt und in lichtundurchlässiger Aluminiumfolie bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach 15 Minuten wurden hiervon je 200 µl in jedes *well* gegeben.

Das *Color Reagent* liefert hierbei das Substrat für das an den Sekundärantikörper gekoppelten Reporterenzym (s. Testprinzip VEGF ELISA). Die Mikrotiterplatte wurde nun für 20 Minuten unter einer lichtundurchlässigen Aluminiumfolie aufbewahrt. Nach dieser Zeit ließ sich in den *wells* ein gelblicher Farbumschlag beobachten. Anschließend wurden jeweils 50 µl *Stop Solution (R&D Systems)* in die *wells* gegeben. Es erfolgte ein Farbwechsel vom Gelblichen ins Bläuliche als Zeichen einer erfolgreich beendeten enzymatischen Reaktion. Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

**Materialien ELISA Kit**

Material	Inhaltsstoffe
VEGF Microplate	96 well polystyrene Mikrotiterplatte, beschichtet mit Primärantikörper
VEGF Standard	2000 pg rekombinantes humanes VEGF165
Calibrator Diluent RD5K	Proteinbase
VEGF Conjugate	Detektionsantikörper
Assay Diluent RD1W	
Wash Buffer Concentrate	25-fach konzentrierte Waschpufferlösung
Stop Solution	6 ml 2 N Schwefelsäure
Primärantikörper „Capture Antibody“	Maus anti VEGF Antikörper
Sekundärantikörper „Detection Antibody“	Anti VEGF Antikörper (Merrettichperoxidase gekoppelt)
Wash Buffer	20 ml Wash Buffer Concentrate plus 480 ml ultraeines Wasser
Color Reagent A	12,5 ml stabilisiertes Wasserstoffperoxid
Color Reagent B	12,5 ml stabilisiertes Chromogen

Tabelle 7: Materialien des ELISA Kits  
Dargestellt sind die Materialien des ELISA Kits.

### 2.3.3 Auswertung VEGF ELISA

Der Farbumschlag wurde mit dem Absorptions-Reader (*Elx800, Biotek Instruments*) photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda=450$  nm gegen einen Leerwert aus 200  $\mu$ l *Calibrator Diluent RD5K (R&D Systems)* gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Gen5 (Biotek Instruments)*.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

##### 3.1.1 Kompatibilität rtPA und VEGF-Inhibitoren

In der SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurde der Effekt von rtPA auf die Proteinstruktur der VEGF-Inhibitoren Aflibercept und Ranibizumab untersucht. Das Bandenmuster der VEGF-Inhibitoren wurde in zwei unterschiedlichen Anfärbungen, der Coomassie- und der Silberfärbung, dargestellt und das Molekulargewicht der einzelnen Banden bestimmt (s. Abbildung 2 und 3).

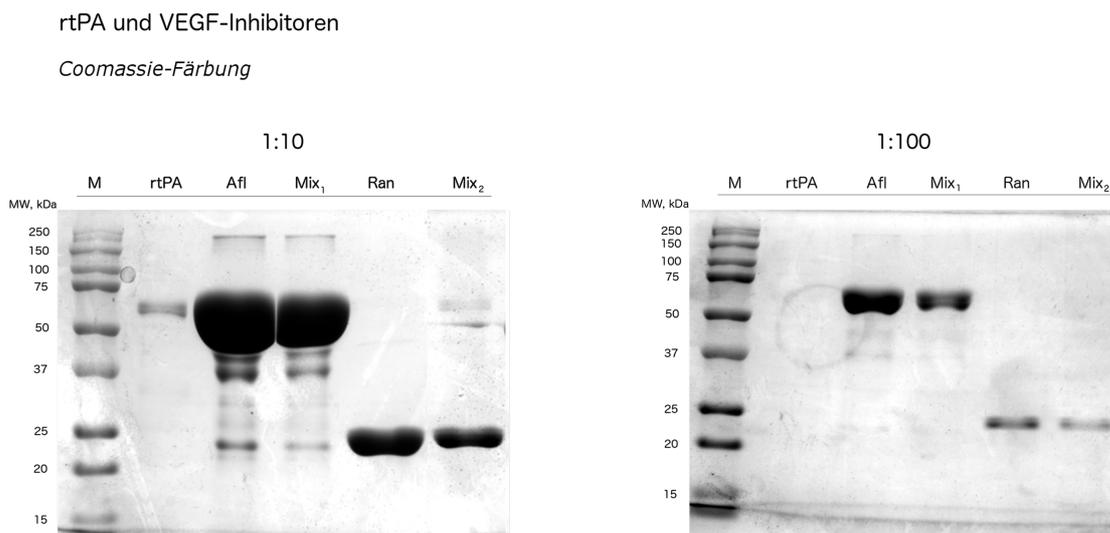


Abbildung 2: rtPA und VEGF-Inhibitoren nach Coomassie-Färbung  
Coomassie-Färbung. Proteinbanden eines repräsentativen SDS-PAGE-Gels nach Ko-Inkubation von rtPA und Aflibercept oder Ranibizumab sowie deren Kontrollproben. Verdünnungen von 1:10 und 1:100 zur besseren Auflösung der Banden. MW, kDa: Molekulargewicht in Kilodalton. M: Molekulargewichtsmarker Precision Plus. rtPA: 1 µg recombinant tissue plasminogen activator. Afl: 200 µg Aflibercept. Mix1: 1 µg rtPA und 200 µg Aflibercept. Ran: 50 µg Ranibizumab. Mix2: 1 µg rtPA und 50 µg Ranibizumab.

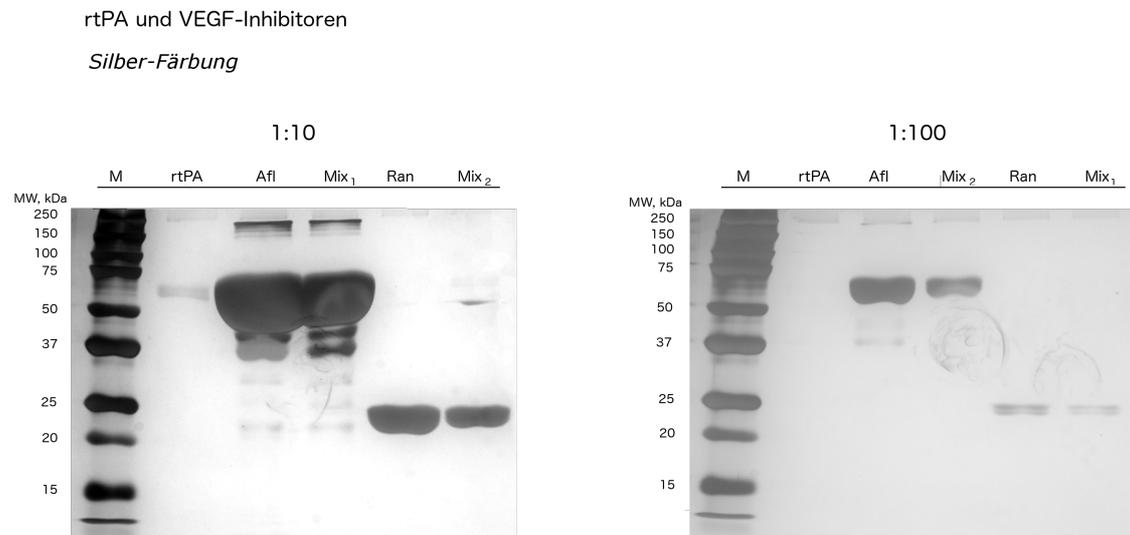


Abbildung 3: rtPA und VEGF-Inhibitoren nach Silber-Färbung  
Silber-Färbung. Proteinbanden eines repräsentativen SDS-PAGE-Gels nach Ko-Inkubation von rtPA und Aflibercept oder Ranibizumab sowie deren Kontrollproben. Verdünnungen von 1:10 und 1:100 zur besseren Auflösung der Banden. MW, kDa: Molekulargewicht in Kilodalton. M: Molekulargewichtsmarker Precision Plus. rtPA: 1 µg recombinant tissue plasminogen activator. Afl: 200 µg Aflibercept. Mix1: 1 µg rtPA und 200 µg Aflibercept. Ran: 50 µg Ranibizumab. Mix2: 1 µg rtPA und 50 µg Ranibizumab.

### ***Kompatibilität rtPA und Ranibizumab***

Das mittlere Molekulargewicht der Banden von rtPA, Ranibizumab sowie rtPA nach Ko-Inkubation mit Ranibizumab nach Darstellung in der Coomassie-Färbung ist in Tabelle 9 aufgezeigt. Nach Ko-Inkubation von rtPA und Ranibizumab zeigten sich in der Coomassie-Färbung weder in der 1:10 noch in der 1:100 Verdünnung zusätzliche Banden. Die Bande von rtPA konnte auf Grund einer höheren Verdünnung in der 1:100 Verdünnung nicht dargestellt werden. Ein repräsentatives Gel ist unter Abbildung 2 dargestellt.

### **Molekulargewicht rtPA und Ranibizumab**

#### *Coomassie-Färbung*

Mittelwert, kDa		
rtPA	Ranibizumab	Mischung
61,74		57,96
	23,95	23,79

Tabelle 8: Molekulargewicht rtPA und Ranibizumab nach Coomassie-Färbung

Abgebildet ist der Mittelwert des Molekulargewichts aller Proteinbanden der SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach Ko-Inkubation von rtPA und Ranibizumab sowie deren Kontrollproben in der 1:10-Verdünnung. kDa: Kilodalton (Molekulargewicht). rtPA: 1 µg recombinant tissue plasminogen activator. Ranibizumab: 50 µg Ranibizumab. Mischung: 1 µg rtPA und 50 µg Ranibizumab.

Das mittlere Molekulargewicht der Banden von rtPA und Ranibizumab sowie rtPA nach Ko-Inkubation mit Ranibizumab nach Darstellung in der Silber-Färbung ist in Tabelle 10 aufgezeigt. Die Ergebnisse stimmen mit denen der Coomassie-Färbung überein. Wiederum wurden keine zusätzlichen Banden nach Ko-Inkubation von rtPA und Ranibizumab gefunden. Ein repräsentatives Gel ist unter Abbildung 3 dargestellt.

### **Molekulargewicht rtPA und Ranibizumab**

#### *Silber-Färbung*

Mittelwert, kDa		
rtPA	Ranibizumab	Mischung
66,42		65,31
	23,55	23,65

Tabelle 9: Molekulargewicht rtPA und Ranibizumab nach Silber-Färbung

Abgebildet ist der Mittelwert des Molekulargewichts aller Proteinbanden der SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach Ko-Inkubation von rtPA und Ranibizumab sowie deren Kontrollproben in der 1:10-Verdünnung. kDa: Kilodalton (Molekulargewicht). rtPA: 1 µg recombinant tissue plasminogen activator. Ranibizumab: 50 µg Ranibizumab. Mischung: 1 µg rtPA und 50 µg Ranibizumab.

### ***Kompatibilität rtPA und Aflibercept***

Das mittlere Molekulargewicht der Banden von rtPA, Aflibercept sowie rtPA nach Ko-Inkubation mit Aflibercept nach Darstellung in der Coomassie-Färbung ist in Tabelle 11 aufgezeigt. Nach Ko-Inkubation von rtPA und Aflibercept zeigten sich in der Coomassie-Färbung weder in der 1:10 noch in der 1:100 Verdünnung zusätzlichen Banden. Ein repräsentatives Gel ist unter Abbildung 2 dargestellt.

#### **Molekulargewicht rtPA und Aflibercept**

*Coomassie-Färbung*

rtPA	Mittelwert, kDa	
	Aflibercept	Mischung
61,74	55,26	57,61
	41,57	43,61
	37,07	37,9
	31,92	30,97
	26,56	25,94
	22,31	23,09

Tabelle 10: Molekulargewicht rtPA und Aflibercept nach Coomassie-Färbung  
Abgebildet ist der Mittelwert des Molekulargewichts aller Proteinbanden der SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach Ko-Inkubation von rtPA und Aflibercept sowie deren Kontrollproben in der 1:10-Verdünnung. kDa: Kilodalton (Molekulargewicht). rtPA: 1 µg recombinant tissue plasminogen activator. Aflibercept: 200 µg Aflibercept. Mischung: 1 µg rtPA und 200 µg Aflibercept.

Das mittlere Molekulargewicht der Banden von rtPA und Aflibercept sowie rtPA nach Ko-Inkubation mit Aflibercept nach Darstellung in der Silber-Färbung ist in Tabelle 12 aufgezeigt. Die Ergebnisse stimmen mit denen der Coomassie-Färbung weitestgehend überein. Wiederum wurden keine zusätzlichen Banden nach Ko-Inkubation von rtPA und Aflibercept gefunden. Banden von Aflibercept mit einem Molekulargewicht von 31,09 kDa und 20,17 kDa konnten allerdings in der Mischung aus rtPA und Aflibercept nicht dargestellt werden. Ein repräsentatives Gel ist unter Abbildung 3 dargestellt.

**Molekulargewicht rtPA und Aflibercept**

*Silber-Färbung*

Mittelwert, kDa		
rtPA	Aflibercept	Mischung
66,42	66,86	68,42
	40,37	41,08
	35,24	35,92
	31,09	
	25,77	24,98
	20,17	

Tabelle 11: Molekulargewicht rtPA und Aflibercept nach Silber-Färbung  
 Abgebildet ist der Mittelwert des Molekulargewichts aller Proteinbanden der SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach Ko-Inkubation von rtPA und Aflibercept sowie deren Kontrollproben in der 1:10-Verdünnung. kDa: Kilodalton (Molekulargewicht). rtPA: 1 µg recombinant tissue plasminogen activator. Aflibercept: 200 µg Aflibercept. Mischung: 1 µg rtPA und 200 µg Aflibercept.

**3.1.2 Kompatibilität Plasmin und VEGF-Inhibitoren**

Plasmin ist das Hauptsubstrat von rtPA. Neben rtPA wurde daher auch die Auswirkung der enzymatischen Aktivität von Plasmin auf die Proteinstruktur der VEGF-Inhibitoren untersucht. Das Bandenmuster wurde wiederum in zwei unterschiedlichen Anfärbungen dargestellt und das Molekulargewicht der einzelnen Banden ermittelt (s. Abbildung 4 und 5).

