

**Morbus Hunter -  
Neutralisationskapazität von Antikörpern unter  
Enzymersatztherapie und deren klinischen Auswirkungen**

---

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Klinische Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

---

Marina Bayer  
geboren in Frankfurt am Main

Mainz, September 2014

---

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2014

Für meine Eltern

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Einteilung und Pathophysiologie der Mukopolysaccharidosen	1
1.2 Mukopolysaccharidose Typ II - Morbus Hunter	3
1.3 Organmanifestationen	15
1.3.1 Äußeres Erscheinungsbild und muskuloskelettales System	16
1.3.2 Augen	18
1.3.3 Hals, Nasen, Ohren	18
1.3.4 Abdomen	19
1.3.5 Lunge und Atemwege	19
1.3.6 Haut	20
1.3.7 Nervensystem	20
1.3.8 Herz	21
1.4 Therapie	22
1.4.1 Symptomatische Therapie	22
1.4.2 Enzymersatztherapie	24
1.5 Antikörper mit Neutralisationskapazität unter Enzymersatztherapie	26
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>32</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>34</b>
3.1 Studienprotokoll und Materialien	34
3.1.1 Studiendesign und Patienten	34
3.1.2 Entnahme der Blutproben und Aufbereitung	36
3.1.3 Materialien	36
3.1.4 Reagenzienherstellung	41
3.2 Bestimmung der Iduronat-2-sulfatase (IDS)-Aktivität im Serum von Morbus Hunter-Patienten	43
3.2.1 Bestimmung der IDS-Aktivität im Mischserum von Morbus Hunter-Patienten (Neutralisationskapazität)	47
3.2.2 Validierung der Neutralisationskapazitätsbestimmung und der Einfluss der Verdünnungslösung	48
3.3 Bestimmung von Anti-Elapraxe <sup>®</sup> -Immunglobulin G und E bei Morbus Hunter-Patienten	57

3.3.1	Methode der Immunglobulin-Bestimmung	57
3.4	Bestimmung biochemischer und klinischer Parameter bei Morbus Hunter-Patienten	58
3.4.1	Glykosaminoglykan-Ausscheidung (DMB-Test)	58
3.4.2	Kardiologische Parameter	60
3.4.3	Lungenfunktionsmessungen	63
3.4.4	Messung der Gelenkbeweglichkeit	64
3.4.5	Messung der Gehstrecke	65
3.4.6	Immunantwort auf die Enzyersatztherapie	66
3.4.7	Validierter Fragebogen des Hunter Outcome Survey (HS-FOCUS)	67
3.5	Bestimmung der Neuronenspezifischen Enolase und S-100 bei Morbus Hunter-Patienten	68
3.6	Statistik und Auswertung	69
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>71</b>
4.1	Studienprotokoll	71
4.1.1	Demographische Daten und Merkmale des Patientenkollektivs	71
4.2	Bestimmung der Iduronatsulfatase (IDS)-Aktivität im Serum von Morbus Hunter-Patienten	71
4.2.1	Neutralisationskapazität im Mischserum	72
4.2.2	Validierung der Neutralisationskapazitätsbestimmung und der Einfluss der Verdünnungslösung	79
4.3	Ergebnisse der Anti-Elaprase <sup>®</sup> -Immunglobulin G und E Bestimmungen bei Morbus Hunter-Patienten	88
4.4	Ergebnisse und Korrelation der biochemischen und klinischen Parameter mit Antikörperbestimmungen	93
4.4.1	Glykosaminoglykan-Ausscheidung (DMB-Test)	93
4.4.2	Kardiologische Beteiligung	97
4.4.3	Respiratorische Beteiligung	110
4.4.4	Ergebnisse der Gelenkbeweglichkeit	115
4.4.5	Ergebnisse der Gehstrecke	118
4.4.6	Immunantwort auf die Enzyersatztherapie	121
4.4.7	Validierter Fragebogen der Hunter Outcome Survey (HS-FOCUS)	122
4.5	Korrelation des Phänotyps der Morbus Hunter-Patienten mit den Ergebnissen der Neuronenspezifischen Enolase und S-100	126
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>131</b>
5.1	Studienprotokoll	131

5.1.1	Patientenkollektiv _____	131
5.2	Bestimmung der Iduronat-2-sulfatase (IDS)-Aktivität im Serum von Morbus Hunter-Patienten _____	132
5.2.1	Neutralisationskapazität im Mischserum _____	134
5.2.2	Validierung der Neutralisationskapazitätsbestimmung und der Einfluss der Verdünnungslösung _____	138
5.3	Anti-Elaprase®-Immunglobulin G und E bei Morbus Hunter-Patienten _____	145
5.4	Korrelation der biochemischen und klinischen Parameter mit den Antikörperbestimmungen _____	146
5.4.1	Glykosaminoglykan-Ausscheidung (DMB-Test) _____	146
5.4.2	Kardiologische Beteiligung _____	147
5.4.3	Respiratorische Beteiligung _____	150
5.4.4	Ergebnisse der Gelenkbeweglichkeit _____	152
5.4.5	Ergebnisse der Gehstrecke _____	153
5.4.6	Immunantwort auf die Enzyersatztherapie _____	154
5.4.7	Validierter Fragebogen der Hunter Outcome Survey (HS-FOCUS) _____	154
5.5	Korrelation des Phänotyps der Morbus Hunter-Patienten mit den Ergebnissen der Neuronenspezifischen Enolase und S-100 ____	155
5.6	Schlussfolgerung _____	157
5.7	Ausblick _____	158
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung _____</b>	<b>159</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis _____</b>	<b>161</b>
<b>Anhang</b>	<b>_____</b>	<b>181</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schrittweiser Abbau von Heparansulfat mit den zugehörigen Mukopolysaccharidosen (modifiziert nach Neufeld et al. (1))	4
Abbildung 2: Stammbaum einer Familie mit Morbus Hunter, beschrieben von Beebe und Formel 1954 (aus Kircher et al. (6))	5
Abbildung 3: Flussdiagramm zur Diagnosestellung für Morbus Hunter gemäß den europäischen Empfehlungen (aus Scarpa et al. (80))	14
Abbildung 4: Typische vergrößerte Gesichtszüge eines Morbus Hunter-Patienten	16
Abbildung 5: Dystosis multiplex bei einem Morbus Hunter-Patient	17
Abbildung 6: Elaprase <sup>®</sup> -Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung	24
Abbildung 7: Enzymaktivitätsmessung von Iduronat-2-sulfatase nach Voznyi et al. (79)	43
Abbildung 8: Einteilung unterschiedlicher Geometrien des linken Ventrikels aufgrund von relativer Wanddicke und auf die Körperlänge indizierte linksventrikuläre Muskelmasse; adaptiert nach de Simone (177)	61
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im 1:1 Mischserum eines Gesunden und einer Verdünnungsreihe des Serums von Patient Nr. 26 (10% bis 100%, Verdünnungslösung Aqua ad iniectabilia)	81
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im 1:1 Mischserum eines Gesunden und einer Verdünnungsreihe des Serums von Patient Nr. 23 (10% bis 100%, Verdünnungslösung Aqua ad iniectabilia)	83
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung der Verdünnungsreihe von Serum eines Gesunden (10% bis 100%, Verdünnungslösung Aqua ad iniectabilia (*n=3, ^n=2))	84
Abbildung 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung von ausgewählten Elaprase <sup>®</sup> -Verdünnungen mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung (*n=3, ^n=2)	85
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung von ausgewählten Elaprase <sup>®</sup> -Verdünnungen mit Dulbecco Puffer und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösungen (*n=3)	86
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IDS-Enzymaktivität der 1:10.000 Verdünnung von Elaprase <sup>®</sup> mit vier verschiedenen Verdünnungslösungen (*n=3)	87

Abbildung 15: Patientenindividuelle Darstellung der Anti-Elaprase <sup>®</sup> - Immunglobulin G-Titer im Zeitverlauf nach Beginn der ERT _____	89
Abbildung 16: Patientenindividuelle Darstellung der GAG-Ausscheidung im Urin im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneten altersabhängigen oberen Normwerten _____	95
Abbildung 17: Box Plot-Darstellung der GAG-Ausscheidung im Urin in Abhängigkeit von der Zeit seit Beginn der ERT für die Follow- up Zeitpunkte _____	97
Abbildung 18: Patientenindividuelle Darstellung der LVM_H im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichnetem Normwert _____	99
Abbildung 19: Patientenindividuelle Darstellung der RWT im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichnetem Normwert _____	100
Abbildung 20: Box Plot-Darstellung der LVM_H in Abhängigkeit von der Zeit seit Beginn der ERT für die Follow-up Zeitpunkte _____	102
Abbildung 21: Box Plot-Darstellung der RWT in Abhängigkeit von der Zeit seit Beginn der ERT für die Follow-up Zeitpunkte _____	102
Abbildung 22: Patientenindividuelle Darstellung der Schweregrade der Aortenklappeninsuffizienz im Zeitverlauf nach Beginn der ERT _____	104
Abbildung 23: Patientenindividuelle Darstellung der Schweregrade der Mitralklappeninsuffizienz im Zeitverlauf nach Beginn der ERT ____	105
Abbildung 24: Patientenindividuelle Darstellung der mittleren Druckgradienten über der Aortenklappe im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneter Einteilung für die Schweregrade der Aortenstenose entsprechend dem mittleren Druckgradienten über der jeweiligen Klappe [mmHg] _____	108
Abbildung 25: Patientenindividuelle Darstellung der mittleren Druckgradienten über der Mitralklappe im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneter Einteilung für die Schweregrade der Mitralklappenstenose entsprechend dem mittleren Druckgradienten über der jeweiligen Klappe [mmHg] _____	109
Abbildung 26: Patientenindividuelle Darstellung der FVC in Prozent vom Soll im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneter Einteilung für die Schweregrade der Einschränkung _____	112
Abbildung 27: Patientenindividuelle Darstellung der FEV <sub>1</sub> in Prozent vom Soll im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneter Einteilung für die Schweregrade der Einschränkung _____	113
Abbildung 28: Patientenindividuelle Darstellung der rechten Schulterflexion im Zeitverlauf nach Beginn der ERT _____	116
Abbildung 29: Patientenindividuelle Darstellung der linken Schulterflexion im Zeitverlauf nach Beginn der ERT _____	117
Abbildung 30: Patientenindividuelle Darstellung der gelaufenen Strecke im 6MGT im Zeitverlauf nach Beginn der ERT _____	119



Abbildung 31: Patientenindividuelle Darstellung der Antworten auf die Frage: „Sind Sie/ Ist Ihr Kind in der Lage eine Münze mit Daumen und Zeigefinger von einem Tisch zu nehmen?“ im Zeitverlauf nach Beginn der ERT _____	123
Abbildung 32: Patientenindividuelle Darstellung der Antworten auf die Frage: „Sind Sie/ Ist Ihr Kind in der Lage die Hände ganz zu öffnen?“ im Zeitverlauf nach Beginn der ERT _____	124
Abbildung 33: Patientenindividuelle Darstellung der NSE im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneten altersabhängigen oberen Normwerten _____	127
Abbildung 34: Patientenindividuelle Darstellung der S-100 im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneten altersabhängigen oberen Normwerten _____	128
Abbildung 35: Lineare Regressionsgerade der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung und 40% bis 100% Serum eines Gesunden (*n=3) _____	141
Abbildung 36: Lineare Regressionsgrade der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung der Elaprase <sup>®</sup> -Verdünnungen 1:15:000 bis 1:90:000 mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung (*n=3, ^n=2) _____	143

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Mukopolysaccharidosen (aus Neufeld et al. (1))	2
Tabelle 2: Länderspezifische Inzidenz von Morbus Hunter pro 100.000 Geburten	7
Tabelle 3: Überblick über die biochemischen und klinischen Parameter mit den optimalen Zeitabständen zwischen den Untersuchungen	35
Tabelle 4: Verdünnungsreihe mit Serum von Patient Nr. 26 und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung	48
Tabelle 5: Verdünnungsreihe mit Serum von Patient Nr. 23 und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung	50
Tabelle 6: Verdünnungsreihe mit Serum eines Gesunden und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung	51
Tabelle 7: Verdünnungsreihe mit Elaprased <sup>®</sup> und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung	52
Tabelle 8: Verdünnungsreihe mit Elaprased <sup>®</sup> und Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung	53
Tabelle 9: Verdünnungsreihe mit Elaprased <sup>®</sup> und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung	54
Tabelle 10: Verdünnungsreihe mit Elaprased <sup>®</sup> und Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung	55
Tabelle 11: Verdünnungsreihe mit Elaprased <sup>®</sup> und isotoner Kochsalz-Lösung 0,9% als Verdünnungslösung	55
Tabelle 12: Verdünnungsreihe mit Elaprased <sup>®</sup> und isotoner Kochsalz-Lösung 0,9% und Zusatz von 0,2% Humanalbumin als Verdünnungslösung	56
Tabelle 13: Altersabhängige obere Normwerte der GAG-Ausscheidung	59
Tabelle 14: Einteilung der Schweregrade der Aorten- bzw. Mitralstenose entsprechend dem mittleren Druckgradienten über der jeweiligen Klappe [mmHg]	63
Tabelle 15: Ergebnisse der Patienten mit IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum mit Neutralisationskapazität (mindestens einmalig $\geq$ 40% verminderte IDS-Aktivität; Neutralisationskapazität $\geq$ 40%)	73
Tabelle 16: Ergebnisse der Patienten mit IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum ohne Neutralisationskapazität (< 40% verminderte IDS-Aktivität; Neutralisationskapazität < 40%)	74
Tabelle 17: Zeitabstände zwischen dem Beginn der ERT und erstmals aufgetretener reduzierter IDS-Aktivität im Mischserum für die betroffenen Patienten	78
Tabelle 18: Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum unter Verwendung der Verdünnungsreihe des Serums von Patient Nr. 26	80

Tabelle 19: Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum unter Verwendung der Verdünnungsreihe des Serums von Patient Nr. 23	82
Tabelle 20: Ergebnisse der Anti-Elaprase®-IgG-Bestimmung für Patienten mit mindestens einmalig positiven Resultaten für neutralisierende Antikörper	90
Tabelle 21: Antikörperstatus und die Beziehung zwischen dem Auftreten von Anti-Elaprase®-IgG und neutralisierenden Antikörpern in Anzahl der Patienten	93
Tabelle 22: Veränderungen der GAG-Ausscheidungen im Urin unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten	96
Tabelle 23: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der LVM_H und der RWT	98
Tabelle 24: Veränderungen der LVM_H und RWT unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten	101
Tabelle 25: Veränderungen der MI bzw. AI unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten	106
Tabelle 26: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der mittleren Druckgradienten über der Aorten- bzw. Mitralklappe	107
Tabelle 27: Veränderungen der MS bzw. AS unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten	110
Tabelle 28: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der FVC und FEV <sub>1</sub> jeweils in Prozent vom Soll	111
Tabelle 29: Veränderungen der respiratorischen Einschränkungen bezogen auf FVC und FEV <sub>1</sub> (jeweils in Prozent vom Soll) unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten	114
Tabelle 30: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der rechten und linken Schulterflexion	115
Tabelle 31: Veränderungen der Schulterflexion unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten	118
Tabelle 32: Veränderungen der Gehstrecke im 6MGT unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten	120
Tabelle 33: Patientenindividuelle Übersicht über die Ausprägung der neurologischen Beteiligung, dem Auftreten von infusionsbedingten Reaktionen und persistierenden neutralisierenden Antikörpern	121
Tabelle 34: Veränderungen der Handfunktion unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten beantworteten Fragebogen HS-FOCUS des jeweiligen Patienten	125
Tabelle 35: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der NSE und S-100	126

Tabelle 36: Patientenindividuelle Übersicht über die Ausprägung der neurologischen Beteiligung und dem Auftreten der NSE und S-100 oberhalb der Normwerte _____	129
Tabelle 37: Übersicht der Veränderungen der klinischen und biochemischen Parameter der beiden PNAK+ Patienten im Verlauf der ERT _____	157
Tabelle 38: Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum ____	219

## Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MU- $\alpha$ -Idu-2S	4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -Iduronat-2-Sulfat
6MGT	6-Minuten-Gehtest
AI	Aortenklappeninsuffizienz
AK+	Antikörper positiv
AS	Aortenstenose
ATS	American Thoracic Society
CHAQ	Childhood Health Assessment Questionnaire
CSA	Confirmation-specific assay
DMB	1,9-Dimethylmethylenblau
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERNDIM	<u>E</u> uropean <u>R</u> esearch <u>N</u> etwork for evaluation and improvement of screening, <u>D</u> iagnosis and treatment of <u>I</u> nherited disorders of <u>M</u> etabolism
ERS	European Respiratory Society
ERT	Enzymersatztherapie
FEV <sub>1</sub>	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GAG	Glykosaminoglykan
IDS	Iduronat-2-sulfatase
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KG	Körpergewicht
KL	Körperlänge
LEBT	Lysosomal Enzymes purified from Bovine Testis
LLOQ	Lower limit of quantification
LVM_H	Auf die Körperlänge indizierte linksventrikuläre Muskelmasse
MI	Mitralklappeninsuffizienz
MPS	Mukopolysaccharidose
MS	Mitralstenose
NAK+	Neutralisierende Antikörper positiv
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PAK+	Persistierend Antikörper positiv
PNAK+	Persistierend neutralisierende Antikörper positiv

RIP	Radioimmunpräzipitation
ROM	Range of motion
SD	Standardabweichungen
ULOQ	Upper limit of quantification
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Einteilung und Pathophysiologie der Mukopolysaccharidosen

Mukopolysaccharidosen (MPS) sind seltene, chronische und progrediente, lysosomale Speicherkrankheiten. Ursache der Erkrankungen sind genetische Defekte, die meist autosomal-rezessiv vererbt werden. Aufgrund dieses Gendefektes kommt es zu einem Aktivitätsverlust, Mangel oder Fehlen von lysosomalen sauren Hydrolasen, die den Abbau von Glykosaminoglykanen (GAG, Mukopolysaccharide) katalysieren. Je nach Enzymdefekt akkumulieren nicht abbaubare Substrate, wie z.B. Dermatan-, Heparan-, Keratan- oder Chondroitinsulfat, in den Lysosomen und führen zu multiplen Störungen in den unterschiedlichen Organsystemen. Je nach Gendefekt reichern sich die unterschiedlichen GAG im Organismus an und führen zu den jeweiligen klinischen Ausprägungen der Erkrankung. Bisher sind elf unterschiedliche Enzymdefekte bekannt, welche sich den sieben Mukopolysaccharidosen zuordnen lassen. Diese sind mit Eponym in Tabelle 1 aufgelistet (1).

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, gibt es einige MPS-Formen denen das gleiche akkumulierende GAG zugrunde liegt, was jedoch aus unterschiedlichen Enzymdefekten resultiert. Die klinische Manifestation zeigt sich in den unterschiedlichsten Organen, wie z.B. im ZNS, Haut, Augen, im muskuloskelettalen, kardiovaskulären und respiratorischen System (1). Einige MPS-Formen bringen eine mentale Retardierung aufgrund der ZNS-Beteiligung mit sich (1).