## Ergebnisse

Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Volumina

Coomassie-Färbung

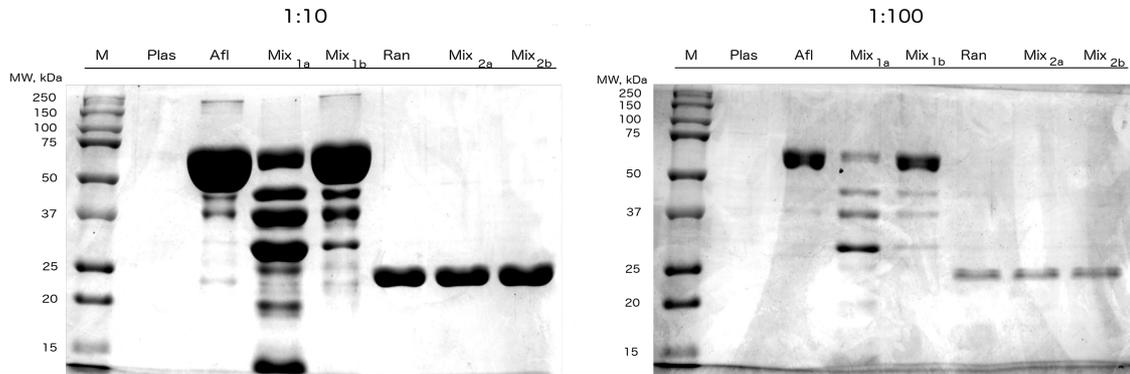


Abbildung 4: Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Volumina nach Coomassie-Färbung  
Proteinbanden eines repräsentativen SDS-PAGE-Gels nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept oder Ranibizumab sowie deren Kontrollproben. Zwei Konzentrationen von Plasmin. Verdünnungen von 1:10 und 1:100 zur besseren Auflösung der Banden. MW, kDa: Molekulargewicht in Kilodalton. M: Molekulargewichtsmarker Precision Plus. Plas: 2 U Plasmin. Afl: 200 µg Aflibercept. Mix<sub>1a</sub>: 2 U Plasmin und 200 µg Aflibercept. Mix<sub>1b</sub>: 0,2 U und 200 µg Aflibercept. Ran: 50 µg Ranibizumab. Mix<sub>2a</sub>: 2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab. Mix<sub>2b</sub>: 0,2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab.

Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Volumina

Silber-Färbung

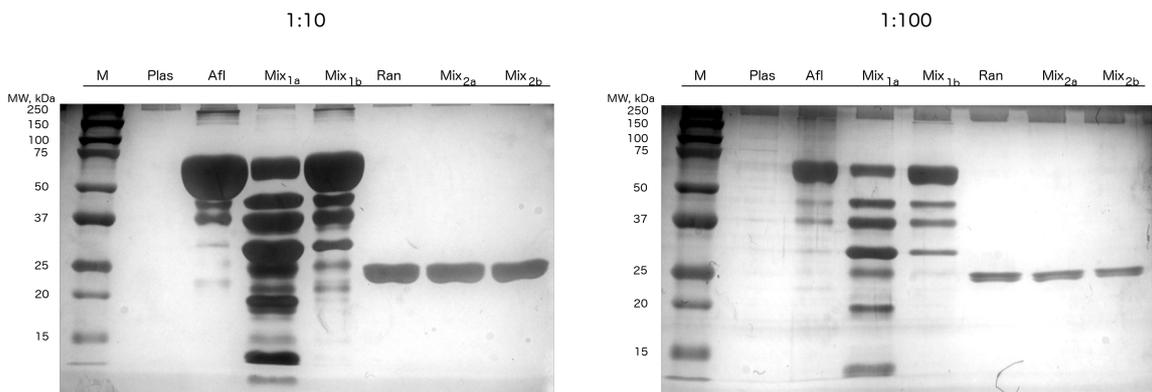


Abbildung 5: Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Volumina nach Silber-Färbung  
Proteinbanden eines repräsentativen SDS-PAGE-Gels nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept oder Ranibizumab sowie deren Kontrollproben. Zwei Konzentrationen von Plasmin. Verdünnungen von 1:10 und 1:100 zur besseren Auflösung der Banden. MW, kDa: Molekulargewicht in Kilodalton. M: Molekulargewichtsmarker Precision Plus. Plas: 2 U Plasmin. Afl: 200 µg Aflibercept. Mix<sub>1a</sub>: 2 U Plasmin und 200 µg Aflibercept. Mix<sub>1b</sub>: 0,2 U und 200 µg Aflibercept. Ran: 50 µg Ranibizumab. Mix<sub>2a</sub>: 2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab. Mix<sub>2b</sub>: 0,2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab.

***Kompatibilität Plasmin und Ranibizumab***

Das mittlere Molekulargewicht der Banden von Plasmin, Ranibizumab sowie Plasmin nach Ko-Inkubation mit Ranibizumab (2 U Plasmin in Mischung 1 und 0,2 U Plasmin in Mischung 2 sowie jeweils 50 µg Ranibizumab) nach Darstellung in der Coomassie-Färbung ist in der Tabelle 13 aufgezeigt. Nach Ko-Inkubation von Plasmin und Ranibizumab zeigten sich in der Coomassie-Färbung weder in der 1:10 noch in der 1:100 Verdünnung zusätzlichen Banden. Die Banden von Ranibizumab erschienen korrespondierend ebenso in den Mischungen mit Plasmin. Die Banden von Plasmin konnten nicht dargestellt werden. Ein repräsentatives Gel ist unter Abbildung 4 dargestellt.

**Molekulargewicht Plasmin und Ranibizumab**

*Coomassie-Färbung*

Mittelwert, kDa			
Plasmin	Ranibizumab	Mischung 1	Mischung 2
	24,7	24,9	25,1

Tabelle 12: Molekulargewicht Plasmin und Ranibizumab nach Coomassie-Färbung  
 Abgebildet ist der Mittelwert des Molekulargewichts aller Proteinbanden der SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach Ko-Inkubation von Plasmin und Ranibizumab sowie deren Kontrollproben in der 1:10-Verdünnung. kDa: Kilodalton (Molekulargewicht). Plasmin: 2 U Plasmin. Ranibizumab: 50 µg Ranibizumab. Mischung 1: 2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab. Mischung 2: 0,2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab.

Das mittlere Molekulargewicht der Banden von Plasmin, Ranibizumab sowie Plasmin nach Ko-Inkubation mit Ranibizumab (2 U Plasmin in Mischung 1 und 0,2 U Plasmin in Mischung 2) nach Darstellung in der Silber-Färbung ist in der Tabelle 14 aufgezeigt. Die Ergebnisse stimmen mit denen der Coomassie-Färbung überein. Wiederum wurden keine zusätzlichen Banden nach Ko-Inkubation von Plasmin und Ranibizumab gefunden. Ein repräsentatives Gel ist unter Abbildung 5 dargestellt.

**Molekulargewicht Plasmin und Ranibizumab**

*Silber-Färbung*

Mittelwert, kDa			
Plasmin	Ranibizumab	Mischung 1	Mischung 2
	24,29	24,16	24,44

Tabelle 13: Molekulargewicht Plasmin und Ranibizumab nach Silber-Färbung  
 Abgebildet ist der Mittelwert des Molekulargewichts aller Proteinbanden der SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach Ko-Inkubation von Plasmin und Ranibizumab sowie deren Kontrollproben in der 1:10-Verdünnung. kDa: Kilodalton (Molekulargewicht). Plasmin: 2 U Plasmin. Ranibizumab: 50 µg Ranibizumab. Mischung 1: 2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab. Mischung 2: 0,2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab.

***Kompatibilität Plasmin und Aflibercept***

Das mittlere Molekulargewicht der Banden von Plasmin, Aflibercept sowie Plasmin nach Ko-Inkubation mit Aflibercept (2 U Plasmin in Mischung 1 und 0,2 U Plasmin in Mischung 2 sowie jeweils 200 µg Aflibercept) nach Darstellung in der Coomassie-Färbung ist in Tabelle 15 aufgezeigt. Im Gegensatz zu Ranibizumab konnten nach Ko-Applikation von Plasmin mit Aflibercept zusätzliche Banden in niedrigeren Bereichen des Molekulargewichts von 19,9 kDa und 12,7 kDa dargestellt werden. Die Ergebnisse der 1:100 Verdünnung stimmen mit denen der 1:10 Verdünnung überein, obgleich die Ausprägung der zusätzlichen Banden durch die höhere Verdünnung geringer ausfällt. Die Banden von Plasmin konnten nicht dargestellt werden. Ein repräsentatives Gel ist in Abbildung 4 dargestellt.

### Molekulargewicht Plasmin und Aflibercept

#### *Coomassie-Färbung*

Mittelwert, kDa			
Plasmin	Aflibercept	Mischung 1	Mischung 2
	56,0	61,4	58,8
	45,7	46,6	47,0
	39,2	37,9	39,4
	30,9	29,3	30,6
	26,5	25,7	26,5
	23,2	23,4	23,5
		<b>19,9</b>	
		<b>12,7</b>	

Tabelle 14: Molekulargewicht Plasmin und Aflibercept nach Coomassie-Färbung  
 Abgebildet ist der Mittelwert des Molekulargewichts aller Proteinbanden der SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept sowie deren Kontrollproben in der 1:10-Verdünnung. Coomassie-Färbung. Zusätzliche Banden in fetter Schriftstärke. kDa: Kilodalton (Molekulargewicht). Plasmin: 2 U Plasmin. Aflibercept: 200 µg Aflibercept. Mischung 1: 2 U Plasmin und 200 µg Aflibercept. Mischung 2: 0,2 U Plasmin und 200 µg Aflibercept.

Das mittlere Molekulargewicht der Banden von Plasmin, Aflibercept sowie Plasmin nach Ko-Inkubation mit Aflibercept (2 U Plasmin in Mischung 1 und 0,2 U Plasmin in Mischung 2 sowie jeweils 200 µg Aflibercept) nach Darstellung in der Silber-Färbung ist in Tabelle 16 aufgezeigt. Die Ergebnisse stimmen mit denen der Coomassie-Färbung weitestgehend überein. Nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept wurden erneut zusätzliche Banden mit einem Molekulargewicht von 19,48 kDa und 12,70 kDa gefunden, die denen der Coomassie-Färbung mit einem Molekulargewicht von 19,9 kDa und 12,7 kDa entsprechen. Vor allem in Bereichen mit niedrigem Molekulargewicht ermöglichte die Silber-Färbung eine exaktere Bestimmung der Banden. Es ließ sich eine zusätzliche Bande von 15,28 kDa detektieren, die in der Coomassie-Färbung nicht sichtbar geworden war. Die 1:100 Verdünnung, in der nach Ko-Inkubation von Plasmin und Ranibizumab ebenfalls zusätzliche Banden gefunden wurden, verdeutlicht die höhere Sensitivität der Silber-Färbung im

Vergleich zur Coomassie-Färbung durch ihre akkurate Abbildung der einzelnen Banden. Ein repräsentatives Gel ist in Abbildung 5 dargestellt.

**Molekulargewicht Plasmin und Aflibercept**

*Silber-Färbung*

Mittelwert, kDa			
Plasmin	Aflibercept	Mischung 1	Mischung 2
	62,04	61,38	60,85
	41,33	44,66	44,84
	35,96	35,98	37,13
	28,58	28,57	28,89
	25,53	24,61	24,94
	22,54	21,36	21,38
		<b>19,48</b>	17,74
		<b>15,28</b>	
		<b>12,70</b>	

Tabelle 15: Molekulargewicht Plasmin und Aflibercept nach Silber-Färbung  
 Abgebildet ist der Mittelwert des Molekulargewichts aller Proteinbanden der SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept sowie deren Kontrollproben in der 1:10-Verdünnung. Zusätzliche Banden in fetter Schriftstärke. kDa: Kilodalton (Molekulargewicht). Plasmin: 2 U Plasmin. Aflibercept: 200 µg Aflibercept. Mischung 1: 2 U Plasmin und 200 µg Aflibercept. Mischung 2: 0,2 U Plasmin und 200 µg Aflibercept.

***Densitometrische Auswertung der Kompatibilität von Plasmin mit gleichen Mengen aller VEGF-Inhibitoren***

Zum direkten Vergleich der Dichte der einzelnen Banden aller VEGF-Inhibitoren – inklusive Bevacizumab – nach Ko-Inkubation mit Plasmin wurden Proben der VEGF-Inhibitoren von jeweils 50 µg vorbereitet und in der SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetragen (s. Abbildung 6 und 7).

## Ergebnisse

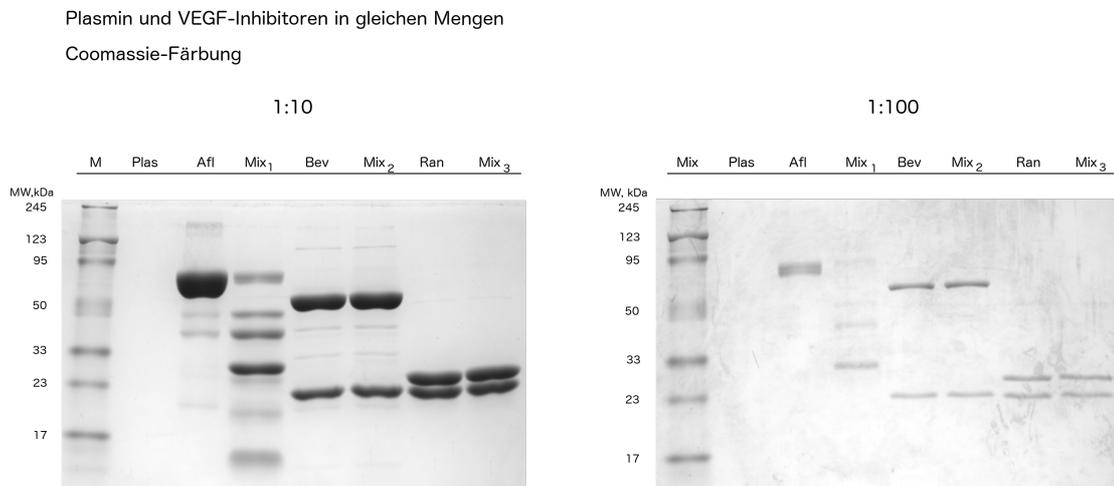


Abbildung 6: Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Mengen zur densitometrischen Auswertung nach Coomassie-Färbung

Proteinbanden eines repräsentativen SDS-PAGE-Gels nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept, Bevacizumab oder Ranibizumab sowie deren Kontrollproben. Verdünnungen von 1:10 und 1:100 zur besseren Auflösung der Banden. MW, kDa: Molekulargewicht in Kilodalton. M: Molekulargewichtsmarker Roti-Mark. Plas: 2 U Plasmin. Afl: 50 µg Aflibercept. Mix1: 2 U Plasmin und 50 µg Aflibercept. Bev: 50 µg Bevacizumab. Mix2: 2 U Plasmin und 50 µg Bevacizumab. Ran: 50 µg Ranibizumab. Mix3: 2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab.

Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Mengen

Silber-Färbung

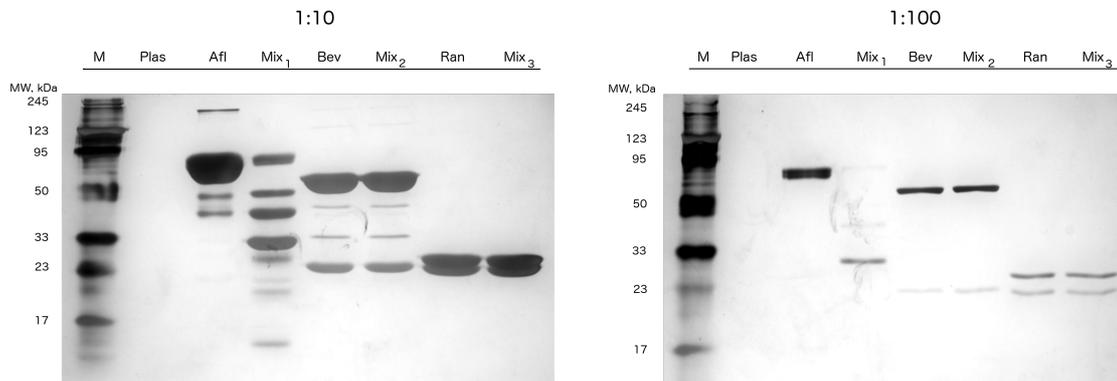


Abbildung 7: Plasmin und VEGF-Inhibitoren in gleichen Mengen zur densitometrischen Auswertung nach Silber-Färbung

Proteinbanden eines repräsentativen SDS-PAGE-Gels nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept, Bevacizumab oder Ranibizumab sowie deren Kontrollproben. Verdünnungen von 1:10 und 1:100 zur besseren Auflösung der Banden. MW, kDa: Molekulargewicht in Kilodalton. M: Molekulargewichtsmarker „Roti-Mark“. Plas: 2 U Plasmin. Afl: 50 µg Aflibercept. Mix1: 2 U Plasmin und 50 µg Aflibercept. Bev: 50 µg Bevacizumab. Mix2: 2 U Plasmin und 50 µg Bevacizumab. Ran: 50 µg Ranibizumab. Mix3: 2 U Plasmin und 50 µg Ranibizumab.

Nach Ko-Inkubation von Plasmin mit 50 µg Ranibizumab zeigten sich weder in der Coomassie- noch in der Silber-Färbung zusätzliche Banden. Sowohl in Ko-Inkubation als auch in der Kontrollinkubation ohne Plasmin konnte in den Anfärbungen ein Bandenmuster mit zwei Banden von 26 kDa und 23 kDa dargestellt werden (s. Abbildung 6 und 7 sowie 8 und 9).

Plasmin und Ranibizumab

Densitometrische Auswertung nach Coomassie-Färbung

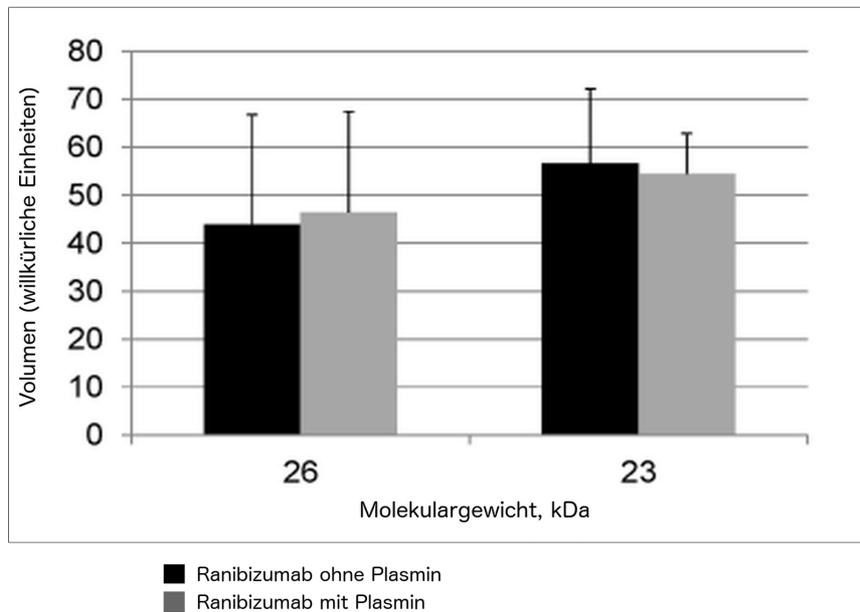


Abbildung 8: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Ranibizumab nach Coomassie-Färbung  
Erläuterung s.u.

Plasmin und Ranibizumab

Densitometrische Auswertung nach Silber-Färbung

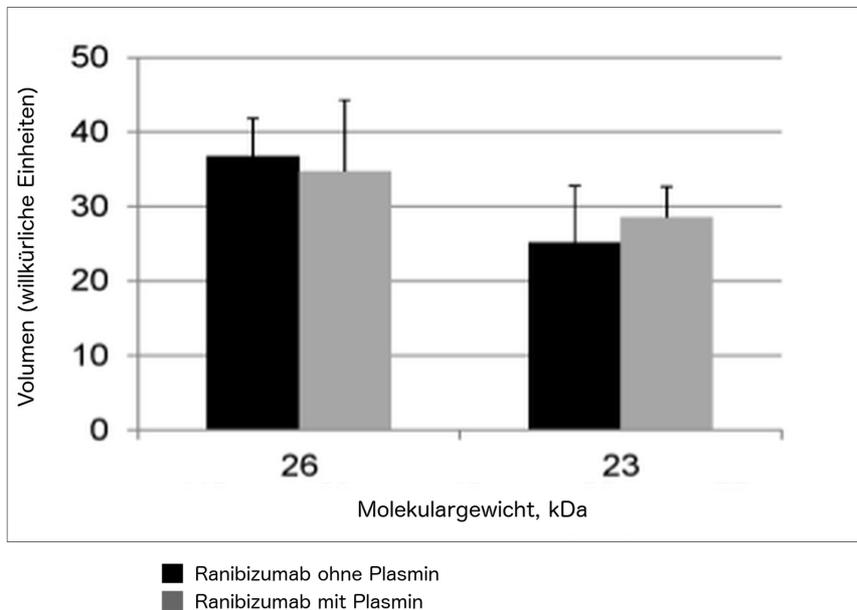


Abbildung 9: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Ranibizumab nach Silber-Färbung

Auswertung eines repräsentativen SDS-PAGE-Gels nach Ko-Inkubation von Plasmin und Ranibizumab. Umgezeichnet nach Klettner et al. [im Druck]. Schwarzer Balken: 50 µg Ranibizumab ohne Plasmin. Grauer Balken: 50 µg Ranibizumab und 2 U Plasmin.

Bereits in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Bevacizumab nicht von Plasmin gespalten wird (Klettner et al. 2012). Auch in den durchgeführten Versuchen zeigten sich nach Ko-Inkubation mit Plasmin keine zusätzlichen Banden (s. Abbildung 6 und 7).

In der Coomassie-Färbung konnten Banden mit einem Molekulargewicht von 55 kDa und 22 kDa dargestellt werden sowie schmalere Banden von 118 kDa, 40 kDa und 33 kDa. In der Silber-Färbung zeigten sich entsprechende Banden mit einem Molekulargewicht von 63 kDa und 23 kDa sowie schmalere Banden von 147 kDa, 39 kDa und 34 kDa (s. Abbildung 10 und 11).

Plasmin und Bevacizumab

Densitometrische Auswertung nach Coomassie-Färbung

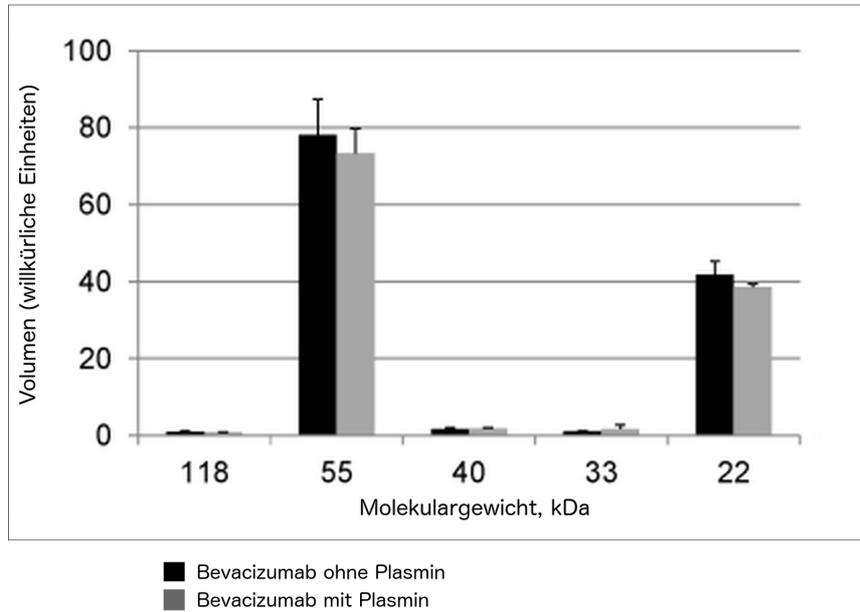


Abbildung 10: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Bevacizumab nach Coomassie-Färbung  
Erläuterung s.u.

Plasmin und Bevacizumab

Densitometrische Auswertung nach Silber-Färbung

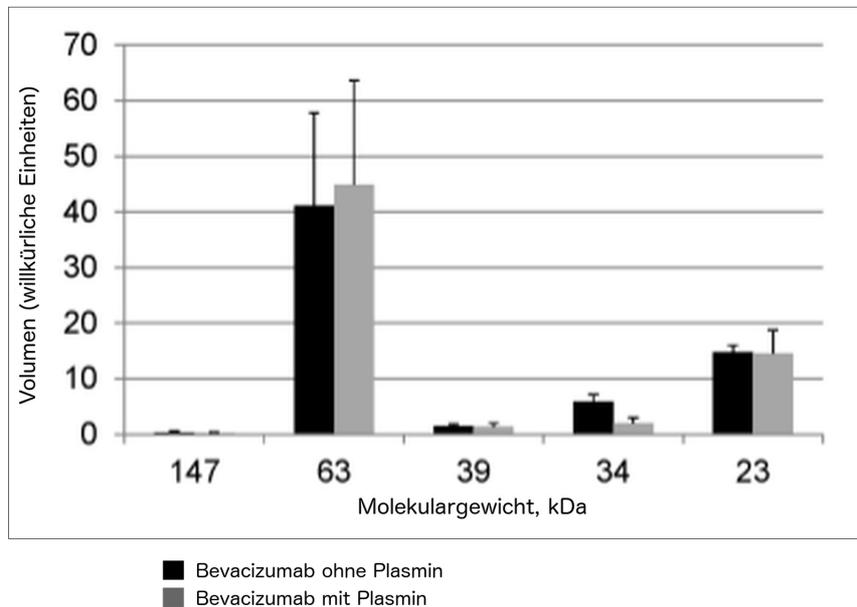


Abbildung 11: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Bevacizumab nach Silber-Färbung  
 Auswertung eines repräsentativen SDS-PAGE-Gels nach Ko-Inkubation von Plasmin und Bevacizumab. Umgezeichnet nach Klettner et al. [im Druck]. Schwarzer Balken: 50 µg Bevacizumab ohne Plasmin. Grauer Balken: 50 µg Bevacizumab und 2 U Plasmin.

Hingegen zeigte sich nach Ko-Inkubation von Plasmin mit 50 µg Aflibercept erneut eine Abnahme der Intensität der Hauptbanden, sowie zusätzliche Banden in niedrigeren Bereichen des Molekulargewichts. In der Coomassie-Färbung zeigte sich die ursprüngliche Hauptbande von 78 kDa und die schmaleren Banden von 47 kDa und 39 kDa verteilt auf zusätzliche Banden von 30 kDa, 27 kDa, 19 kDa und 15 kDa (s. Abbildung 12). In der Silber-Färbung zeigte sich ein entsprechendes Muster der Verteilung der ursprünglichen Banden auf zusätzliche Banden mit Molekulargewichten von 31 kDa, 26 kDa, 21 kDa, 19 kDa und 15 kDa. Erneut ermöglichte die sensitivere Silber-Färbung die Detektion einer zusätzlichen Bande von 21 kDa (s. Abbildung 13).

Plasmin und Aflibercept

Densitometrische Auswertung nach Coomassie-Färbung

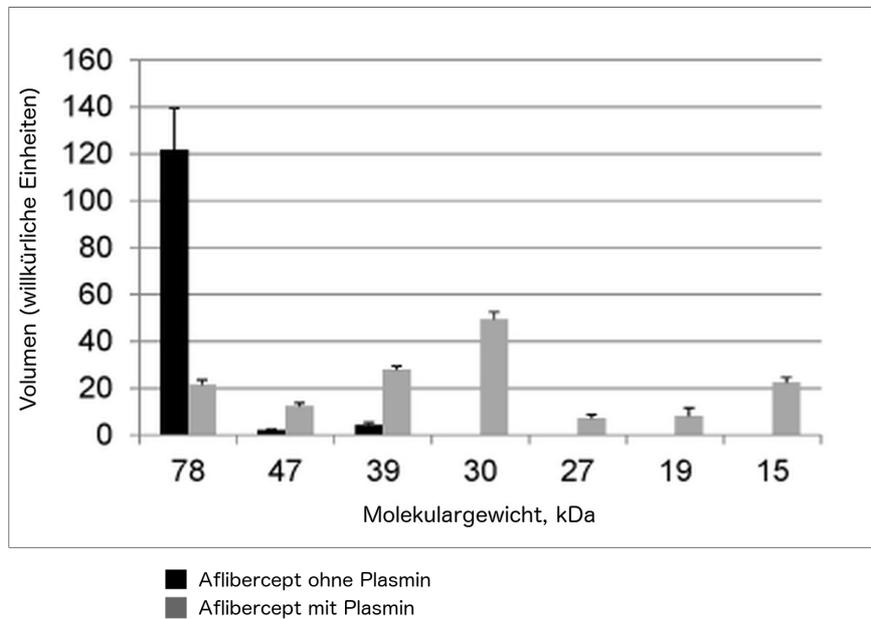


Abbildung 12: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Aflibercept nach Coomassie-Färbung  
Erläuterung s.u.

Plasmin und Aflibercept

Densitometrische Auswertung nach Silber-Färbung

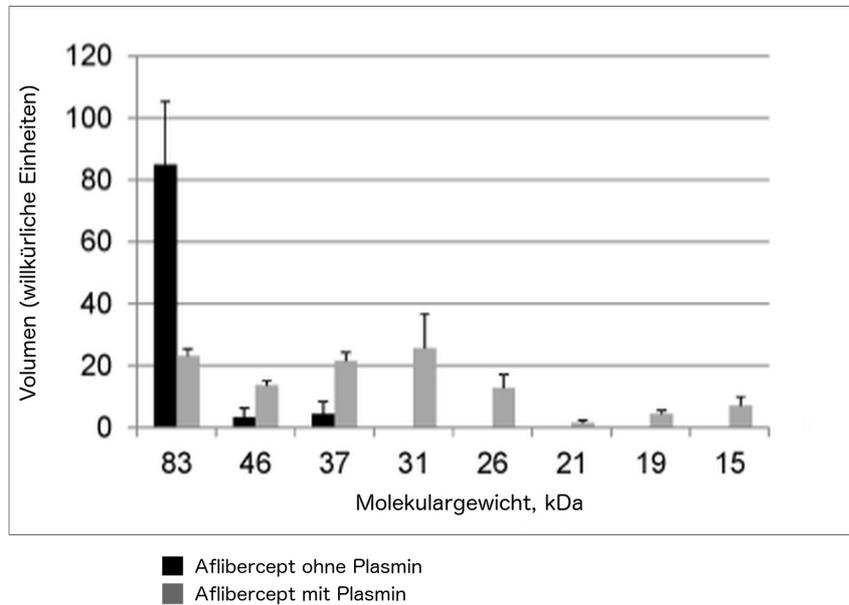


Abbildung 13: Densitometrische Auswertung von Plasmin und Aflibercept nach Silber-Färbung  
Auswertung eines repräsentativen SDS-PAGE-Gels nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept. Umgezeichnet nach Klettner et al. [im Druck]. Schwarzer Balken: 50 µg Aflibercept ohne Plasmin. Grauer Balken: 50 µg Aflibercept und 2 U Plasmin.