Tabelle 1: Einteilung der Mukopolysaccharidosen (aus Neufeld et al. (1))

MPS-Typ	Eponym	Enzymdefizit	Akkumulieren- des GAG
MPS IH	Hurler	$\alpha$ -L-Iduronidase	Dermatan-, Heparansulfat
MPS IS	Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidase	Dermatan-, Heparansulfat
MPS IH/S	Hurler-Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidase	Dermatan-, Heparansulfat
MPS II (neuropathisch)	Hunter (schwer)	Iduronat-2-Sulfatase	Dermatan-, Heparansulfat
MPS II (nicht neuropathisch)	Hunter (mild)	Iduronat-2-Sulfatase	Dermatan-, Heparansulfat
MPS IIIA	Sanfilippo A	Heparan-N- Sulfatase (Sulfaminidase)	Heparansulfat
MPS IIIB	Sanfilippo B	$\alpha$ -N-Acetyl- Glucosaminidase	Heparansulfat
MPS IIIC	Sanfilippo C	Acetyl-CoA- $\alpha$ - Glucosaminid- Acetyltransferase	Heparansulfat
MPS IIID	Sanfilippo D	N-Acetylglucosamin- 6-Sulfatase	Heparansulfat
MPS IVA	Morquio A	Galaktose-6- Sulfatase	Keratan-, Chond- roitin-6-sulfat
MPS IVB	Morquio B	$\beta$ -Galaktosidase	Keratansulfat
MPS VI	Maroteaux- Lamy	N-Acetyl-galacto- samin-4-Sulfatase (Arylsulfatase B)	Dermatansulfat
MPS VII	Sly	$\beta$ -Glucuronidase	Dermatan-, Heparan-, Chon- droitin-4,6-Sulfat
MPS IX	-	Hyaluronidase	Hyaluronan



## 1.2 Mukopolysaccharidose Typ II - Morbus Hunter

Morbus Hunter, auch Mukopolysaccharidose Typ II genannt, ist eine seltene, progrediente, x-chromosomal vererbte Stoffwechselkrankheit, die durch ein Defizit an Iduronat-2-sulfatase (IDS) hervorgerufen wird. Das lysosomale Enzym ist verantwortlich für die Abspaltung der Sulfatgruppe an Position 2 der Iduronsäure von Dermatan- und Heparansulfat. Abbildung 1 zeigt den Abbau von Heparansulfat, die benötigten Enzyme und die jeweils resultierenden Erkrankungen bei einem Enzymdefizit.

Aufgrund der Blockade der Degradation von Heparan- und Dermatansulfat reichern sich die Glykosaminoglykane in den Lysosomen der Zellen an (1;2). Der Beginn der Symptome von Morbus Hunter ist sehr variabel und schwankt interindividuell auch im Hinblick auf die Progression und Schwere sehr stark (1;2).

Das klinische Bild von Morbus Hunter zeigt sich somit sehr heterogen und reicht von der Beteiligung des Zentralnervensystems (neuropathische Verlaufsform) bis hin zu einer sehr milden Ausprägung mit normaler Intelligenz (nicht neuropathische Verlaufsform) (1-4). Die Patienten der beiden Verlaufsformen unterscheiden sich in der kognitiven Beeinträchtigung, Lebenserwartung und dem Alter ab dem die Krankheit apparent wird (1;5). Die Übergänge der Verlaufsformen sind fließend (6). Die neuropathische Form des Morbus Hunter scheint etwa dreimal so häufig vorzukommen wie der nicht neuropathische Phänotyp, jedoch sind keine akkuraten Daten verfügbar (2-4).

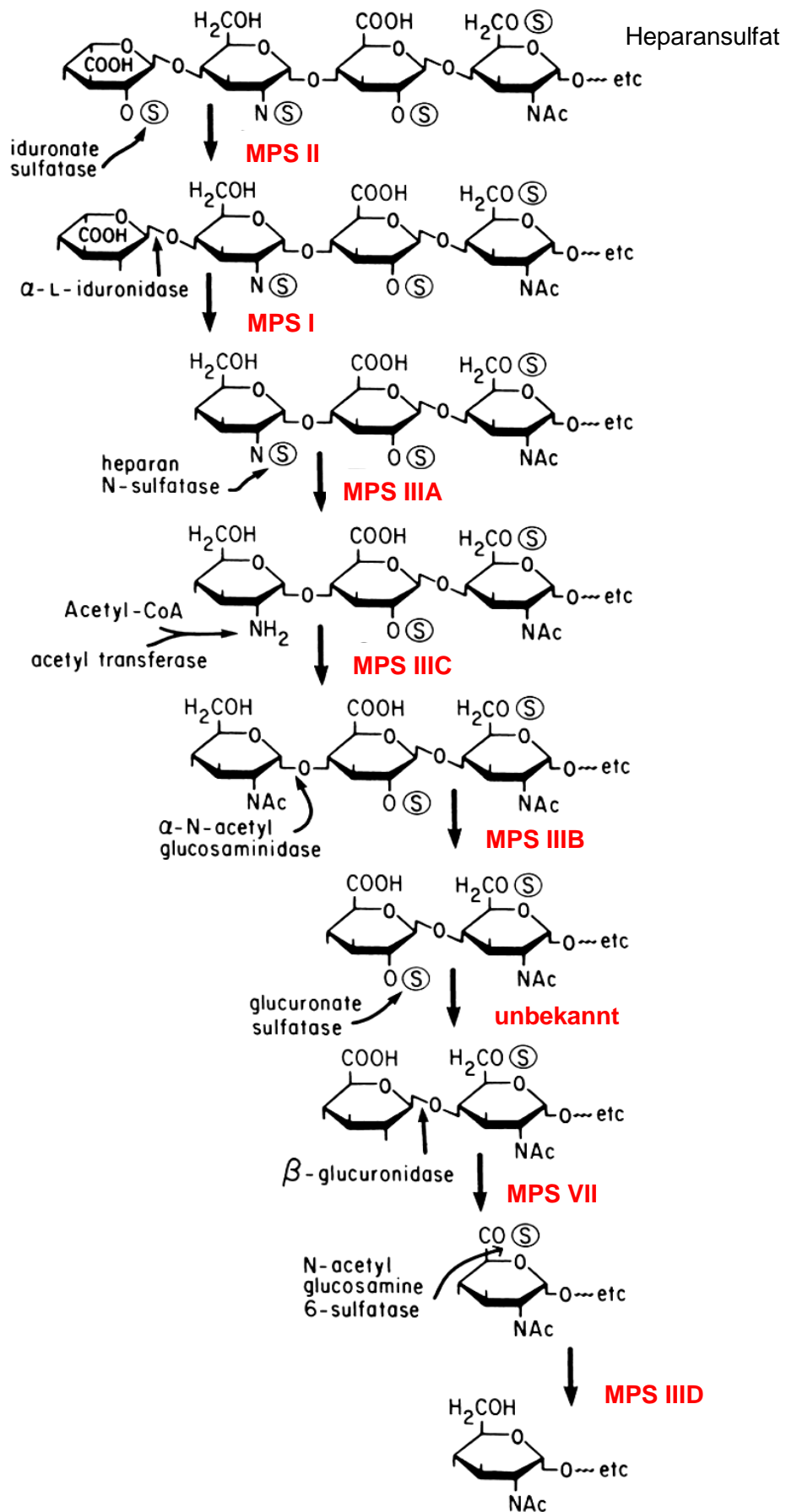
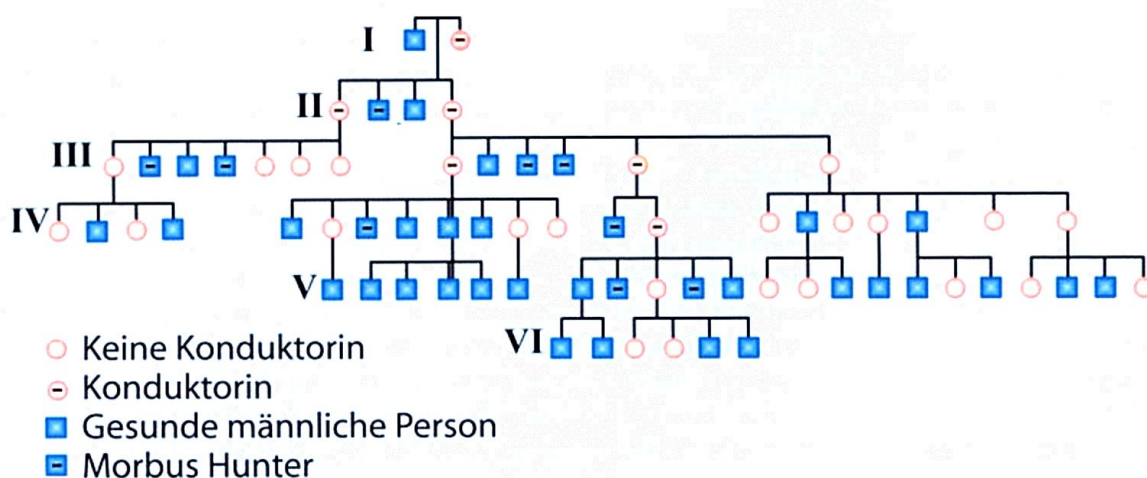


Abbildung 1: Schrittweiser Abbau von Heparansulfat mit den zugehörigen Mukopolysaccharidosen (modifiziert nach Neufeld et al. (1))

## Geschichte des Morbus Hunter

Bereits 1835 erfolgte eine Beschreibung eines Morbus Hunter-Patienten durch den nordamerikanischen Schriftsteller Washington Irving (1783-1859) in einem Reisebericht. Der beschriebene Patient gehörte einer Familie an, die seit 250 Jahren in den New Yorker Catskill Bergen gelebt hatte (6). Erst 1954 veröffentlichten Beebe und Formel den Stammbaum dieser Familie, der einen x-chromosomalen Erbgang der Erkrankung zeigt. In der Familie waren in fünf Generationen neun männliche Morbus Hunter-Patienten betroffen (7) (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Stammbaum einer Familie mit Morbus Hunter, beschrieben von Beebe und Formel 1954 (aus Kircher et al. (6))**

Erstmals wissenschaftlich beschrieben wurde MORBUS HUNTER von Charles Hunter, einem kanadischen Arzt, der im Jahr 1917 eine seltene Erkrankung von zwei Brüdern schilderte (8). Diese Publikation beschreibt die physische Ausprägung dieser Erkrankung, die später auch seinen Namen tragen sollte. Die beschriebenen zwei Brüder im Alter von 8 und 10 Jahren mit normaler Intelligenz beschrieb er als kleinwüchsig mit großen Köpfen und dysmorphen Gesichtszügen. Außerdem schilderte er die aufgeblähten Bäuche, die aufgrund einer Hepatosplenomegalie auftraten, die sehr eingeschränkte Beweglichkeit der steifen Gelenke und die ungelente und steife Gangart. Die Atmung der beiden war geräuschvoll, und während des Schlafens schwerfällig, und durch Schnarchen gekennzeichnet. Der ältere Bruder hatte ein vergrößertes Herz mit deutlichen diastolischen und systolischen Geräuschen. Die Brüder litten beide an einem reduzierten Hörvermögen. Ein paar Jahre später publizierte Gertrud Hurler eine

Beschreibung von zwei Jungen, die ähnliche Symptome wie die von C. Hunter beschriebenen Brüder aufwiesen (9). Zusätzlich schilderte G. Hurler die mentale Retardierung, die Hornhauttrübung und die Kyphose der Kinder. Lange Zeit wurden diese beiden Erkrankungen als Hurler-Hunter-Syndrom zusammen gefasst, bis etwa 50 Jahre später die unterschiedlichen Enzymdefekte mittels biochemischer Tests nachgewiesen werden konnten (10).

Brante benutzte 1952 erstmal den Namen Mukopolysaccharidose in einer Publikation, die den Nachweis von sauren Mukopolysacchariden im Gehirn eines M. Hurler-Patienten (MPS I) beschrieb (11). Fünf Jahre später wurde der Nachweis für eine vermehrte Ausscheidung von Dermatan- und Heparansulfat im Urin eines Patienten mit Hurler Syndrom erbracht (12). In der Folge wurde eine Akkumulation von GAG in Hautfibroblasten von M. Hunter- und M. Hurler-Patienten nachgewiesen und es konnte gezeigt werden, dass ein verminderter Abbau und nicht eine bis dahin vermutete vermehrte Synthese oder verminderte zelluläre Ausscheidung ursächlich ist (13). Dieselbe Arbeitsgruppe mit Elizabeth Neufeld zeigte, dass der Stoffwechseldefekt durch bestimmte Faktoren aus Fibroblastenkulturen von M. Hunter- und M. Hurler-Patienten gegenseitig korrigiert werden konnte. Im Jahr 1972 wurde der sogenannte „Hunter-Korrektur-Faktor“ aus humanem Urin isoliert, welches heute als Enzym Iduronat-2-Sulfatase bekannt ist (14;15). In den 90er Jahren wurde die Aminosäuresequenz von Iduronat-2-Sulfatase und die Lokalisation des Genortes auf dem X-Chromosom an Position 28 auf dem langen Arm des Chromosoms bestimmt und damit die Grundlage für die Enzymersatztherapie (ERT) als Therapieoption geschaffen (16;17).

### **Hunter Outcome Survey (HOS)**

Im Oktober 2005 wurde das Hunter Outcome Survey (HOS) von der Firma Shire ins Leben gerufen. HOS ist ein web-basiertes, internationales, multizentrisches, anonymisiertes Patientenregister für M. Hunter-Patienten, welches als Langzeit-Beobachtungsstudie angelegt ist. HOS wurde etabliert, um das Verständnis für M. Hunter zu verbessern und den Langzeiteffekt der Enzymersatztherapie zu untersuchen (18). Alle Daten der meist halbjährlichen Klinikbesuche zur Verlaufskontrolle werden in die HOS-Datenbank eingetragen, um die Krankengeschichte der Patienten genau zu dokumentieren. Diese Daten

umfassen die Ergebnisse der körperlichen und der klinisch-chemischen Untersuchungen. Auch die in der Arbeitsgemeinschaft für lysosomale Speicherkrankheiten (Villa Metabolica) der Universitätsmedizin Mainz betreuten M. Hunter-Patienten haben ihre schriftliche Einwilligung gegeben, an der von der Ethikkommission genehmigten HOS-Studie teilzunehmen. Anhang 1 zeigt die HOS-Patienteninformation und Einwilligungserklärung für Erwachsene, Anhang 2 die Einwilligungserklärung für Kinder.

### Inzidenz

Mukopolysaccharidosen sind weltweit verbreitet, auch wenn die Häufigkeit der einzelnen MPS-Erkrankungen je nach Land varriert (19-28). Die Angaben zur Häufigkeit von allen MPS-Typen zusammen genommen schwanken ebenfalls. Die häufigste Inzidenz wurde von Poorthuis et al. in den Niederlanden berichtet (4,5 MPS-Fälle bei 100.000 Geburten) (24). Malm et al. schilderte die niedrigste gefundene Häufigkeit von MPS-Fällen mit 1,75 MPS-Fällen bei 100.000 Geburten in Schweden (28). Die Inzidenz von M. Hunter pro 100.000 Geburten ist länderspezifisch in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Länderspezifische Inzidenz von Morbus Hunter pro 100.000 Geburten**

Land	Inzidenz von Morbus Hunter pro 100.000 Geburten
Deutschland <sup>(19)</sup>	0,64
Nordirland <sup>(22)</sup>	0,71
Australien <sup>(23)</sup>	0,62
Niederlande <sup>(24)</sup>	0,67
Westaustralien <sup>(25)</sup>	0,31
Großbritannien <sup>(21)</sup>	0,38
Taiwan <sup>(27)</sup>	1,07
Schweden <sup>(28)</sup>	0,27
Norwegen <sup>(28)</sup>	0,13
Dänemark <sup>(28)</sup>	0,27

In einer Studie aus Israel wird von einer fast doppelt so hohen Inzidenz von M. Hunter bei aschkenasischen, sephardischen und orientalischen Juden berichtet (20). Weitere Studien deuten auf einen pränatalen Selektionsvorteil für ein Hunter Allel bei aschkenasischen Juden hin, da besonders viele heterozygote Träger in dieser Populationsgruppe auftraten (29-31). Keine der bisher angenommenen Hypothesen hierfür, wie z.B. eine höhere Resistenz gegenüber Tuberkulose, konnte bislang bestätigt werden (32). Legt man die Studie von Baehner et al. zugrunde, so beträgt die Inzidenz von M. Hunter in Deutschland ca. 1,3 M. Hunter-Patienten bei 100.000 männlichen Geburten. Die Häufigkeit aller MPS-Formen in Deutschland beläuft sich laut derselben Studie auf etwa 3,53 MPS-Fälle bei 100.000 Geburten (19).

### **Genetik**

M. Hunter ist eine x-chromosomal vererbte, progrediente Stoffwechselerkrankung, die fast ausschließlich Jungen bzw. Männer betrifft (1). Das betroffene IDS-Gen ist bei Xq28 lokalisiert und umfasst 24 Kilobasenpaare mit neun Exons (17;33). Die komplette Länge der cDNA umfasst 1650 Basenpaare, die das 550 Aminosäuren-beinhaltende IDS-Protein kodieren (16;34). Ein IDS-Pseudogen befindet sich innerhalb von 80 kb an der Telomeraseite des IDS-Gens. Dieses IDS-Pseudogen trägt homologe Sequenzen der Exons 2 und 3 und der Introns 2, 3, und 7 zum IDS-Gen (35). Sowohl distal als auch proximal des IDS-Gens befinden sich weitere genreiche Regionen (36;37). Erst kürzlich wurde berichtet, dass mehr als 470 Mutationen des IDS-Genes gemäß der Human Gene Mutation Database bekannt sind (38). Die häufigsten Mutationen sind zu 52% Punktmutationen und zu 17% kleine Deletionen (38). Mit geringeren Häufigkeiten treten kleine, partielle oder komplette Deletionen, kleine oder große Insertionen, Gen/Pseudogen-Rearrangements, Splice-Mutationen, Nonsense- oder Missense-Mutationen auf (34;37-48). Brusius-Facchin et al. untersuchten 103 nicht verwandte M. Hunter-Patienten und konnten nachweisen, dass 19% dieser Patienten eine große Mutation, wie z.B. komplette IDS-Gen-Deletionen, in sich trugen, während 81% der Patienten kleine Genveränderungen zeigten (38). Nur acht Punktmutationen wurden in dieser Studie in mehr als einer Familie gefunden (38). Bereits vor einigen Jahren wurde bei 155 nicht verwandten M. Hunter-Patienten gezeigt, dass nur 17% eine große Genveränderung aufwiesen, während bei den restlichen 83%

kleine Mutationen auftraten. Diese waren in der beschriebenen Population sehr heterogen und nur 13 der insgesamt 96 verschiedenen Mutationen wurden in mehr als einer Familie gefunden (34). Die meisten männlichen Erkrankten sind nicht reproduktionsfähig, daher kann von einer de Novo Mutationsrate von etwa 0,33 ausgegangen werden, die für alle X-chromosomal vererbten letalen Krankheiten gilt (2). Auch M. Hunter zeigt de Novo Mutationen (34;49;50). Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist eine homologe Rekombination, die sowohl das IDS-Gen als auch das IDS-Pseudogen betrifft (51). Diese ohne Basenpaarverlust ablaufende Rekombination zwischen Intron 7 des IDS-Gens und des IDS-Pseudogens führt zu einer Inversion des dazwischen liegenden Bereichs möglicherweise nach Doppelstrangbruch (52). Auch Brusius-Facchin et al. berichteten, dass 12% der von ihnen untersuchten 103 Patienten diese Rekombination mit Inversion aufwiesen (38).