## **3.2 VEGF ELISA**

Im VEGF ELISA wurde untersucht, ob rtPA, Plasmin oder andere während der Fibrinolyse aktivierte Proteasen Aflibercept oder Ranibizumab in ihrer Funktion beeinträchtigen, VEGF im RPE-Zellüberstand vollständig zu inhibieren.

### **3.2.1 Kompatibilität von rtPA - mit und ohne humanes Blut - und VEGF-Inhibitoren**

#### ***Kompatibilität von rtPA und Aflibercept bzw. Ranibizumab***

Nach Ko-Inkubation von 2 µg rtPA und Aflibercept (400 µg in 500 µl RPE-Zellüberstand) bzw. Ranibizumab (100 µg in 500 µl RPE-Zellüberstand) für 2 Stunden bei 37 °C konnte im VEGF ELISA kein VEGF nachgewiesen werden. Es zeigte sich damit eine vollständige Inhibition von VEGF im RPE-Zellüberstand und kein Verlust der anti-VEGF-Effektivität von Aflibercept bzw. Ranibizumab durch direkte enzymatische Wirkung von rtPA. In den Kontrollproben von Aflibercept und Ranibizumab konnte ebenfalls kein VEGF nachgewiesen werden. In der Kontrollprobe von rtPA ohne einen VEGF-Antagonisten zeigten sich hingegen signifikante Mengen an VEGF (s. Abbildung 14).

Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept und Ranibizumab

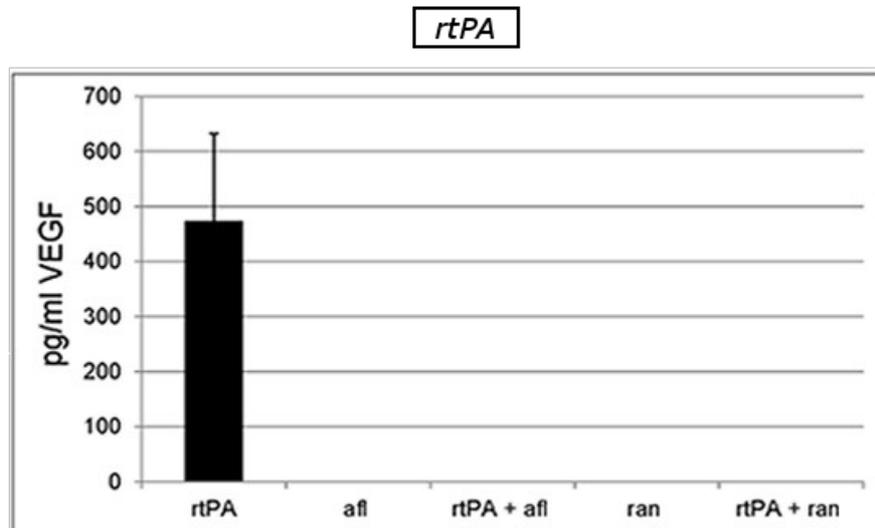


Abbildung 14: Anti-VEGF-Effektivität von Aflibercept und Ranibizumab mit rtPA  
 Dargestellt ist die Wirksamkeit der VEGF-Inhibition von Aflibercept und Ranibizumab in Ko-Inkubation mit rtPA im VEGF-ELISA. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung.  
 Umgezeichnet nach Klettner et al. [im Druck]. VEGF-Gehalt in pg/ml. rtPA: recombinant tissue plasminogen activator. Afl: Aflibercept. Ran: Ranibizumab.

***Kompatibilität von rtPA und Ranibizumab bzw. Aflibercept in humanem Blut***

Nach Ko-Inkubation von rtPA und Aflibercept bzw. Ranibizumab in intraoperative verwendeten Konzentrationen (10µg rtPA, 2 mg Aflibercept und 0,5 mg Ranibizumab in 500 µl RPE-Zellüberstand) in humanem Blut für 30 Minuten bei 37 °C konnte im VEGF ELISA kein VEGF nachgewiesen werden. Es zeigte sich auch hier eine vollständige Inhibition von VEGF im RPE-Zellüberstand. Ein Verlust der anti-VEGF-Effektivität von Aflibercept oder Ranibizumab durch direkte enzymatische Wirkung von rtPA, indirekte Wirkung von rtPA über die Konversion von Plasminogen zu enzymatisch aktivem Plasmin oder die Wirkung anderer in der Fibrinolyse aktivierten Proteasen ist somit nicht zu beobachten. In den Kontrollproben von Aflibercept und Ranibizumab konnte ebenfalls kein VEGF nachgewiesen werden. In der Kontrollprobe von rtPA und Blut ohne einen VEGF-Antagonisten zeigten sich hingegen signifikante Mengen an VEGF (s. Abbildung 15).

### Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept und Ranibizumab

*rtPA und humanes Blut*

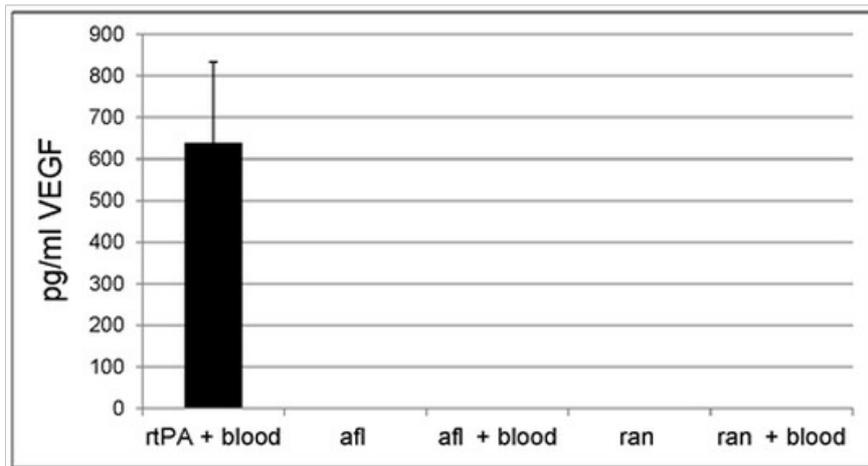


Abbildung 15: Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept und Ranibizumab mit rtPA und humanem Blut  
Dargestellt ist die Wirksamkeit der VEGF-Inhibition von Aflibercept und Ranibizumab in Ko-Inkubation mit rtPA in simulierten intraoperativen Bedingungen im VEGF-ELISA. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung. Umgezeichnet nach Klettner et al. [im Druck].  
VEGF-Gehalt in pg/ml. rtPA: recombinant tissue plasminogen activator. blood: Humanes Blut. afl: Aflibercept. ran: Ranibizumab.

### 3.2.2 Kompatibilität von Plasmin und VEGF-Inhibitoren

#### *Kompatibilität von Plasmin und Ranibizumab*

Nach Ko-Inkubation von 2 U Plasmin mit Ranibizumab (100 µg in 500 µl RPE-Zellüberstand) für 2 Stunden bei 37 °C konnte im VEGF ELISA kein VEGF nachgewiesen werden. Es zeigte sich damit eine vollständige Inhibition von VEGF im RPE-Zellüberstand und kein Verlust der anti-VEGF-Effektivität von Ranibizumab durch direkte enzymatische Wirkung von Plasmin. In der Kontrollprobe von Ranibizumab konnte ebenfalls kein VEGF nachgewiesen werden. In der Kontrollprobe von Plasmin ohne VEGF-Antagonisten konnte

hingegen VEGF nachgewiesen werden (s. Abbildung 16).

### ***Kompatibilität von Plasmin und Aflibercept***

Nach Ko-Inkubation von 2 U Plasmin mit Aflibercept (400 µg in 500 µl RPE-Zellüberstand) für 2 Stunden bei 37 °C konnten im VEGF ELISA minimale Mengen an VEGF nachgewiesen werden. Trotz Spaltung durch Plasmin zeigte sich interessanterweise eine fast vollständige Inhibition von VEGF im RPE-Zellüberstand. Dennoch ergibt sich hieraus ein Verlust der anti-VEGF-Effektivität von Aflibercept durch direkte enzymatische Wirkung von Plasmin. In der Probe aus alleinigem Aflibercept konnte kein VEGF nachgewiesen werden.

In den Proben der Kontrolle bestehend aus Plasmin ohne einen VEGF-Antagonisten konnte hingegen VEGF nachgewiesen werden (s. Abbildung 16).

### **Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept und Ranibizumab**

**Plasmin**

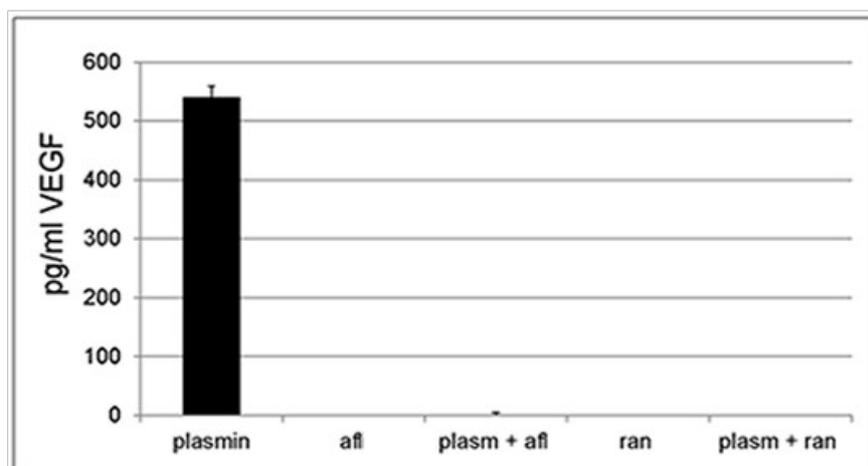


Abbildung 16: Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept und Ranibizumab mit Plasmin  
Dargestellt ist die Wirksamkeit der VEGF-Inhibition von Aflibercept und Ranibizumab in Ko-Inkubation mit Plasmin im VEGF-ELISA. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung. Umgezeichnet nach Klettner et al. [im Druck]. VEGF-Gehalt in pg/ml. Plas: Plasmin. afl: Aflibercept. ran: Ranibizumab.

### **3.2.3 Einfluss von Plasmin auf den Grenzwert einer wirksamen Aflibercept-Konzentration**

Nach Inkubation von 150 ng/ml Aflibercept in 500 µl RPE-Zellüberstand konnten im VEGF ELISA signifikante Mengen an VEGF im Medium des RPE-Zellüberstands nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich nach Inkubation von 200 ng/ml Aflibercept eine vollständige Inhibition von VEGF im RPE-Zellüberstand.

Hieraus ergibt sich eine Aflibercept-Konzentration von 200 ng/ml als Grenzwert einer VEGF-inhibitorischen Wirksamkeit, die dennoch in der Lage ist, eine vollständige VEGF-Inhibition im Medium aus 500 µl RPE-Zellüberstand durchzuführen.

Nach Ko-Inkubation von 200 ng/ml Aflibercept mit 4 U Plasmin konnten im VEGF ELISA hingegen signifikante Mengen von VEGF im Medium aus dem RPE-Zellüberstand nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich eine Aufhebung der VEGF-Inhibition von Aflibercept, sobald Plasmin mit minimal wirksamen Konzentration von Aflibercept koinkubiert wird (s. Abbildung 17).

Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept

**Plasmin**

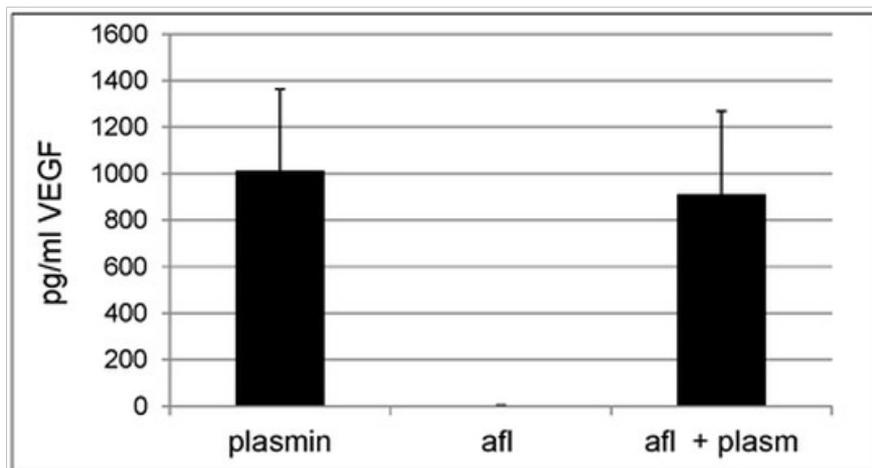


Abbildung 17: Anti-VEGF-Effektivität Aflibercept mit Plasmin  
Dargestellt ist die Wirksamkeit der VEGF-Inhibition von Aflibercept in Grenzwerten der VEGF-inhibitorisch wirksamen Konzentrationen in Ko-Inkubation mit Plasmin im VEGF-ELISA. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen. Umgezeichnet nach Klettner et al. [im Druck]. VEGF-Gehalt in pg/ml. Plas: Plasmin. afl: Aflibercept.

## 4 Diskussion

Für unser *in-vitro*-Modell zur Simulation der kombinierten subretinalen Injektion von rtPA und VEGF-Inhibitoren im Rahmen einer submakulären Blutung konnten die relativen Konzentrationen von rtPA und Plasmin, sowie Aflibercept und Ranibizumab aufgrund sehr variabler Volumina submakulärer Blutungen nur vermutet werden. Deshalb haben wir unsere Experimente an vorangegangenen Untersuchungen zu Volumina submakulärer Blutungen orientiert (Klettner et al. 2012). Den Einfluss von rtPA auf die VEGF-Inhibitoren untersuchten wir unter Verwendung gleicher Volumina der VEGF-Inhibitoren, den Einfluss von Plasmin unter Verwendung zweier Konzentrationen von Plasmin, da die klinische Konzentration der Protease in einer submakulären Blutung unbekannt ist.

Um sicher zu gehen, dass die Spaltung von Aflibercept durch Plasmin nicht durch eine unterschiedliche Konzentration des VEGF-Inhibitors gegenüber Ranibizumab entsteht, untersuchten wir die Interaktion zwischen Plasmin und VEGF-Inhibitoren zusätzlich mit gleichen Konzentrationen der VEGF-Inhibitoren. Gleiche Konzentrationen der VEGF-Inhibitoren waren zudem Voraussetzung, um das Bandenmuster der VEGF-Inhibitoren densitometrisch auswerten und vergleichen zu können. In diesem Versuchsteil berücksichtigten wir zusätzlich Bevacizumab, um alle drei VEGF-Inhibitoren in Beziehung zueinander setzen zu können. Ein Hinweis auf eine strukturelle oder funktionelle Beeinträchtigung von Bevacizumab durch Plasmin konnte nicht erbracht werden. Dies ist in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien über die Kompatibilität von Bevacizumab und rtPA bzw. Plasmin (Klettner et al. 2012).