### **Genotyp-Phänotyp-Korrelationen**

Es besteht keine vollständige Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei M. Hunter, weil die Ausprägungen und Schwere der klinischen Symptome interindividuell sehr stark variieren, so dass eine Beurteilung der Korrelation bei dieser seltenen Erkrankung komplex und mit Schwierigkeiten behaftet ist (1;2;34;53). Da Kriterien zur Einteilung des Schweregrades fehlen, wird meist nur nach dem Grad der neurologischen Beteiligung klassifiziert (53;54). Es wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt, dass große Mutationen, die mit einem kompletten Verlust an IDS-Enzymaktivität einhergehen, mit einer schweren Form von M. Hunter assoziiert sind (34;38;53;55;56). Wohingegen eine Restaktivität der IDS nicht unbedingt ohne neuropathische Beteiligung verläuft (2;38). Lee et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen IDS-Restaktivität und Phänotyp und konnten nur eine Tendenz, jedoch keine eindeutige Korrelation erkennen (57). Die in Portugal und Spanien am meisten verbreitete Punktmutation c.1122C>T scheint sich jedoch nie neuropathisch zu manifestieren (34;55;58). Deletionen, die nicht nur das IDS-Gen, sondern auch andere Gene betreffen, scheinen ebenfalls einen Einfluss auf die Ausprägung der M. Hunter-Symptome zu haben (37;59).

## **Konduktorinnen und Patientinnen mit Morbus Hunter**

Konduktorinnen, die nur ein mutiertes IDS-Gen in sich tragen, sind meist asymptomatisch mit durchschnittlich etwa 50% verringerter IDS-Enzymaktivität (60;61). Die alleinige Bestimmung der IDS-Enzymaktivität ist jedoch nicht ausreichend, um einen Trägerstatus festzustellen, da keine ausreichende Korrelation festgestellt werden konnte (49). Eine Identifikation der Mutation bei heterozygoten Frauen ist unabdingbar, um den Konduktorinnenstatus nachzuweisen, auch wenn eine Bestimmung mittels Stammbaum manchmal möglich ist. Die Feststellung eines Trägerstatus und die Spezifizierung der Mutation ist wichtig für eine genetische Beratung (2). Bereits 1983 wurde von Mossman et al. eine weibliche M. Hunter-Patientin beschrieben (62) und weitere Fallbeschreibungen von neuropathisch als auch nicht neuropathisch betroffenen Patientinnen folgten. Bei den meisten Patientinnen liegt eine einseitige unausgewogene X-Chromosom-Inaktivierung zugrunde (63-70).

## **Diagnostik**

Das Auftreten, der Beginn und die Ausprägung der Symptome bei M. Hunter variieren interindividuell sehr stark und sind nicht spezifisch (1-3). Besonders bei fehlender positiver Familienanamnese wird die Diagnose zeitlich verzögert gestellt. Eine Studie von Schwartz et al. zeigte, dass der Beginn der Symptome bei 77 Patienten im Median bei 18 Monaten lag, die Diagnose erfolgte jedoch erst im Alter von 6 Jahren (71). Einige wenige Symptome und Anzeichen einer Mukopolysaccharidose (wie z.B. Hernien) können bereits bei Geburt vorliegen. Viele Patienten haben sich innerhalb der ersten Lebensjahre einer Hernien-Operation oder einer Tympanotomie unterzogen, ohne dass zu diesem Zeitpunkt M. Hunter diagnostiziert war (2;71;72). Der erste Verdacht auf M. Hunter basiert oft auf den typischen veränderten Gesichtszügen und wird von Ärzten oder anderen Mitarbeitern im Gesundheitswesen im Rahmen von anderen Untersuchungen geäußert (2). Verzögerte Sprachentwicklung, Karpaltunnelsyndrom, frühe Leisten- und Nabelhernien, häufige Atemwegs- und/oder Ohrinfektionen, Wachstumsverzögerungen, Hepatosplenomegalie, Gelenkkontrakturen und Skelettveränderungen im Sinne einer Dysostosis multiplex bilden einen wichtigen Hinweis auf einen vorliegenden M. Hunter (2;3;72-74). Folgende Diagnostikmethoden sind bei Verdacht auf einen M. Hunter zusätzlich zu einer klinischen Untersuchung und Anamnese angezeigt.



## **GAG-Ausscheidung im Urin**

Eine Distinktion zwischen den unterschiedlichen MPS-Typen ist bei einer erhöhten GAG-Ausscheidung im Urin nicht möglich, da sie bei fast allen Mukopolysaccharidosen auftritt. Eine erhöhte Dermatan- und Heparansulfat-Ausscheidung tritt bei MPS I, II und VII auf (1;2) (vgl. Tabelle 1).

Der Berry Test ist eine unspezifische Nachweismethode von GAG im Urin und beruht auf einer spezifischen Färbung der Mukopolysaccharide mit Toluidinblau (75). Dieser Test dient nur der Orientierung, da sowohl falsch-positive wegen zu hoch konzentriertem Urin als auch falsch-negative Resultate möglich sind (76). Um erhöhte GAG-Ausscheidung im Urin zu verifizieren, erfolgt die quantitative Analyse der Mukopolysaccharide mittels DMB-Test nach de Jong im 24-Stunden-Sammelurin (77). Der Sammelurin ist notwendig, da die Mukopolysaccharid-Ausscheidung im Laufe des Tages starken Schwankungen unterliegt. Die GAG werden mittels Dimethylmethylenblau angefärbt und mittels photometrischer Messung quantitativ bestimmt (76). Die GAG-Konzentration wird auf den Kreatininwert bezogen angegeben (78). Die GAG-Ausscheidung im Urin ist altersabhängig. Normwerte für die Obergrenze finden sich ebenfalls in der Publikation von de Jong (77). Kinder mit einer schweren Form von MPS haben im Vergleich zu einem gesunden Kind gleichen Alters eine etwa fünf- bis zehnfach erhöhte GAG-Ausscheidung im Urin (6). Jedoch könnten auch bei diesem Verfahren falsch-negative Befunde resultieren, wenn die gemessenen Werte innerhalb der Normwerte liegen (6).

Zeigt der Berry-Test und/oder der DMB-Test eine vermehrte Mukopolysaccharid-Ausscheidung im Urin an, so muss eine qualitative Analyse mittels Elektrophorese erfolgen. Dermatan-, Heparan-, Chondroitin- und Keratansulfat können mittels dieses Verfahrens differenziert werden (76). Da eine erhöhte Dermatan- und Heparansulfat-Ausscheidung sowohl bei MPS I, II und VII auftritt (siehe Tabelle 1) muss, um eine M. Hunter Diagnose zweifelsfrei zu bestätigen eine IDS-Enzymaktivitätsbestimmung erfolgen (1-3;6).

## **Enzymaktivitätsbestimmung**

Zur endgültigen Bestätigung der Diagnose einer Mukopolysaccharidose ist der Nachweis des zugrundeliegenden Enzymdefekts mittels eines Enzym-Assays un-

erlässlich. Dieser kann mittels einer Enzymaktivitätsbestimmung aus Serum, Plasma, Leukozyten oder Hautfibroblasten erbracht werden (2). Iduronat-2-sulfatase (IDS) ist in allen Körperzellen außer reifen Erythrozyten vorhanden, so dass die Wahl des Verfahrens vom Untersuchungslabor abhängt (2). Bei einem Verdacht auf M. Hunter erfolgt die IDS-Enzymaktivitätsbestimmung in der Regel aus Serum des Patienten nach der Methode von Voznyi et al. (79) (siehe 3.2). Die Enzymaktivitätsmessung erfolgt mit Hilfe des künstlichen Substrates 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -Iduronat-2-Sulfat. Das Enzym IDS setzt die fluoreszierende Substanz 4-Methylumbelliferon (4-MU) frei und dieses kann fluoreszenzphotometrisch erfasst werden. Dann kann über die Intensität der 4-MU-Fluoreszenz auf die Umsatzrate von IDS geschlossen werden (79). Da Bestimmungsmethoden im Serum nicht für alle MPS-Typen als Nachweismethode zur Verfügung stehen oder wenn man mehrere Unterformen der Mukopolysaccharidosen ausschließen muss, empfiehlt sich, eine Hautfibroblastenkultur anzulegen, und die Bestimmung des Enzymdefekts mit diesem Material vorzunehmen (6). Der komplette Verlust oder eine geringe IDS-Aktivität bei männlichen Patienten bestätigt einen M. Hunter, wenn gleichzeitig eine andere Sulfatase eine normale Aktivität besitzt. Geringe IDS-Aktivität kann auch bei einem multiplen Sulfatase-Mangel auftreten, und auch die klinischen Symptome des multiplen Sulfatase-Mangels können M. Hunter-Merkmale aufweisen, deshalb ist die Enzymaktivitätsbestimmung einer weiteren Sulfatase essentiell (2;3).

Eine alleinige Enzymaktivitätsbestimmung ist nicht ausreichend, um die Schwere der Erkrankung zu bestimmen oder über einen Trägerstatus einer weiblichen Person eine Aussage zu treffen (2;38;49). Konduktorinnen, die nur ein mutiertes IDS-Gen in sich tragen, weisen zwar meist nur eine durchschnittliche IDS-Aktivität von 50% auf (60;61), jedoch konnte keine ausreichende Korrelation festgestellt werden, um einen Trägerstatus mit dieser Methode festzustellen (49).

### **Molekulargenetische Diagnostik**

Die molekulargenetische Analyse ist in immer mehr Diagnosezentren als Verfahren verfügbar und kann zur Diagnosesicherung bei männlichen M. Hunter-Patienten angewendet werden. Die molekulargenetische Diagnostik kann aufgrund der vielfach nur in einer Familie vorkommenden Mutation einige Zeit in Anspruch nehmen (6;34;38). Die Mutationsanalyse ist das einzige sichere Verfah-

ren, um heterozygote Trägerinnen eines defekten IDS-Gens zu identifizieren (2;3;6;80). Ist die Mutation des Indexpatienten bekannt, so sollte eine komplette Stammbaumanalyse zur Aufklärung der Trägerstatus bei Angehörigen erfolgen und eine genetische Beratung allen Familienangehörigen angeboten werden (80). Die Mutationsanalyse ist besonders essentiell, falls ein weiterer Kinderwunsch bestehen sollte. Ist die Mutation identifiziert, kann mittels Pränataldiagnostik innerhalb weniger Tage eine Aussage über eine eventuell vorhandene Mutation im Embryo getroffen werden (6).