Für die Gelelektrophorese verwendeten wir Gele mit einem 12-prozentigen Acrylamid-Anteil, weil sie Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 - 70 kDa optimal darstellen können. In diesem Bereich kamen in unseren Versuchen die meisten Banden zur Darstellung.

Zur Darstellung der Gele der Elektrophorese verwendeten wir zusätzlich zur Coomassie-Färbung die sensitivere Silberfärbung. So konnten die Ergebnisse der Coomassie-Färbung einerseits mit einer zweiten Methode überprüft und andererseits zusätzliche Banden dargestellt werden, die mit der Coomassie-Färbung nicht erfasst werden können. Die Ergebnisse der Silber-Färbung konnten die Ergebnisse der Coomassie-Färbung eindeutig

bestätigen.

Es bleibt anzumerken, dass im *in-vitro*-Modell zur Untersuchung der Kompatibilität von rtPA und VEGF-Inhibitoren die Ergebnisse der Elektrophorese allein nicht ausreichen, um eine therapeutische Kompatibilität der Substanzen für die intraoperative Anwendung nachzuweisen. Da die Elektrophorese selbst VEGF-Inhibitoren spaltet, kann ein durch rtPA-generiertes Spaltprodukt durch die Gelelektrophorese nur dann als solches erkannt werden, wenn rtPA die VEGF-Inhibitoren nicht zufälligerweise an der selben Stelle spaltet wie die Gelelektrophorese. Zudem könnten fragmentierte Aflibercept- oder Ranibizumab-Moleküle trotz Spaltung weiterhin anti-angiogenetisch wirksam sein, sofern die Spaltung nicht die VEGF-Bindungsstelle betrifft. Aus diesem Grund quantifizierten wir die VEGF-Bindung von Aflibercept und Ranibizumab nach Ko-Inkubation mit rtPA und Plasmin im VEGF ELISA.

In Hinblick auf die Frage der intraoperativen Beeinflussung von VEGF-Inhibitoren sind noch weitere Mechanismen zu bedenken. Ranibizumab und Aflibercept könnten durch unbestimmte, während der Fibrinolyse aktivierte Proteasen strukturell und funktionell beeinträchtigt werden. Ähnlich wie die Aufnahme von Bevacizumab durch Thrombozyten (Verheul et al. 2007) könnten Ranibizumab und Aflibercept von Thrombozyten oder anderen in einer submakulären Blutung aktivierten Zellen resorbiert werden. In Hinblick auf die Frage der therapeutischen Konsequenz unserer Ergebnisse haben wir daher im *in-vitro*-Modell die intraoperative Situation der subretinalen Ko-Applikation von rtPA und VEGF-Inhibitoren an geronnenem humanem Blut simuliert. Im VEGF ELISA quantifizierten wir die Bindung der VEGF-Inhibitoren an VEGF bei Ko-Applikation mit rtPA in humanem Blut.

Bei diesen Experimenten lysierte rtPA das geronnene Blut. Um sicherzustellen, dass die Moleküle aller VEGF-Inhibitoren mit eventuell vorhandenen, durch die Fibrinolyse aktivierten Proteasen gesättigt waren, verwendeten wir im Experiment eine größere Menge Blut, als die zuvor kalkulierte Menge einer submakulären Blutung *in-vivo* (Klettner et al. 2012).

Nach Ko-Inkubation der VEGF-Inhibitoren mit rtPA und Plasmin – mit und ohne humanes Blut – konnte im VEGF ELISA kein Verlust der anti-VEGF-Effektivität von Aflibercept oder Ranibizumab nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass weder rtPA, noch andere während der Fibrinolyse aktivierte Proteasen Struktur und Funktion von Aflibercept

oder Ranibizumab beeinträchtigen.

Die Resultate der Gelelektrophorese zeigen, dass Ranibizumab nach Ko-Inkubation sowohl mit rtPA als auch mit Plasmin strukturell intakt bleibt. Im VEGF ELISA konnte anschließend kein Verlust der anti-VEGF-Effektivität nachgewiesen werden.

In Hinblick auf die Fragestellung der Kompatibilität von rtPA und Ranibizumab kann angenommen werden, dass

- (1) Ranibizumab weder direkt durch enzymatische Wirkung von rtPA, noch indirekt über eine rtPA-induzierte Konversion von Plasminogen zu enzymatisch aktivem Plasmin gespalten wird,
- (2) die anti-angiogene Wirksamkeit von Ranibizumab durch Kontakt mit rtPA oder Plasmin unbeeinträchtigt bleibt.

Die Gelelektrophorese zeigte nach Ko-Inkubation von rtPA mit Aflibercept sich entsprechende Ergebnisse. Zusätzlichen Banden konnten nicht gefunden werden. Ein Verlust der anti-VEGF-Effektivität zeigte sich im VEGF ELISA nicht.

Hingegen konnten nach Ko-Inkubation von Plasmin mit Aflibercept zusätzliche Banden in der Gelelektrophorese dargestellt werden. Interessanterweise wiesen die Ergebnisse des anschließenden VEGF ELISA nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept nur minimale Mengen an VEGF nach. Trotz Spaltung scheint Aflibercept weiterhin in der Lage zu sein, VEGF zu inhibieren.

In Hinblick auf die Fragestellung der Kompatibilität von rtPA und Aflibercept kann davon ausgegangen werden, dass in einer intraoperativen Situation

- (1) Aflibercept nicht durch rtPA jedoch durch Plasmin gespalten wird,
- (2) die anti-angiogene Wirksamkeit von Aflibercept durch rtPA unbeeinträchtigt bleibt und durch Plasmin abnimmt.

Die Ergebnisse der Verdünnungsreihe von Aflibercept im VEGF ELISA ergaben die Konzentration von 200 ng/ml Aflibercept als Grenzwert einer VEGF-inhibitorischen Wirksamkeit. In der anschließenden Ko-Inkubation von 200 ng Aflibercept mit Plasmin konnte nachgewiesen werden, dass Plasmin die VEGF-Inhibition von Aflibercept nahezu

vollständig aufhebt. Ein wesentlicher Einfluss von Plasmin scheint vor allem dann bedeutsam zu sein, wenn Aflibercept in geringen Konzentrationen eingesetzt wird. Therapeutische Konsequenzen könnten durch veränderte pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften von Aflibercept eintreten. So ist denkbar, dass Plasmin durch Spaltung der VEGF-bindenden Domänen des Moleküls, die Affinität von Aflibercept zu VEGF verringert und damit die Dauer der Wirksamkeit des VEGF-Inhibitors herabsetzt. Durch Spaltung des Moleküls könnte es zudem zu einem schnelleren Transport von Aflibercept aus dem Auge und einer weiteren Verkürzung der anti-angiogenen Wirksamkeit kommen. Allerdings ist auch denkbar, dass die Spaltung durch Plasmin Domänen des Moleküls betrifft, die nicht an der VEGF-Bindung beteiligt sind. Abgesehen davon entspricht die intraoperativ subretinal applizierte Menge an Aflibercept einem Vielfachen dessen Versuchsteils. Es ist daher durch unsere in-vitro Experimente nicht eindeutig zu klären, ob die Spaltung von Aflibercept durch Plasmin eine unmittelbare klinische Konsequenz hätte oder ob die intraoperativ eingesetzte Menge von Aflibercept genügen würde, um eine vollständige VEGF-Inhibition zu erzeugen.

Die experimentellen Versuche der vorliegenden Arbeit sind für die chirurgische Therapie von Bedeutung, weil die Substanzen bei subretinaler Injektion mit Proteasen einer submakulären Blutung interagieren könnten. Unserer Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Ranibizumab im Rahmen einer subretinalen Injektion strukturell und funktionell intakt bleibt. Auch wenn wir eine Beeinträchtigung vor allem der Struktur von Aflibercept durch Plasmin nachweisen konnten, ist davon auszugehen, dass auch Aflibercept für die subretinale Injektion im Rahmen einer *pars-plana*-Vitrektomie geeignet ist. Sobald Aflibercept jedoch nicht im Überschuss subretinal verabreicht wird, könnte die Effektivität der VEGF-Inhibition signifikant nachlassen und den Therapieerfolg gefährden.

## 5 Zusammenfassung

Bei der sogenannten feuchten Form der Altersabhängigen Makuladegeneration entsteht eine krankhafte Gefäßneubildung in der Aderhaut. Diese Gefäße neigen zu spontanen Blutungen unter die Netzhaut im Bereich der Stelle des schärfsten Sehens (Makula), führen zu einem plötzlich einsetzenden signifikanten Sehverlust und haben im weiteren Verlauf eine besonders schlechte Prognose. Es gibt derzeit keine etablierte Therapie.

Während das Fibrinolytikum *recombinant tissue plasminogen activator* (rtPA) in der Therapie der feuchten Altersabhängigen Makuladegeneration zur Auflösung bestehender submakulärer Blutungen eingesetzt wird, hemmen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Inhibitoren wie Ranibizumab und Aflibercept das Fortschreiten choroidaler Neovaskularisationen. Ein vielversprechendes chirurgisches Therapiekonzept der submakulären Blutung bei altersabhängiger Makuladegenerationen liegt daher in der kombinierten subretinalen Injektion von rtPA und VEGF-Inhibitoren.

Ziel der Arbeit war es, die Wirksamkeit dieser invasiven Intervention in einem *in-vitro*-Modell durch Simulation zu überprüfen. Es sollte heraus gefunden werden, ob rtPA, rtPA-generiertes Plasmin oder andere, nicht näher bestimmte während der Fibrinolyse aktivierte Proteasen Struktur und/oder Funktion der VEGF-Inhibitoren Aflibercept und Ranibizumab beeinflussen. Die verwendeten Therapeutika wurden in ihren üblichen therapeutischen Mischungsverhältnissen untersucht.

Anhand der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zunächst untersucht, ob Ranibizumab nach Ko-Inkubation mit enzymatisch wirksamem rtPA oder Plasmin gespalten wird. Weder rtPA, noch Plasmin führten zu einer strukturellen Beeinträchtigung von Ranibizumab.

Da durch rtPA fragmentierte Ranibizumab-Moleküle trotz Spaltung weiterhin anti-angiogenetisch wirksam sein könnten, sofern die Spaltung nicht die VEGF-Bindungsstelle betrifft, quantifizierten wir daraufhin die VEGF-Bindung von Ranibizumab nach Ko-Inkubation mit rtPA bzw. Plasmin in Medium aus VEGF-sezerniertem Zellüberstand des Retinalen Pigmentepithels im VEGF *enzyme-linked-immunosorbent-assay* (ELISA). Eine funktionelle Beeinträchtigung von Ranibizumab durch rtPA oder Plasmin konnte

ausgeschlossen werden.

In entsprechenden experimentellen Versuchen zur Kompatibilität von rtPA und Aflibercept ließ sich eine Interaktion dieser Substanzen ebenfalls ausschließen. Nach Ko-Inkubation von Plasmin und Aflibercept zeigten sich in der Gelelektrophorese hingegen Spaltprodukte des Aflibercept-Moleküls. Trotz Beeinträchtigung der strukturellen Integrität von Aflibercept durch Plasmin ließ sich im VEGF ELISA, der anschließenden Untersuchung zur funktionellen Beeinflussung der VEGF-Inhibition durch Plasmin, nur eine geringe Verminderung der VEGF-inhibitorischen Wirksamkeit von Aflibercept ermitteln. Nach Reduzierung von Aflibercept auf gerade noch VEGF-inhibitorisch wirksame Konzentrationen konnte allerdings bei Plasminzugabe eine vollständige Aufhebung der Effektivität des VEGF-Inhibitors nachgewiesen werden.

Zur Simulation der intraoperativen Anwendung der Therapeutika im Rahmen einer submakulären Blutung wurden daraufhin rtPA und VEGF-Inhibitoren in humanem Blut kokubiert und im VEGF ELISA analysiert. Es konnte ausgeschlossen werden, dass Aflibercept und Ranibizumab durch weitere während der Fibrinolyse aktivierte Proteasen funktionell beeinträchtigt werden.

Die Ergebnisse unserer experimentellen Untersuchungen haben eine bedeutsame klinische Relevanz, da gezeigt werden konnte, dass rtPA und Aflibercept sowie rtPA und Ranibizumab in einer gemeinsamen subretinalen Injektion kompatibel sind. Aufgrund der Spaltung und der funktionellen Beeinträchtigung von Aflibercept durch Plasmin ist die anti-angiogenetische Wirksamkeit von Aflibercept in Ko-Applikation mit rtPA bei submakulärer Blutung klinisch möglicherweise eingeschränkt. Solange der VEGF-Inhibitor in ausreichender Konzentration appliziert wird, scheint Aflibercept potent genug zu sein, eine vollständige VEGF-Inhibition zu bewirken. Sobald es jedoch nicht im Überschuss appliziert wird, muss damit gerechnet werden, dass die Wirksamkeit von Aflibercept durch Interaktion mit Plasmin abnimmt und der therapeutische Erfolg gefährdet ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- ♣ Avery, R., Fekrat, S., Hawkins, B., Bressler, N. Natural history of subfoveal hemorrhage in age-related macular degeneration. *Retina* 1996; 16: 183-189.
- ♣ Bhisitkul, R., Winn, B., Lee, O., Wong, J., Pereira Dde, S., Porco, T., He, X., Hahn, P., Dunaief, J. Neuroprotective effect of intravitreal triamcinolone acetonide against photoreceptor apoptosis in a rabbit model of subretinal hemorrhage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49: 4071-4077.
- ♣ Bird, A., Bressler, N., Bressler, S., Chisholm, I., Coscas, G., Davis, M., de Jong, P., Klaver, C., Klein, B., Klein, R. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 1995; 39(5): 367–374.
- ♣ Bressler, N., Bressler, S., Childs, A., Haller, J., Hawkins, B., Lewis, H., MacCumber, M., Marsh, M., Redford, M., Sternberg, P., Thomas, M., Williams, G. Surgery for hemorrhagic choroidal neovascular lesions of age-related macular degeneration. *Ophthalmol.* 2004; 111(11): 1993-2006.
- ♣ CATT Research Group, Martin, D., Maguire, M., Ying, G., Grunwald, J., Fine, S., Jaffe, G. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2011; 364(20): 1897-908.
- ♣ Chen, C., Hooper, C., Chiu, D., Chamberlain, M., Karia, N., Heriot, W. Management of submacular hemorrhage with intravitreal injection of tissue plasminogen activator and expansile gas. *Retina* 2007; 27(3): 321-8.
- ♣ de Jong, P. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006; 355(14): 1474–1485.
- ♣ El Baba, F., Jarrett, W. Massive hemorrhage complicating age-related macular degeneration: Clinicopathologic correlation and role of anticoagulants. *Ophthalmol.* 1986; 93: 1581-1592.
- ♣ Eter, N. Die Altersbedingte Makuladegeneration. UNI-MED Verlag, Bremen, 2009.

- ♣ Feltgen, N. Submacular hemorrhage. *Ophthalmol.* 2012; 109(7): 633-4.
- ♣ Ferrara, N., Damico, L., Shams, N., Lowman, H., Kim, R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age related macular degeneration. *Retina.* 2006; 26: 859–870.
- ♣ Glatt, H., Machemer, R. Experimental subretinal hemorrhage in rabbits. *Am J Ophthalmol.* 1982; 94: 762-773.
- ♣ Green, W., Wilson, D. Choroidal neovascularization. *Ophthalmol.* 1986; 93: 1169–76.
- ♣ Gaudreault, J., Fei, D., Rusit, J., Rusit, J., Suboc, P., Shiu, V. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 726–33.
- ♣ Guthoff, R., Guthoff, T., Meigen, T., Goebel, W. Intravitreal injection of bevacizumab, tissue plasminogen activator, and gas in the treatment of submacular hemorrhage in age-related macular degeneration. *Retina* 2011; 31: 36-40.
- ♣ Handwerker, B., Blodi, B., Chandra, S., Olsen, T., Stevens, T. Treatment of submacular hemorrhage with low-dose intravitreal tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement. *Arch Ophthalmol.* 2001; 119: 28–32.
- ♣ Hauptert, C., McCuen, B., Jaffe, G. Pars plana vitrectomy, subretinal injection of tissue plasminogen activator, and fluid-gas exchange for displacement of thick submacular hemorrhage in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2001; 131: 208–215.
- ♣ Heier, J., Brown, D., Chong, V., Korobelnik, J., Kaiser, P., Nguyen, Q., Kirchhof, B., Ho, A., Ogura, Y., Yancopoulos, G., Stahl, N., Vitti, R., Berliner, A., Soo, Y., Anderesi, M., Groetzbach, G., Sommerauer, B., Sandbrink, R., Simader, C., Schmidt-Erfurth, U., VIEW 1 and VIEW 2 Study Groups. Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2012; 119(12): 2537-48.
- ♣ Hesse, L., Schmidt, J., Kroll, P. Management of acute submacular hemorrhage using recombinant tissue plasminogen activator and gas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1999; 237: 273–277.

- ♣ Hillenkamp, J., Surguch, V., Framme, C., Gabel, V., Sachs, H. Management of submacular hemorrhage with intravitreal versus subretinal injection of recombinant tissue plasminogen activator. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010; 248: 5–11.
- ♣ Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Loffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J., Daly, T., Wiegand, S., Yancopoulos, G., Rudge, J. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99(17): 11393-8.
- ♣ Ip, M., Scott, I., Brown, G., Brown, M., Ho, A., Huang, S., Recchia, F. Anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy for age-related macular degeneration: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmol.* 2008; 115: 1837-1846.
- ♣ Kamei, M., Misono, K., Lewis, H. A study of the ability of tissue plasminogen activator to diffuse into the subretinal space after intravitreal injection in rabbits. *Am J Ophthalmol.* 1999; 128: 739–746.
- ♣ Klein, R., Klein, B., Linton, K. The relation of age-related maculopathy to smoking. *Am J Epidemiol.* 1993; 137: 190–200.
- ♣ Klein, R., Peto, T., Bird, A., Vannewkirk, M. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2004; 137(3): 486–495.
- ♣ Klein, M., Ferris, F., Armstrong, J., Hwang, T., Chew, E., Bressler, S., Chandra, S. Retinal precursors and the development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Ophthalmol.* 2008; 115(6): 1026–1031.
- ♣ Klettner, A., Puls, S., Treumer, F., Roeder, J., Hillenkamp, J. Compatibility of recombinant tissue plasminogen activator and bevacizumab co-applied for neovascular age-related macular degeneration with submacular hemorrhage. *Arch Ophthalmol.* 2012 Jul; 130(7): 875-881.
- ♣ Klettner, A., Recber, M., Roeder, J. Comparison of the efficacy of aflibercept, ranibizumab, and bevacizumab in an RPE/choroid organ culture. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014; [Epub ahead of print].

- ♣ Mars, W., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol.* 1993; 143: 949–958.
- ♣ Meyer, C., Scholl, H., Eter, N., Helb, H., Holz, F. Combined treatment of acute subretinal haemorrhages with intravitreal recombinant tissue plasminogen activator, expansile gas and bevacizumab. *Acta Ophthalmol.* 2008; 86: 490-494.
- ♣ Mordenti, J., Thomsen, K., Licko, V., Berleau, L., Kahn, J., Cuthbertson, R., Duenas, E., Ryan, A., Schofield, C., Berger, T., Meng, Y., Cleland, J. Intraocular pharmacokinetics and safety of a humanized monoclonal antibody in rabbits after intravitreal administration of a solution or a PLGA microsphere formulation. *Toxicol Sci.* 1999; 52(1): 101-6.
- ♣ Olivier, S., Chow, D., Packo, K. Subretinal recombinant tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement of thick submacular hemorrhage in age-related macular degeneration. *Ophthalmol.* 2004; 111: 1201–1208.
- ♣ Ross, J., Brechner, P., Rosenfeld, J., Babish, D., Stuart, D., Caplan, S. Pharmacotherapy for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: An Analysis of the 100% 2008 Medicare Fee-For-Service Part B Claims File. *Am J Ophthalmol.* 2011; 151: 887–95.
- ♣ Rusu, I., Deobhakta, A., Yoon, D., Lee, M., Slakter, J., Klancnik, J., Thompson, D., Freund, K. Intraocular pressure in patients with neovascular age-related macular degeneration switched to Aflibercept injection after previous anti-vascular endothelial growth factor treatments. *Retina.* 2014; [Epub ahead of print].
- ♣ Saito, M., Kano, M., Itagaki, K., Oguchi, Y., Sekiryu, T. Switching to intravitreal aflibercept injection for polypoidal choroidal vasculopathy refractory to ranibizumab. *Retina.* 2014; [Epub ahead of print].
- ♣ Schouten, J., La Heij, E., Webers, C., Lundqvist, I., Hendrikse, F. A systematic review on the effect of bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009; 247: 1-11.
- ♣ Spilsbury, K., Garrett, K., Shen, W., Constable, I., Rakoczy, P. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to

- the development of choroidal neovascularization. *Am J Pathol.* 2000; 157(1): 135-44.
- ♣ Spitzer, M., Ziemssen, F., Bartz-Schmidt, K., Gelisken, F., Szurman, P. Treatment of age-related macular degeneration: focus on ranibizumab. *Clin Ophthalmol.* 2008; 2(1): 1-14.
- ♣ Stefanini, O., Wu, F., Gabhann, F., Popel, A. Increase of plasma VEGF after intravenous administration of bevacizumab is predicted by a pharmacokinetic model. *Cancer Res.* 2010; 70(23): 9886–9894.
- ♣ Su, E., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., Gao, Y., Pietras, K., Mann, K., Yepes, M., Strickland, D., Betsholtz, C., Eriksson, U., Lawrence, D. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med.* 2008; 14: 731–737
- ♣ Toth, C., Mourse, L., Hjemeland, L., Landers, M. Fibrin early retinal damage after experimental subretinal hemorrhage. *Arch Ophthalmol.* 1991; 109: 723-729.
- ♣ Treumer, F., Klatt, C., Roider, J., Hillenkamp, J. Subretinal co-application of recombinant tissue plasminogen activator and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration with submacular hemorrhage. *Br J Ophthalmol.* 2010; 94: 48–53
- ♣ Treumer, F., Roider, J., Hillenkamp, J. Long-term outcome of subretinal co-application of rtPA and bevacizumab followed by repeated intravitreal anti-VEGF injections for neovascular AMD with submacular hemorrhage. *Br J Ophthalmol.* 2012; 96(5): 708–713
- ♣ Vander, J., Federman, J., Greven, C., Slusher, M., Gabel, V. Surgical removal of massive subretinal hemorrhage associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmol.* 1991; 98: 23-27.
- ♣ Vingerling, J., Klaver, C., Hofman, A., de Jong, P. Epidemiology of age-related maculopathy. *Epidemiol Rev.* 1995; 17(2): 347–360
- ♣ Ylä-Herttuala, S., Rissanen, T., Vajanto, I., Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine.

J Am Coll Cardiol. 2007; 49(10): 1015-26.

- ♣ Zarbin, M. Age-related macular degeneration: review of pathogenesis. Eur J Ophthalmol. 1998; 8(4): 199–206
- ♣ Zhang, X., Guo, X., Zhang, S., He, J., Sun, C., Zou, Y., Bi, H., Qu, Y. Comparison of bevacizumab and ranibizumab in age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. Int J Ophthalmol. 2014; 7(2): 355-64.

## **7 Danksagung**

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Roider, dem Direktor der Klinik für Ophthalmologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, der es mir ermöglichte, meine Doktorarbeit in der Augenklinik durchzuführen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Hillenkamp für die interessante Aufgabenstellung der Studie, die vielseitigen Anregungen und die Unterstützung in unseren Gesprächen während meiner Doktorarbeit.

Großer Dank gilt auch meiner Laborleiterin Frau Professorin Klettner, die mich vor allem im methodischen Teil der Doktorarbeit großartig unterstützte und mir darüber hinaus mit hilfreichen Ratschlägen beim Vorankommen meiner Arbeit sehr geholfen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Augenklinik und dabei insbesondere den Mitarbeiterinnen aus dem Labor, die mir bei der Durchführung der experimentellen Versuche halfen.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, Annette und Helmut Grotelüschen, sowie Geeske Genrich, die mich während des Studiums und während der Doktorarbeit uneingeschränkt und liebevoll unterstützten.

## 8 Lebenslauf

*Simon Grotelüsch*

Kontakt: HansasträÙe 5  
24118 Kiel  
E-Mail: simongrotelueschen@web.de  
geboren am: 03.10.1986 in Lübeck

### Ausbildung

- 06/2006 Abitur, Notendurchschnitt: *sehr gut*  
*Freie Waldorfschule Lübeck*
- 10/2007 – 09/2009 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: *gut*  
*Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*  
Studium der Humanmedizin
- 10/2009 – 09/2012 Unterbrechung der humanmedizinischen Ausbildung zur Durchführung  
einer Olympiakampagne im Segelsport – Teilnahme an den  
*Olympischen Spielen 2012 in London*
- 10/2012 – 04/2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: *gut*  
*Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*  
Studium der Humanmedizin
- 06/2013 – 03/2016 Durchführung der Doktorarbeit an der *Klinik für Ophthalmologie,*  
*Universitätsklinikum Kiel*
- 05/2015 Veröffentlichung des Papers zur Doktorarbeit  
*British Journal Of Ophthalmology*
- seit 05/2015 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
*Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*  
Studium der Humanmedizin

### Praxiserfahrung

07/2007 – 10/2007	<i>Lubinus-Clinicum</i> , Kiel Orthopädie, Krankenpflege
02/2013	<i>Praxis Dr. Grotelüschen</i> , Lübeck Dermatologie, Famulatur
03/2014 – 04/2014	<i>Dareda Hospital</i> , Dareda/Tansania Innere Medizin, Famulatur
09/2014	<i>Klinik für Neurologie</i> , Universitätsklinikum Kiel Neurologie, Famulatur
08/2014	<i>Sektion für Stammzell- und Immuntherapie</i> , Universitätsklinikum Kiel Immunologie, Famulatur
09/2014	<i>Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe</i> , Universitätsklinikum Kiel Gynäkologie und Geburtshilfe, Famulatur
05/2015 – 09/2015	<i>Klinik für Innere Medizin</i> , Städtisches Krankenhaus Kiel Praktisches Jahr 1. Tertial
09/2015 – 12/2015	<i>Klinik für Chirurgie</i> , Städtisches Krankenhaus München Praktisches Jahr 2. Tertial
12/2015 – 04/2016	<i>Klinik für Neurologie</i> , Universitätsklinikum Kiel Praktisches Jahr 3. Tertial

### Sportliche Erfolge und Auszeichnungen

2007 – 2012	Stipendium der Stiftung Deutsche Sporthilfe
2008 und 2011	Stipendium für Spitzensportler der CAU Kiel
2005 – 2012	geförderter Kaderathlet des Deutschen Segler-Verbands
2003 – 2012	In der olympischen Einhandjolle <i>Laser</i> : Junioren-Europameister 2005 2. Platz Gesamtweltcup 2011 1. Platz Kieler-Woche 2011 6. Platz Olympische Spiele 2012 (London/Großbritannien)

## 9 Publikationen

Downloaded from <http://bjophthalmol.com/> on March 4, 2015 - Published by [group.bmj.com](http://group.bmj.com)  
 BJO Online First, published on March 4, 2015 as 10.1136/bjophthalmol-2014-306454

Laboratory science

## Compatibility of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) and aflibercept or ranibizumab coapplied for neovascular age-related macular degeneration with submacular haemorrhage

Alexa Klettner, Simon Grotelüschen, Felix Treumer, Johann Roider, Jost Hillenkamp

Department of Ophthalmology,  
 University of Kiel, University  
 Medical Center Schleswig-  
 Holstein, Kiel, Germany

**Correspondence to**  
 Professor Alexa Klettner,  
 Department of Ophthalmology,  
 University of Kiel, University  
 Medical Center Schleswig-  
 Holstein, Arnold-Heller Str. 3,  
 Haus 25, Kiel D-24105,  
 Germany;  
[aklettner@auge.uni-kiel.de](mailto:aklettner@auge.uni-kiel.de)

Received 26 November 2014  
 Revised 6 January 2015  
 Accepted 9 February 2015

### ABSTRACT

**Background/aims** Subretinal coapplication of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) and vascular endothelial growth factor (VEGF)-antagonists is a new treatment option for age-related macular degeneration complicated by submacular haemorrhage. Here, we investigate the compatibility of rtPA and aflibercept or ranibizumab in vitro because intraoperatively, rtPA or rtPA-induced plasmin may cleave aflibercept or ranibizumab.

**Methods** Aflibercept and ranibizumab, respectively, were incubated with rtPA or plasmin, separated in gel electrophoresis and stained with Coomassie or silver. The antiangiogenic activity of the VEGF-antagonists was quantified by VEGF-ELISA after incubation with the supernatant of primary porcine retinal pigment epithelium cell cultures.

**Results** In electrophoresis, ranibizumab displayed no additional fragments when it was coapplied with rtPA or plasmin. Its VEGF-inhibiting efficacy remained unchanged in coapplication with rtPA with or without blood, or plasmin. rtPA did not cleave or functionally compromise aflibercept. When aflibercept was coapplied with plasmin, electrophoresis displayed additional bands in Coomassie (30 kDa, 27 kDa, 19 kDa, 15 kDa) and silver staining (31 kDa, 26 kDa, 21 kDa, 19 kDa, 15 kDa). While at a clinical dosage (800 µg/mL) VEGF was inhibited by aflibercept when coapplied with plasmin, at borderline concentrations (400 ng/mL) VEGF-binding ability of aflibercept was abolished.

**Conclusions** Ranibizumab is not cleaved or functionally compromised by rtPA or plasmin. Aflibercept is cleaved and its VEGF-binding ability is reduced when coapplied with plasmin. In clinical practice, rtPA and ranibizumab can be coapplied as a treatment for neovascular age-related macular degeneration with submacular haemorrhage while the antiangiogenic activity of aflibercept may be compromised when coapplied with rtPA in the presence of plasmin.