Bei Verdacht auf M. Hunter bei einem männlichen Patienten ist das im folgenden Flussdiagramm dargestellte Vorgehen zur Diagnosestellung empfohlen:

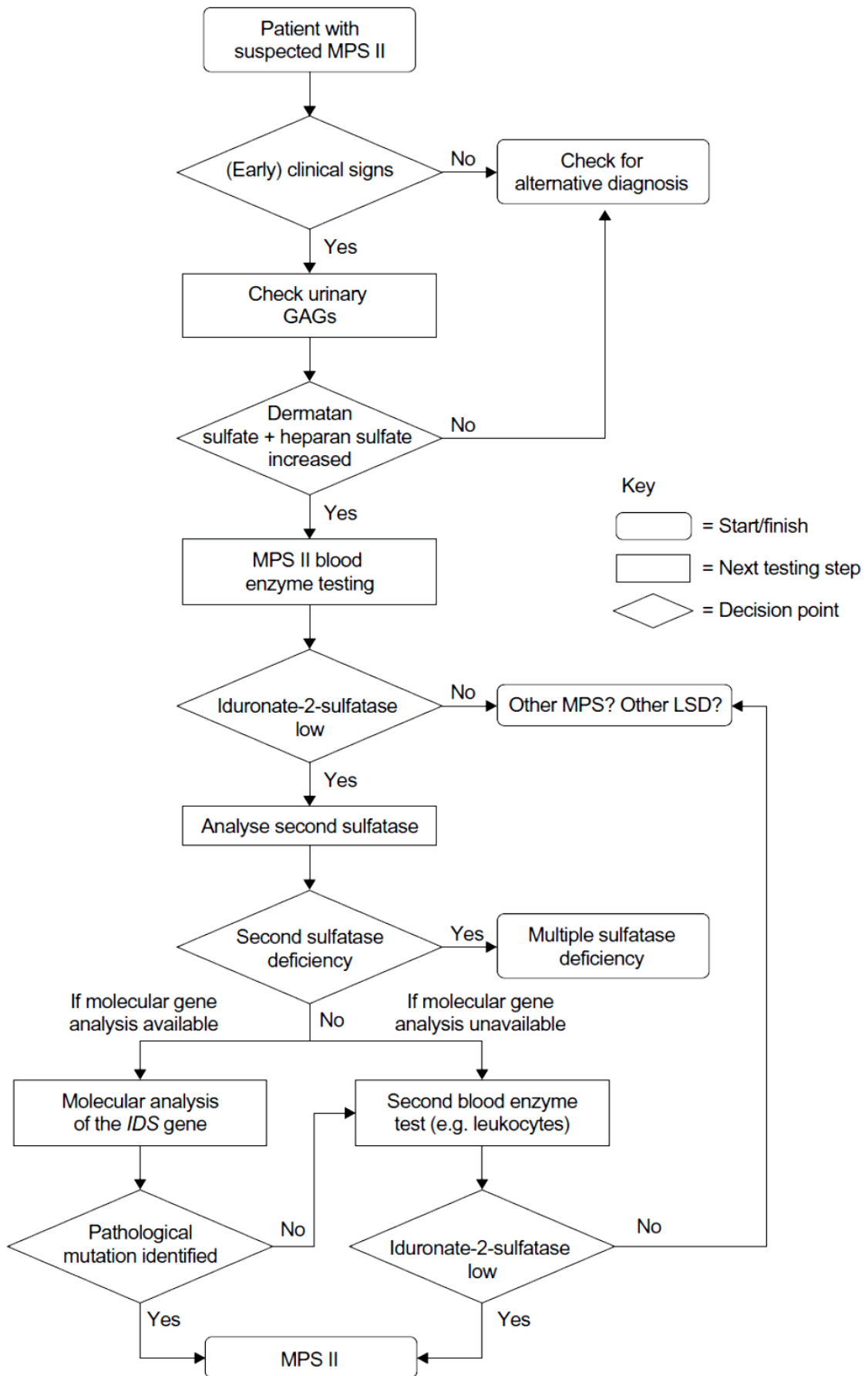


Abbildung 3: Flussdiagramm zur Diagnosestellung für Morbus Hunter gemäß den europäischen Empfehlungen (aus Scarpa et al. (80))

### 1.3 Organmanifestationen

M. Hunter ist eine Multisystemerkrankung und weist ein breites klinisches Spektrum mit interindividuellem Krankheitsbeginn, Ausprägungen und Progression der Symptome auf. Das klinische Bild reicht von einer schweren Verlaufsform mit Beteiligung des Zentralnervensystems (neuropathisch) bis hin zu einer sehr milden Ausprägung mit normaler Intelligenz (nicht neuropathisch). Der Übergang dieser Verlaufsformen ist fließend (1-4;6). Die neuropathische Form von M. Hunter zeigt sich meist zwischen dem zweiten und vierten Lebensjahr und ist durch eine progrediente mentale Retardierung gekennzeichnet. Die Patienten versterben meist aufgrund von kardiorespiratorischen Komplikationen in der zweiten Lebensdekade. Die nicht neuropathischen M. Hunter-Patienten mit normaler Intelligenz können je nach Schwere der Herz-/Lungenbeteiligung bis in die fünfte oder sechste Lebensdekade überleben (1;5;81). Die Schwere der Erkrankung ist weder durch Enzymaktivität bestimmbar, noch durch eine Mutationsanalyse vorhersehbar (2;38;49). Vergrößerte Gesichtszüge, Gelenkkontrakturen, Skelettveränderungen im Sinne einer Dysostosis multiplex, Wachstums- oder Sprachverzögerungen, Hepatosplenomegalie, frühe Leisten- oder Nabelhernien, häufige Atemwegs- und/oder Ohrinfektionen können erste Anzeichen der Erkrankung sein (2;3;71;72;74). Die Symptome von M. Hunter scheinen primär Resultate der GAG Akkumulation im Gewebe und Organen zu sein (2). Die akkumulierenden GAG stören bestimmte Zellfunktionen und führen schließlich zum Untergang der Zelle. Der genaue Mechanismus hierfür ist zurzeit noch unbekannt. Faktoren, die an der Entstehung der M. Hunter-spezifischen Symptome beteiligt sind, scheinen Rezeptoraktivierung durch nicht-physiologische Liganden, Veränderungen der intrazellulären Calcium-Homöostase, Beeinträchtigung der Autophagie und Entzündungsprozesse und weitere nicht geklärte Faktoren zu sein (82;83). Des Weiteren ist bekannt, dass sich neben GAG die Ganglioside GM<sub>2</sub> und GM<sub>3</sub> in der weißen und grauen Substanz der Gehirne von M. Hunter-Patienten ablagern. Vermutet wird hierbei eine Beeinträchtigung der abbauenden Enzyme von Sphingolipiden. Die Ablagerung im Gehirn der Patienten scheint eine Erklärung für die mentale Retardierung neuropathisch betroffener M. Hunter-Patienten zu sein (84) .

### 1.3.1 Äußeres Erscheinungsbild und muskuloskelettales System



**Abbildung 4: Typische vergrößerte Gesichtszüge eines Morbus Hunter-Patienten**

(Mit freundlicher Genehmigung von Shire Deutschland GmbH)

Die neurologische Beteiligung ist aus dem Aussehen und den skelettalen Anomalien nicht abzuleiten. Die neugeborenen M. Hunter-Patienten erscheinen typischerweise unauffällig. Das häufigste Merkmal von M. Hunter, die Vergrößerung der Gesichtszüge, wird meist im Alter zwischen zwei und vier Jahren bei neuropathisch betroffenen Patienten deutlich. Bei nicht neuropathisch Betroffenen kann diese Veränderung später deutlich werden (2-4;85;86). Der große Kopfumfang mit einer verbreiterten tiefliegenden Nasenwurzel, fleischig wirkenden Lippen und einer vergrößerten Zunge gehören zu den typischen Kennzeichen eines M. Hunter. Auch buschige Augenbrauen und ein vergrößerter Kopfumfang zählen zu dem äußerlichen Erscheinungsbild eines M. Hunter-Patienten (2;3;6;71;81;85-87). Viele Patienten mit M. Hunter sind bis zu einem Alter zwischen drei und fünf Jahren größer als gleichaltrige gesunde Jungen, bleiben aber in den folgenden Jahren im Wachstum zurück und erreichen eine maximale Größe um 150 cm (71;85;86;88).

Die generalisierte Skelettbeteiligung, bekannt als Dysostis multiplex, ist allen Mukopolysaccharidosen gemein, tritt unabhängig von der Schwere des Phänotyps auf und wurde bereits von Hunter in seiner Beschreibung der zwei Brüder dargestellt (1-3;8). Eine HOS-Analyse von 2010 zeigt, dass 79% der Patienten Skelettmassifikationen mit einem mittleren Beginn von 3,5 Jahren aufweisen. 25% der untersuchten Patienten weisen einen abnormalen Gang (u.a. Zehenspitzen Gang) auf, der im Mittel bereits mit 5,4 Jahren einsetzt (89). Die muskuloskelettalen Veränderungen umfassen generalisierte abnorme Verdickungen der Knochen, irregu-

läre Ossifikationen der Epiphysen in den Gelenken von Hand, Schulter und Ellbogen (2;8). Bewegungseinschränkende Kontrakturen zeigen sich an allen Gelenken (89). Die Hände sind klein und verkürzt. Die Kontrakturen der Hände und das häufig vorkommende Karpaltunnelsyndrom bei M. Hunter-Patienten resultieren häufig in einem Funktionsverlust der Hände (1;85;90-93). Die bereits erwähnten Operationen des Karpaltunnelsyndroms bei M. Hunter-Kindern sind ebenfalls häufiger als bei gleichaltrigen Kindern und können ein Hinweis auf eine eventuell undiagnostizierte Mukopolysaccharidose sein (72). Die Rippen zeigen ebenfalls eine Verdickung und sind ungewöhnlich geformt (2). Die Wirbelkörper sind ovoid gestaltet, weisen jedoch an den Seitenflächen unregelmäßige Kerben auf (2;3;6). Eine Hüftgelenkdysplasie ist das häufigste orthopädische Langzeitproblem, welches zu einer signifikanten Behinderung führen kann (3). Ursächlich für die komplexen Veränderungen im muskuloskelettalen System werden die Akkumulation der GAG in Knorpel, Knochen und Bindegewebe, sowie entzündliche und apoptotische Prozesse gesehen (89). Die skelettalen Veränderungen führen zu gravierenden Einschränkungen der Gelenkbeweglichkeiten und der Mobilität der M. Hunter-Patienten (1-3;6).