### INTRODUCTION

Without treatment, the prognosis of neovascular age-related macular degeneration (AMD) complicated by submacular haemorrhage (SMH) is usually poor because the underlying choroidal neovascularisation (CNV) lesion progresses and the resolution of the haemorrhage is associated with the formation of a macular scar.<sup>1</sup> In addition, damage of retinal tissue by SMH has been attributed to a reduction nutrient supply,<sup>2</sup> shrinkage of outer retinal layers and release of toxic substances.<sup>3–5</sup>

In the past, visual acuity often improved after successful displacement of SMH by recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) and gas but then frequently deteriorated because of progression of the underlying CNV. Since the advent of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) pharmacotherapy, new aspects have been added to the management of neovascular AMD with SMH. Anti-VEGF agents delivered by intravitreal injection are a safe and effective treatment for neovascular AMD for up to 2 years.<sup>6,7</sup> In view of these clinical results, a combined intraocular application of rtPA and anti-VEGF agents could represent a significant improvement of current treatment concepts for AMD with SMH.<sup>8–11</sup>

While the application of rtPA can help to prevent a toxic effect of SMH by effective displacement from the fovea, simultaneous application of anti-VEGF agents could potentially prevent CNV progression.<sup>8–14</sup> We have previously reported promising results of a clinical case series of pars plana vitrectomy with subretinal coapplication of rtPA and bevacizumab followed by intravitreal fluid-gas exchange.<sup>8,9</sup> However, clinicians may choose the approved drugs ranibizumab or aflibercept rather than off-label bevacizumab. In addition, in our case series 20% of eyes with SMH treated with rtPA and bevacizumab bled again.<sup>15</sup> In such a recurrent SMH following initial treatment with rtPA and bevacizumab, clinicians may decide to repeat treatment but to change the anti-VEGF agent. While we have previously shown the compatibility of rtPA and bevacizumab in vitro,<sup>15</sup> it is unclear whether rtPA and ranibizumab or aflibercept are also compatible.

rtPA is a serine protease, cleaving plasminogen into active plasmin which in turn degrades the fibrin matrix constituting blood clots. In addition, other proteins such as hepatocyte growth factor or platelet derived growth factor are also cleaved by rtPA.<sup>16,17</sup> Hence, it is uncertain whether in coapplication either rtPA itself, or rtPA-generated plasmin, or other undetermined proteases activated during fibrinolysis of a subretinal blood clot may cleave and thereby functionally inactivate ranibizumab or aflibercept.

The aim of this study was therefore to investigate the compatibility of rtPA and aflibercept or ranibizumab in an established in vitro model of intraoperative coapplication, assessing potential cleavage as well as functionality.

**To cite:** Klettner A, Grotelüschen S, Treumer F, et al. *Br J Ophthalmol* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/bjophthalmol-2014-306454

## Laboratory science

## MATERIAL AND METHODS

## Cell culture

Retinal pigment epithelium (RPE) cell culture was conducted as previously described.<sup>18</sup> In order to collect supernatant for ELISA, supernatant was collected after 4 h. The supernatant was centrifuged (13 000 rpm, 4°C, 5 min) and kept at -20° until further use.

## Interaction studies

The coapplication of rtPA and aflibercept, rtPA and ranibizumab, plasmin and aflibercept, and plasmin and ranibizumab and, in addition, plasmin and bevacizumab, was tested. In all experiments, aflibercept (Eylea, Bayer, Leverkusen, Germany, 40 mg/mL), ranibizumab (Lucentis, Novartis, Basel, Switzerland, 10 mg/mL) and rtPA (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Germany 0.2 mg/mL), were used. Also, bevacizumab (Avastin, Roche Germany, 2.5 mg/mL) was used.

## Recombinant tissue plasminogen activator

To simulate intraoperative conditions,<sup>8,9</sup> equal volumes of the respective drug and rtPA were used to ensure their usual relative concentrations. We incubated 5 µL (200 µg) aflibercept as well as 5 µL (50 µg) ranibizumab, respectively, with 5 µL rtPA (1 µg) for 2 h at 37°C to a final volume of 10 µL. As controls, aflibercept or ranibizumab were incubated without rtPA, and rtPA was incubated on its own for the same period of time. The mixtures were collected and separated in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

## Plasmin

The interaction of plasmin with the VEGF inhibitors was investigated using plasmin derived from human plasma  $\geq 2$  units/mg protein (Sigma, Munich, Germany). As the clinically relevant concentration of plasmin in SMH treated with VEGF-antagonists and rtPA is uncertain, two concentrations of plasmin were used: 5 µL (200 µg) aflibercept and 5 µL (50 µg) ranibizumab were incubated with 0.2 U or 2 U plasmin for 2 h at 37°C to a final volume of 10 µL. The mixtures were collected and separated in SDS-PAGE. In addition, for direct densitometric comparison of all VEGF inhibitors, including bevacizumab, we compared the effect of plasmin on equal amounts of the VEGF inhibitors (50 µg), incubating them with 2 U plasmin as described above.

## SDS-PAGE

A 1:10 dilution of the samples in SDS-sample buffer (Novagen, Darmstadt, Germany) was separated in gel electrophoresis as described previously.<sup>15</sup> As molecular weight control, Roti-Mark Prestained (Roth, Karlsruhe, Germany) or Precision Plus Protein Kaleidoscope (BioRad, München, Germany) protein standard were used. The pattern of protein bands was investigated in two different staining methods.

## Coomassie staining

Coomassie staining was conducted as previously described.<sup>15</sup>

## Silver staining

Silver staining was conducted using the Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific, Bonn, Germany) as previously described.<sup>15</sup>

## Band detection

All gels were photographed, using a Bio-Image System (ChemoBis, Biostep, Jahnsdorf, Germany) and dried in a

standard procedure, using a 2% glycerine solution and cellophane (Roth, Karlsruhe, Germany). Molecular weight and the density of bands were determined using TotalLab Software (Nonlinear Dynamics, Durham, North Carolina, USA). The range of the molecular weight of the corresponding bands was determined and the mean of this range is represented in the graphs (x-axis), plotted against the mean of the density (y-axis), representing mean and SD.

## Anti-VEGF efficacy of aflibercept and ranibizumab

In order to determine the anti-VEGF efficacy of aflibercept or ranibizumab in the presence of rtPA, plasmin or rtPA and clotted human blood, the ability to inhibit VEGF detection by ELISA was quantified as previously described.<sup>18</sup>

Aflibercept and rtPA as well as ranibizumab and rtPA were incubated as described above. As controls, rtPA (2 µg in 10 µL solution, plus 10 µL NaCl), aflibercept (400 µg in 10 µL solution, plus 10 µL NaCl) and ranibizumab (100 µg in 10 µL solution, plus 10 µL NaCl) were separately incubated for 2 h at 37°C. Aflibercept (400 µg and 200 ng) or ranibizumab (100 µg), respectively, was incubated with 4 U plasmin, to a final volume of 20 µL for 2 h at 37°C. As controls, plasmin (4 U in 10 µL, plus 10 µL NaCl), aflibercept (400 µg in 10 µg, plus 10 µg NaCl) and ranibizumab (100 µg in 10 µg, plus 10 µg NaCl), were separately incubated for 2 h at 37°C. All mixtures were kept on ice until further use.

Intraoperative conditions were simulated to quantify the anti-VEGF efficacy of aflibercept and ranibizumab in the presence of rtPA and human blood. Whole blood was obtained from a healthy volunteer (JH) as previously described.<sup>15</sup> rtPA and aflibercept as well as rtPA and ranibizumab were added at volumes and concentrations used in surgery (rtPA 50 µL/10 µg; aflibercept (50 µL/2 mg) and ranibizumab (50 µL/0.5 mg). The mixture was incubated for 30 min at 37°C, centrifuged at 5600 rpm for 10 min and the supernatant (approximately 500 µL) was collected and kept on ice until further use. As controls, rtPA, aflibercept and ranibizumab were added to the conditioned medium as described above.

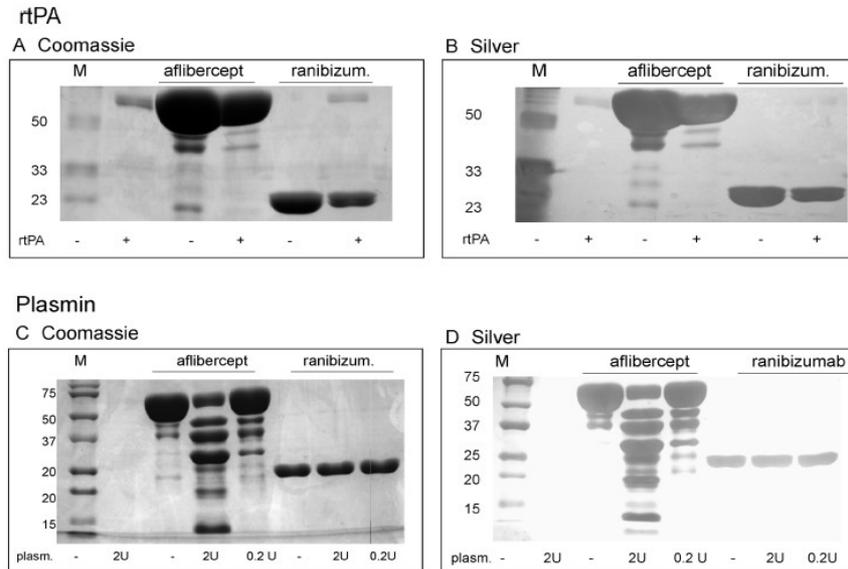
Medium of confluent primary porcine RPE cells, second passage, was collected for 4 h as primary porcine RPE cells have been shown to secrete a significant amount of VEGF.<sup>18</sup> To a volume of 500 µL of conditioned medium, 20 µL of the mixtures described above was added, incubated for 15 min at 37°C and centrifuged at 13 000 rpm for 5 min. The supernatant was collected and a VEGF ELISA (Quantikine, R&D Systems, Wiesbaden, Germany) was performed as previously described.<sup>18</sup>

## RESULTS

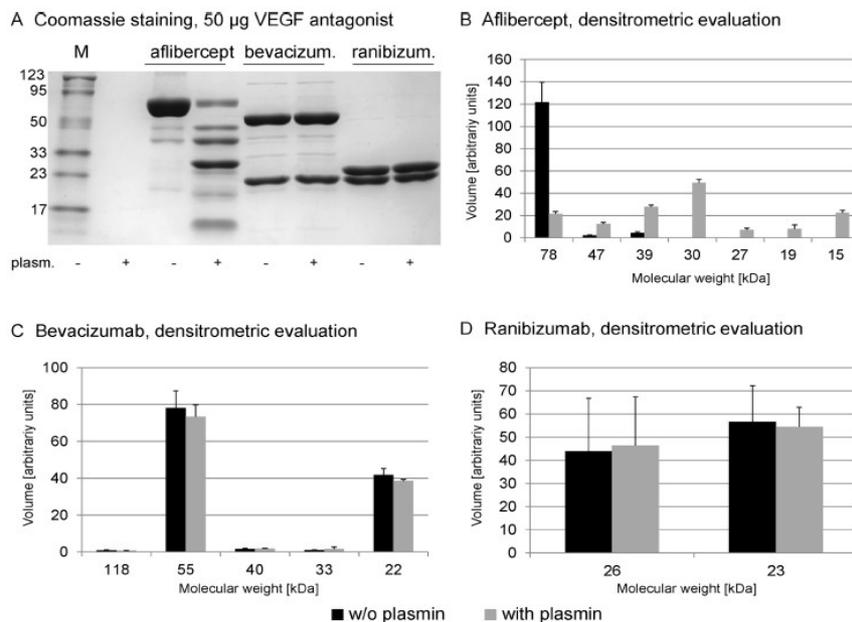
## Interaction studies

## Recombinant tissue plasminogen activator

We investigated the effect of rtPA on the band pattern of aflibercept and ranibizumab when applied in equal volumes, assessed in two different protein stains, and evaluating the molecular weight of the bands. The band pattern of aflibercept and ranibizumab did not change in rtPA coinubation in Coomassie staining (figure 1A). The molecular weight of the bands displayed for aflibercept (56 kDa (main band), 43 kDa, 37 kDa, 31 kDa, 26 kDa, 23 kDa) and ranibizumab (24 kDa) showed no difference between treated or untreated antagonists. The band appearing at 62 kDa in treated ranibizumab corresponds to rtPA. Also, the distribution of the bands did not change. The reduction of the band intensity is due to a dilution effect of the mixture applied to the gel. In silver staining, we also did not find any differences between untreated and rtPA treated aflibercept (68 kDa (main band), 41 kDa, 36 kDa,



**Figure 1** Compatibility of ranibizumab and aflibercept with recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) and plasmin. Equal volumes of aflibercept (200  $\mu$ g) and ranibizumab (50  $\mu$ g) were incubated with equal volumes of rtPA (A and B) or with plasmin (0.2 U and 2 U) (C and D) for 2 h at 37°, separated on 12% SDS-PAGE and stained in Coomassie blue (A and C) or silver (B and D). (A) Incubation with rtPA, stained with Coomassie blue, (B) Incubation with rtPA, stained with silver, (C) Incubation with plasmin, stained with Coomassie blue, (D) Incubation with plasmin, stained with silver. No differences between treated and untreated inhibitors were found for either substance. Representative gels are shown ranibizum., ranibizumab; plasm, plasmin.



**Figure 2** Densitometric evaluation of plasmin-incubated inhibitors, Coomassie blue. 50  $\mu$ g of aflibercept, ranibizumab or bevacizumab were incubated with 2 U plasmin for 2 h at 37°, separated on 12% SDS-PAGE and stained in Coomassie blue. (A) Representative gel. (B) Densitometric evaluation of protein bands found for aflibercept with and without 2 U plasmin. (C) Densitometric evaluation of protein bands found for bevacizumab with and without 2 U plasmin. (D) Densitometric evaluation of protein bands found for ranibizumab with and without 2 U plasmin. Plasmin in either activity had no effect on the protein bands of ranibizumab or bevacizumab. However, the band distribution and intensity changed for aflibercept treated with 2 U plasmin. Bars depict mean density and SD, plotted against molecular weight of the respective band. Ranibizum., ranibizumab; bevacizum., bevacizumab; w/o, without.

Laboratory science

31 kDa, 25 kDa, 20 kDa) or ranibizumab (24 kDa), neither in molecular weight nor in distribution of the bands (figure 1B).

Plasmin

Plasmin is the main product of rtPA activity. We investigated the effect of plasmin on molecular weight and distribution of aflibercept (200 µg) and ranibizumab (50 µg). When applying either 2 U or 0.2 U of plasmin, the band pattern of ranibizumab in Coomassie did not change (25 kDa) (figure 1C). In contrast, the band pattern and distribution changed for aflibercept when incubated with 2 U (untreated 60 kDa (main band), 46 kDa, 30 kDa, 25 kDa; plasmin additional bands: 23 kDa, 20 kDa, 11 kDa) or, to a lesser degree, at 0.2 U plasmin (additional band at 23 kDa) as seen in Coomassie staining (figure 1C). Silver staining confirmed these results, with no change in molecular weight or distribution for ranibizumab (24 kDa) (figure 1D), but changes found in molecular weight and distribution for aflibercept when combined with plasmin (2 U additional bands 21 kDa, 19 kDa, 15 kDa and 13 kDa; 0.2 U additional bands 21 kDa, and 19 kDa) (figure 1D).

In order to allow a direct densitometric comparison of band obtained under plasmin incubation, we repeated the experiments applying 50 µg of the respective VEGF-antagonist and incubated them with 2 U plasmin. To directly compare with aflibercept and ranibizumab, we also included bevacizumab in our study. In this approach, the band pattern of ranibizumab did not change either in Coomassie (figure 2D) or silver staining (figure 3D). Similarly, the pattern of bevacizumab did not change, in either staining (figure 2C and 3C). In contrast, aflibercept displays a clear change of band pattern with additional low

molecular bands and a clear decrease of the signal of the original bands, both shown in Coomassie (figure 2B) and silver staining (figure 3B).

Anti-VEGF efficacy of aflibercept and ranibizumab

We have investigated the efficacy of the respective VEGF-antagonist assessing the ability to inhibit VEGF detection in RPE supernatant in ELISA. As expected, aflibercept (400 µg in 500 µL supernatant) and ranibizumab (100 µg in 500 µL supernatant) virtually completely inhibited VEGF detection at the given concentrations (figure 4).<sup>19</sup> When coincubated with rtPA (2 µg), both antagonists still completely inhibited VEGF detection (figure 4A). We also investigated the ability of ranibizumab and aflibercept, respectively, to inhibit VEGF when coincubated with rtPA and blood in volumes and concentrations used in surgery with 10 µg rtPA, 2 mg aflibercept and 0.5 mg ranibizumab, and found no reduction of efficacy (figure 4C).<sup>8 9</sup>

When incubated with 2 U plasmin, ranibizumab (100 µg in 500 µL supernatant) still completely inhibited VEGF detection. Despite of its cleavage, aflibercept (400 µg in 500 µL supernatant) completely inhibited VEGF when coincubated with plasmin (figure 4B). However, when using lower concentrations of aflibercept (200 ng in 500 µL supernatant) at borderline efficacy,<sup>19</sup> the incubation with plasmin completely abolished the efficacy of aflibercept to inhibit VEGF (figure 4D).

DISCUSSION

The treatment of neovascular AMD with SMH with a combined application of rtPA and anti-VEGF is a promising novel therapeutic approach which is currently introduced into clinical

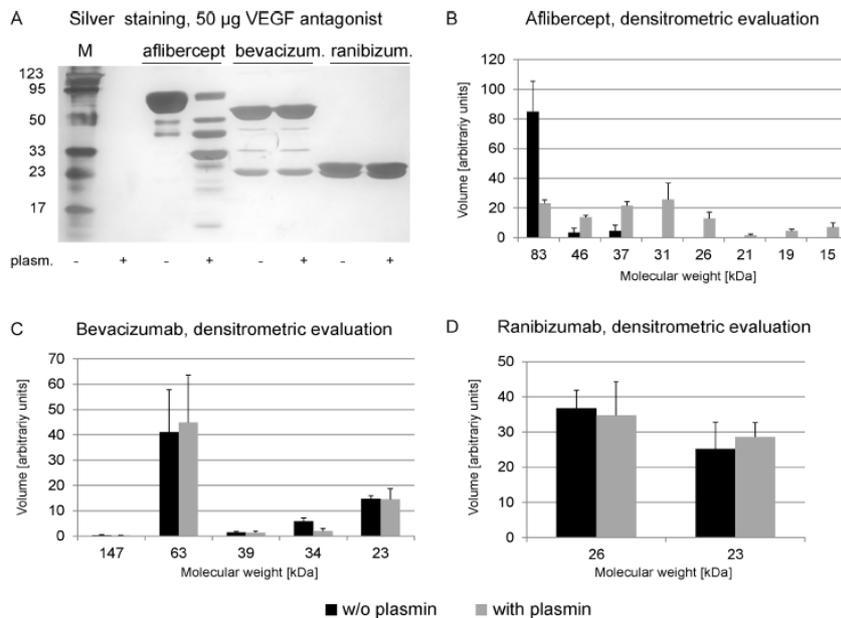
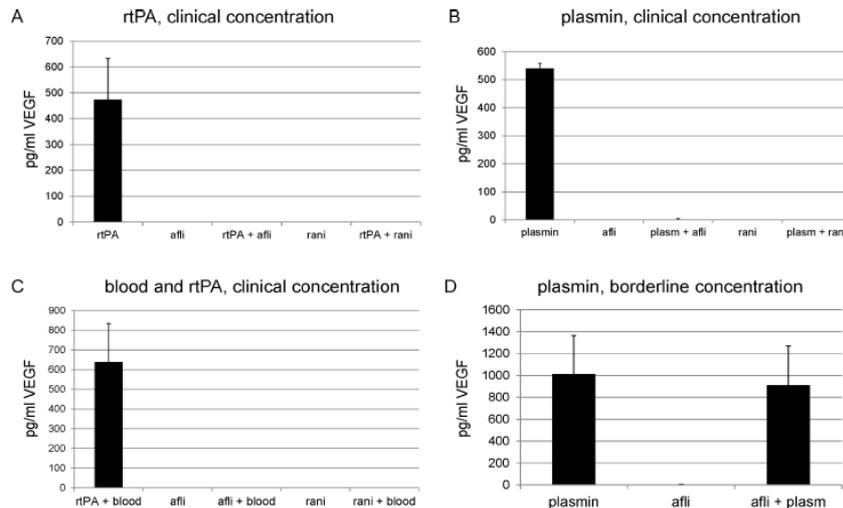


Figure 3 Densitometric evaluation of plasmin-incubated inhibitors, silver staining. 50 µg of aflibercept, ranibizumab or bevacizumab were incubated with 2 U plasmin for 2 h at 37°, separated on 12% SDS-PAGE and stained in silver staining. (A) Representative gel. (B) Densitometric evaluation of protein bands found for aflibercept with and without 2 U plasmin. (C) Densitometric evaluation of protein bands found for bevacizumab with and without 2 U plasmin. (D) Densitometric evaluation of protein bands found for ranibizumab with and without 2 U plasmin. Plasmin in either activity had no effect on the protein bands of ranibizumab or bevacizumab. However, the band distribution and intensity changed for aflibercept treated with 2 U plasmin. Bars depict mean density and SD, plotted against molecular weight of the respective band. Ranibizum., ranibizumab, bevacizum., bevacizumab, w/o, without.



**Figure 4** Antivasular endothelial growth factor (anti-VEGF) efficacy of aflibercept and ranibizumab. Anti-VEGF efficacy was investigated in ELISA. (A) Aflibercept (400  $\mu$ g) and ranibizumab (100  $\mu$ g) in equal volume were incubated with recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) (2  $\mu$ g) for 2 h at 37° and the mixture was added to retinal pigment epithelium (RPE) cell culture supernatant. As control, aflibercept and ranibizumab, respectively, were incubated without rtPA and applied to RPE supernatant, both inhibitors, with or without rtPA, completely abolished VEGF detection. (B) Aflibercept (400  $\mu$ g) and ranibizumab (100  $\mu$ g) in equal volume were incubated with plasmin (4 U) for 2 h at 37° and the mixture was added to RPE cell culture supernatant. As control, aflibercept and ranibizumab, respectively, were incubated without plasmin and applied to RPE supernatant. Both inhibitors, with or without rtPA, completely abolished VEGF detection. (C) A human blood clot was incubated with 10  $\mu$ g rtPA and 2 mg aflibercept or 0.5 mg ranibizumab for 30 min. The supernatant was collected and added to RPE medium. Both inhibitors, with or without incubation with blood and rtPA, completely abolished VEGF detection. (D) Aflibercept at a concentration at the border of its efficacy (200 ng) was incubated with plasmin as described above. At this concentration, after incubation with plasmin, aflibercept did not inhibit VEGF detection any longer. afl, aflibercept, plasm, plasmin, rani, ranibizumab.

practice. Here, we investigated the suitability of ranibizumab and aflibercept for subretinal coapplication with rtPA in patients.

We simulated the surgical situation in an established *in vitro* model.<sup>15</sup> Accordingly, in order to cover the range of likely mixing ratios, we have used in our experiments equal volumes of the respective inhibitor and rtPA, and two different activities of plasmin. In order to exclude different concentrations of the respective VEGF inhibitor as a possible cause of significant cleavage when incubated together with plasmin and to allow a reliable densitometric evaluation of the electrophoresis bands, we repeated the experiments with plasmin with equal concentrations of the VEGF inhibitors. To directly compare these results with the previously published data on bevacizumab,<sup>15</sup> we included bevacizumab in this experiment (figures 2 and 3).

The present findings clearly indicate that ranibizumab is not compromised when coapplied with rtPA, or with plasmin, which is the main product of enzymatic rtPA activity. As seen with both staining agents, the electrophoresis band patterns clearly show no additional bands when ranibizumab is coincubated with either rtPA or plasmin, hence ranibizumab remains structurally intact (figures 1–3). Neither of the substances cleaves ranibizumab. Moreover, the ELISA experiments clearly show that neither rtPA, plasmin nor proteases activated during fibrinolysis of a blood clot functionally inactivate ranibizumab, indicating that the antiangiogenic efficacy of ranibizumab remains intact in the presence of rtPA with or without human blood or in the presence of plasmin.

By contrast, while aflibercept remained structurally intact when coincubated with rtPA, both stains clearly showed that aflibercept is cleaved by plasmin (figures 2 and 3). Furthermore,

when aflibercept was not applied in excess amounts but in concentration at the borderline of its efficacy,<sup>19</sup> its ability to inhibit VEGF was clearly reduced by plasmin, indicating reduced antiangiogenic efficacy (figure 4).

The densitometric evaluation of bevacizumab when coapplied with plasmin confirmed our previously published data, showing that bevacizumab is not compromised by plasmin.<sup>15</sup>

The present findings may be clinically relevant because our *in vitro* experiments suggest that aflibercept, in contrast with ranibizumab or bevacizumab may be partially inactivated by plasmin when coapplied with rtPA in the subretinal space. However, the question remains whether these results indicate an impaired performance of aflibercept when clinically used in combination with rtPA. While the cleavage is obvious, the effect on VEGF inhibition is only seen when aflibercept is present at borderline concentrations. Hence, even though plasmin may cleave aflibercept, VEGF inhibition is likely to still occur. However, following intraocular application, VEGF antagonists are cleared from the eye with an approximate half-life of 3–9 days,<sup>20</sup> and so the cleavage of aflibercept may reduce the time frame in which it can exert its antiangiogenic function.

In conclusion, we demonstrate the absence of cleavage of ranibizumab by rtPA or plasmin and the absence of a functional inactivation of ranibizumab by rtPA with or without whole blood or by plasmin. In clinical practice, rtPA and ranibizumab can be coapplied to simultaneously clear SMH and reduce choroidal new vessel activity. Furthermore, we demonstrate that plasmin but not rtPA cleaves aflibercept. The anti-VEGF efficacy of aflibercept may be compromised when not present in excess amounts.

## Laboratory science

**Contributors** AK, SG, FT, JR, JH: study design, data interpretation, manuscript review and approval; AK, SG: data acquisition; AK, JH: manuscript preparation.

**Competing interests** Independent of this study, AK has been a consultant for and received research grants and lecture fees from Novartis Pharma. Independent of this study, JH has received lecture fees and travel grants from Novartis Pharma.

**Ethics approval** Porcine eyes were obtained with permission from the local abattoir, where the animals are killed for the purpose of food production and the eyes are regularly removed from the slaughtered animals due to legal regulations (Tier-LMHV (Anlage 5 zu §7 Satz 2, Kapitel III, Nr. 2.4)). The usage of the eyes for experimental purposes was conducted in agreement with the animal welfare officer of the University of Kiel.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

- Avery RL, Fekrat S, Hawkins BS, *et al.* Natural history of subfoveal hemorrhage in age-related macular degeneration. *Retina* 1996;16:183–9.
- Glatt H, Machemer R. Experimental subretinal hemorrhage in rabbits. *Am J Ophthalmol* 1982;94:762–73.
- Toth CA, Mourse LS, Hjemeland LM, *et al.* Fibrin early retinal damage after experimental subretinal hemorrhage. *Arch Ophthalmol* 1991;109:723–9.
- Bhisitkul RB, Winn BJ, Lee OT, *et al.* Neuroprotective effect of intravitreal triamcinolone acetonide against photoreceptor apoptosis in a rabbit model of subretinal hemorrhage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4071–7.
- El Baba F, Jarrett WH. Massive hemorrhage complicating age-related macular degeneration: Clinicopathologic correlation and role of anticoagulants. *Ophthalmology* 1986;93:1581–92.
- Ip MS, Scott IU, Brown GC, *et al.* Anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy for age-related macular degeneration: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2008;115:1837–46.
- Schouten JS, La Heij EC, Webers CA, *et al.* A systematic review on the effect of bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247:1–11.
- Treumer F, Klatt C, Roeder J, *et al.* Subretinal co-application of recombinant tissue plasminogen activator and Bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration with submacular hemorrhage. *Br J Ophthalmol* 2010;94:48–53.
- Treumer F, Roeder J, Hillenkamp J. Long-term outcome of subretinal co-application of rtPA and bevacizumab followed by repeated intravitreal anti-VEGF injections for neovascular AMD with submacular hemorrhage. *Br J Ophthalmol* 2012;96:708–13.
- Meyer CH, Scholl HP, Eter N, *et al.* Combined treatment of acute subretinal haemorrhages with intravitreal recombinant tissue plasminogen activator, expansile gas and bevacizumab: a retrospective pilot study. *Acta Ophthalmol* 2008;86:490–4.
- Guthoff R, Guthoff T, Meigen T, *et al.* Intravitreal injection of bevacizumab, tissue plasminogen activator, and gas in the treatment of submacular hemorrhage in age-related macular degeneration. *Retina* 2011;31:36–40.
- Haupt CL, McCuen BW II, Jaffe GJ. Pars plana vitrectomy, subretinal injection of tissue plasminogen activator, and fluid-gas exchange for displacement of thick submacular hemorrhage in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2001;131:208–15.
- Olivier S, Chow DR, Packo KH. Subretinal recombinant tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement of thick submacular hemorrhage in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2004;111:1201–8.
- Hillenkamp J, Surguch V, Framme C, *et al.* Management of submacular hemorrhage with intravitreal versus subretinal injection of recombinant tissue plasminogen activator. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248:5–11.
- Klettner A, Puls S, Treumer F, *et al.* Compatibility of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) and bevacizumab co-applied for neovascular age-related macular degeneration with submacular hemorrhage. *Arch Ophthalmol* 2012;130:875–81.
- Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 1993;143:949–858.
- Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, *et al.* Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med* 2008;14:731–7.
- Klettner A, Roeder J. Comparison of bevacizumab ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4523–7.
- Klettner A, Recker M, Roeder J. Comparison of the efficacy of aflibercept, ranibizumab and bevacizumab in RPE/choroid organ culture. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014;252:1593–8.
- Klettner A. VEGF-A and its inhibitors in age-related macular degeneration—pharmacokinetic differences and their retinal and systemic implications. *J Biochem Pharmacol Res* 2014;2:8–20.