**Abbildung 5: Dystosis multiplex bei einem Morbus Hunter-Patient**

(Mit freundlicher Genehmigung von Shire Deutschland GmbH)

### 1.3.2 Augen

Im Vergleich zu anderen Formen der Mukopolysaccharidose stellt die Hornhauttrübung kein charakteristisches Merkmal für M. Hunter dar. Spaltlampenmikroskopisch lässt sich eventuell eine diskrete Stromatrübung erkennen, die jedoch nicht visusrelevant ist. Eine retinale Dysfunktion lässt sich mittels Elektroretinografie bei dem überwiegenden Teil der M. Hunter-Patienten diagnostizieren (1-3;94-97). Bei 20% bzw. 11% der Patienten werden ein Anschwellen des Sehnervs bzw. eine Optikusatrophie beobachtet (98). Die okulären Veränderungen können aufgrund der Glykosaminoglykan-Einlagerungen in allen Strukturen des Auges häufig auch mit einer Einschränkung des Gesichtsfeldes einhergehen (2;97). Skleraverdickungen oder Glaukome können weitere Auffälligkeiten des Auges bei M. Hunter-Patienten sein (96;97).

### 1.3.3 Hals, Nasen, Ohren

Auch in diesem Bereich spielt die GAG Akkumulation eine Rolle und führt zu Veränderungen, wie z.B. einer typischen heiseren Stimme. Makroglossie, hypertrophe Adenoide und Tonsillen und eine verringerte Beweglichkeit der Kiefergelenke bedingen eine geringere Mundöffnung, die wiederum zu einer progressiven Schluckproblematik beitragen kann (2;3;85;99). Die eben genannten Symptome der Erkrankung tragen zu den respiratorischen Problemen bei, die in 1.3.5 beschrieben werden (2;3). Viele M. Hunter-Patienten haben häufige Infektionen der oberen Atemwege (2;85). Gemäß einer HOS-Analyse von 2011 leiden 72% der Patienten an rezidivierenden Mittelohrentzündungen, die zu einem Hörverlust beitragen, der bei 67% der Patienten auftritt (100). Auch Paukenergüsse fördern die Hörminderung. Der progressiv verlaufende Hörverlust ist bedingt durch Schalleitungs- und/oder Schallempfindungsstörungen (100;101). Die Otitiden beginnen laut der HOS-Analyse bereits in einem mittleren Alter von 1,9 Jahren, so dass häufige Mittelohrentzündungen auf einen eventuell undiagnostizierten M. Hunter hinweisen können. Auch der Verlust des Hörvermögens beginnt im Durchschnitt im Alter unter fünf Jahre und 41% der Patienten sind mit Hörgeräten versorgt (100). Weitere orale Auffälligkeiten sind unregelmäßig geformte, zapfenartige Zähne, die weit voneinander entfernt stehen, und hyperplastisches Zahnfleisch (86;102).



### 1.3.4 Abdomen

Laut einer Studie von Muenzer et al. tritt bei 79% der M. Hunter-Patienten eine Hepatosplenomegalie auf, die auf die GAG Speicherung in der Leber und Milz zurückzuführen ist und eine Vergrößerung des Abdomens bedingt (103). Wraith et al. berichteten eine Prävalenz von 89% der Hepato- und/oder Splenomegalien (18). Auch Nabel- und Leistenhernien sind ein häufiges Merkmal eines M. Hunter (2;85;86). 78% sind laut Wraith et al. hiervon betroffen, die im Mittel bereits vor dem 3. Lebensjahr auftreten (18). Die betroffenen Patienten leiden häufig an Diarrhöen, wobei mehr neuropathisch Betroffene als nicht neuropathisch Betroffene hiervon belastet sind (4).

### 1.3.5 Lunge und Atemwege

Die Atemwegsbeteiligung bei M. Hunter ist progredient, wird zuerst in den oberen Atemwegen offensichtlich und betrifft schließlich auch die unteren Atemwege (2). Viele M. Hunter-Patienten leiden an rezidivierenden Infekten der oberen Atemwege, eins der mit als erstes auftretenden Hinweise auf die Erkrankung (2;3). Die Akkumulation der Glykosaminoglykane im Weichteilgewebe des Halses, der Zunge und der Trachea wird für die zunehmende Verengung der Atemwege verantwortlich gemacht, dessen Komplikationen eine häufige Todesursache darstellen (2-4;81;104). Die normale Atmung der Patienten wird ebenfalls durch zähes nasales und tracheales Sekret und verengte, abnormal geformte Trachea und Bronchien behindert (85;99;105). Eine restriktive Ventilationsstörung spielt bei M. Hunter ebenfalls eine Rolle, da die Ausdehnung der Lunge durch die abnormal geformten und steifen Rippen und die Hepatosplenomegalie eingeschränkt ist (2;104;106;107). Die Atemwegsobstruktion führt häufig zu einem Schlafapnoe-Syndrom, welches eine CPAP-Beatmung (Continuous Positive Airway Pressure) in der Nacht oder sogar eine permanente Tracheotomie erfordert (106;108). Eine häufig beobachtete Tracheomalazie und/oder Stenosen der Trachea und der Bronchien können zu einer akuten Atemwegsobstruktion oder einem Kollaps der Atemwege führen (2;104;109). Patienten mit M. Hunter haben aufgrund der beschriebenen Atemwegsproblematiken ein erhöhtes Narkoserisiko (85;86;104;106).

### 1.3.6 Haut

Die Haut der M. Hunter-Patienten kann ebenso Veränderungen aufweisen. Ein für M. Hunter charakteristisches Merkmal ist die Peau d'orange (Orangenhaut) (6). Sie kennzeichnet sich durch blasse, knötchenförmige, meist in Gruppen stehende Verdickungen der Haut aus. Diese 2 – 10 mm großen Papeln treten typischerweise am Rücken, den Oberarmen und Schulterbereich, sowie dem Oberschenkel auf (1;2;6;110-112). Diese Ausprägung des Hunter Syndroms kommt allerdings nur bei manchen Patienten meist im Kleinkindesalter vor und korreliert nicht mit der Schwere der Erkrankung (1;6). Zusätzlich kann die Haut verdickt, unelastisch sein und eine meist den Rücken betreffende Hypertrichose aufweisen (6;110).

### 1.3.7 Nervensystem

Die Ausprägung der neurologischen Beteiligung variiert innerhalb des Patientenkollektivs sehr stark (1). Neugeborene M. Hunter-Patienten erscheinen meist unauffällig (3). Die ersten Entwicklungsstufen können noch normal verlaufen, jedoch zeigt sich bei neuropathisch betroffenen M. Hunter-Patienten die Beteiligung des Zentralnervensystems typischerweise durch eine verzögerte Entwicklung beim Sitzen, Laufen und Sprechen (86). Sie werden zu großen Teilen sogar nie vollständig sauber (86). Cho et al. beschrieb, dass bei 12 der 14 untersuchten neuropathisch betroffenen M. Hunter-Patienten die Sprachentwicklung um mehr als zwei Jahre verzögert war, wohingegen die nicht neuropathisch betroffenen Patienten eine fast normale Sprachentwicklung aufwiesen (73). Die mentale Beeinträchtigung ist tiefgreifend und progredient (3;82). Im Alter zwischen 6,5 und acht Jahren beginnt bei Patienten mit ZNS-Beteiligung meist eine Rückentwicklung. Anfänglich zeigen die Patienten aggressives und hyperaktives Verhalten, schließend wird die mentale Degeneration durch Apathie und zwei bis sechs Jahre später einen vollständigen Sprachverlust deutlich (4;6;71;86). Auch Gangunsicherheiten aufgrund der gestörten Grobmotorik führen schließlich zu einer Unfähigkeit alleine zu gehen, so dass ein Rollstuhl benötigt wird (6;86). Eine Studie von Schwartz et al. berichtete sogar, dass die neurologische Degeneration im Mittel bereits mit 6,2 Jahren beginnt und diese Patienten im Durchschnitt im Alter von 14,6 Jahren versterben (71). Bei Patienten mit neurologischer Beteiligung resultiert die mentale Degeneration in einer immer stärkeren Einschränkung der Fähigkeiten. Die Patienten verlieren im Endstadium die Fähigkeit zu kommunizieren, zu kauen und zu

schlucken. Auch die Fähigkeit, Darm-und Blasenfunktion zu kontrollieren geht vollständig verloren, und die Patienten bleiben bettlägerig (54;86). Es gibt ebenfalls Berichte von Rückenmarkskompressionen, epileptischen Anfällen und Hydrozephalus (113). Laut einer Studie von Wraith et al. sind bei 17% der Patienten ein Hydrozephalus und bei 18% epileptische Anfälle als neurologische Komplikationen zu finden (18).

Auch periphere Nervenkompressionen wie das sonst im Kindesalter sehr selten vorkommende Karpaltunnelsyndrom, entstehen durch die GAG Ablagerungen, ohne jedoch die typischen Symptome (z.B. Schmerzen) zu zeigen (2;91;92;113).

Eine weitere neurologische Komplikation, die einer frühzeitigen Operation bedarf, ist die Verengung des Spinalkanals, die im Halsbereich bis hin zu einer Rückenmarkskompression führen kann, welche Lähmungserscheinungen im Arm oder der Atmung bedingen (1-3;82;113). Neurogene Blasenstörungen mit Harnverhalt, hervorgerufen durch eine Verengung im Bereich der Lendenwirbelsäule, werden ebenfalls berichtet (114;115).

### **1.3.8 Herz**

Eine Herzbeteiligung mit mindestens einem kardiovaskulären Anzeichen oder Symptom liegt bei 82% der M. Hunter-Patienten vor und gilt bei allen Patienten als eine der Haupt-Todesursachen (18;81;85;86). Bereits vor dem fünften Lebensjahr gibt es erste Anzeichen einer Herzbeteiligung (6;116). Laut einer Studie von 2011 von Kampmann et al. liegt bei 63% der Patienten eine Klappenbeteiligung vor, die im Mittel bereits mit 5,8 Jahren beginnt (116). Dabei sind vorwiegend die Mitralklappe und Aortenklappe betroffen (3;117). Die Einlagerung der Glykosaminoglykanen führt in den Klappen zu Insuffizienzen und/oder Stenosen (6;116;118). Die fehlerhaften Klappen bedingen schließlich eine Volumenüberlastung des Herzens, die wiederum zu einer linksventrikulären Dilatation, anschließend zu einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH) und zuletzt zu einer systolischen und diastolischen Herzinsuffizienz führt (117). Die linksventrikuläre Hypertrophie zeigte sich bei 48% der Patienten (116). Weitere kardiovaskuläre Manifestationen des Hunter Syndroms sind die Kardiomyopathie, abnorme Herzfrequenzen, Arrhythmien, Hypertension und eine Verengung der Herzerarterien (18;116;117).

## 1.4 Therapie

Bis zur Zulassung der Enzyersatztherapie im Jahr 2007 erfolgte die Behandlung palliativ und war auf die Therapie der Symptome ausgerichtet (2). Verschiedene Behandlungsansätze wie Fibroblasten- oder Leukozytentransplantation, Serum – oder Plasmainfusionen und Gentherapie wurden in der Vergangenheit versucht, um das fehlende Enzym zu ersetzen (2;119-124). Die hämatopoetische Stammzelltransplantation oder Knochenmarkstransplantation – für Morbus Hurler/Hurler-Scheie/Scheie mit klinischen Verbesserungen verbunden – zeigte jedoch für M. Hunter keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Klinischen Studien dazu existieren bisher nicht (2;125-132).

### 1.4.1 Symptomatische Therapie

Die Behandlung und Betreuung der M. Hunter-Patienten erfordert aufgrund der hohen Variabilität ein multidisziplinäres Konzept mit einem Team aus mehreren Spezialisten, wie Pädiater, Neurologen, Hals-, Nasen-, Ohrenärzte, Chirurgen, Orthopäden, Augenärzte, Kardiologen, Rheumatologen, Dermatologen, Physiotherapeuten, Logopäden, Phoniater/Pädaudiologen, Neurochirurgen, Anästhesisten, Pneumologen sowie Psychologen (5;6;133). Nach jeder Erstdiagnose sollte der Patient in regelmäßigen Abständen zu Kontrolluntersuchungen in einem erfahrenen Zentrum für diese Stoffwechselerkrankung vorstellig werden. Den Familienmitgliedern sollte eine genetische Beratung angeboten werden, und ein Austausch mit anderen betroffenen Patienten und deren Angehörigen in Selbsthilfegruppen kann ebenfalls hilfreich sein (5). Eine begleitende und umfangreiche symptomatische Therapie ist bei den Patienten unerlässlich.

Regelmäßige Physiotherapie kann Gelenkkontrakturen vorbeugen (5;54). Auch die prothetische Chirurgie kann hier eine Rolle spielen (82). Eine regelmäßige Überprüfung der Herzbeteiligung ist ebenfalls angezeigt. Liegt eine Klappendysfunktion vor, so sollte vor jedem Eingriff oder Zahnbehandlung eine prophylaktische Antibiotikatherapie zur Endokarditisprophylaxe erfolgen (5;6;54). Auch von dem bei M. Hunter selten angewendeten Verfahren des Klappenersatzes gibt es Fallberichte (82;116;117;134-136). Bei Herzinsuffizienz kommen Digitalispräparate und Diuretika zum Einsatz (6). Bei Hypertension sind Antihypertensiva angezeigt (54;116). Zur Minderung der Obstruktion der Atemwege werden häufig eine Adenoidektomie und Tonsillektomie durchgeführt, die aufgrund der Progression der

Krankheit nur eine zeitlich begrenzte Erleichterung der Symptome bringt (5;54). Als nachfolgende Schritte benötigen einige M. Hunter-Patienten eine CPAP- oder BiPAP- Beatmung (Continuous Positive Airway Pressure oder Bilevel Positive Airway Pressure) zur Aufrechterhaltung ihrer Durchgängigkeit der Atemwege für die Schlafphasen (54;106;107;137). Als letzte Möglichkeit wird die Tracheotomie angesehen, die häufig mit Komplikationen behaftet ist (54;106). Auch das Einbringen eines Tracheal-Stents kann erforderlich sein. Die Operation stellt jedoch einen komplizierten Eingriff dar (54;138). Um pneumologische Komplikationen zu vermeiden, sollten die Patienten alle Impfungen, inklusive Pneumokokken und die jährliche Grippeimpfung, erhalten. Infektionen der oberen Atemwege sollten aggressiv und so schnell als möglich antibiotisch behandelt werden. Inhalative Bronchodilatoren können die Sekretmobilisation zusätzlich zu Atemtherapien erleichtern (107). Ergüsse im Mittelohr tragen bei M. Hunter zu dem häufig auftretenden Hörverlust bei (6;100). Die Einlage von Paukenröhrchen kann hierfür eine Entlastung bringen und die Hörfähigkeit verbessern (5;6). Eine Hörgeräteversorgung ist ebenfalls bei vielen M. Hunter-Patienten indiziert (6;54). Die bei vielen Patienten vorkommenden Hernien und das Karpaltunnelsyndrom bedürfen einer operativen Versorgung, die zu einer klinischen Verbesserung der Symptome führt (5). Schwer betroffene Patienten leiden häufig an tonisch-klonischen Anfällen, die jedoch mit Antiepileptika behandelbar sind, und Hyperaktivität, die nicht auf Methylphenidat anspricht (82;86). Shuntimplantationen sind bei Vorliegen eines Hydrozephalus indiziert, um den Hirndruck zu senken (5;6). Bei Sehstörungen kann eine Brille notwendig werden und eine Sprachtherapie kann die Kommunikationsfähigkeit verbessern (5;73).

## 1.4.2 Enzymersatztherapie



**Abbildung 6: Elaprase®-Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung**

(Mit freundlicher Genehmigung von Shire Deutschland GmbH)

Die Enzymersatztherapie (ERT) erfolgt mit rekombinanter Idursulfase, die in einer humanen Zelllinie produziert wird (2;139). Idursulfase weist ein Glykosylierungsprofil entsprechend dem physiologischen Enzym auf. Das aus 525-Aminosäuren bestehende Glykoprotein beinhaltet acht N-gebundene Glykosylreste. Mannose-6-Phosphat-(M6P-)Reste an den Oligosaccharid-Ketten ermöglichen die spezifische Bindung des Enzyms an die M6P-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Über die Bindung kommt es zu einer zellulären Internalisierung des Enzyms, einer Aufnahme in die Lysosomen und der anschließenden GAG Katabolisierung (2;139). Seit 2007 ist Idursulfase unter dem Namen Elaprase® (Hersteller: Shire Human Genetic Therapies, Lexington, MA, USA) in der Europäischen Union von der EMA zugelassen. Indiziert ist Elaprase® zur Langzeitbehandlung von Patienten mit Hunter-Syndrom und wird einmal wöchentlich in einer Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht als intravenöse Infusion über einen Zeitraum von drei Stunden appliziert. Die Infusionszeit ist auf eine Stunde reduzierbar, wenn keine infusionsbedingten Reaktionen beobachtet werden (2;139). Die Zulassung basiert auf einer randomisierten, plazebokontrollierten, doppelblinden klinischen Studie von Muenzer et al., die einen klinischen Nutzen für die mit Elaprase® behandelten Patienten

zeigte (140). 96 Patienten erhielten entweder Placebo oder Elaprase<sup>®</sup> einmal wöchentlich oder jede zweite Woche. Nach einem Jahr Behandlung zeigte sich bei den Verumpatienten eine signifikante Verbesserung des primären Endpunkts, der sich aus dem 6-Minuten-Gehtest und der forcierten Vitalkapazität (FVC) in Prozent vom Sollwert zusammensetzte. Der zusammengesetzte primäre Endpunkt basiert auf der Summe der Rangfolge der Veränderungen von Studienbeginn bis Woche 53. Bei der wöchentlich behandelten Gruppe zeigte sich die Verbesserung deutlicher als bei der Gruppe, die das Enzym alle zwei Wochen erhielt. Auch die Leber- und Milzvolumina und die GAG Ausscheidung im Urin nahmen im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ab. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung hinsichtlich der allgemeinen Gelenkbeweglichkeit; nur die Ellenbogen-Mobilität zeigte in der wöchentlichen Elaprase<sup>®</sup>-Gruppe eine signifikante Verbesserung. Elaprase<sup>®</sup> wurde im Allgemeinen gut vertragen. Die meisten Nebenwirkungen waren von leichter bis mäßig schwerer Natur (140). Die häufigsten Reaktionen, die im Zusammenhang mit der Infusion standen, waren Hautreaktionen (Ausschlag, Pruritus, Urtikaria), Pyrexie, Kopfschmerzen, Hypertonie und Rötung (139). Im Anschluss an die Zulassungsstudie erfolgte eine zweijährige offene Anschlussstudie, deren Ergebnisse 2011 veröffentlicht wurden. Die absolute forcierte Vitalkapazität war signifikant verbessert, nicht jedoch die forcierte Vitalkapazität in Prozent vom Sollwert. Auch eine statistisch signifikante Erhöhung der Gehstrecke des 6-Minuten-Gehtest wurde an den meisten Messzeitpunkten beobachtet. Leber- und Milzvolumina und die GAG Ausscheidung im Urin zeigten ebenso eine anhaltende Reduktion. Die Gelenkbeweglichkeit in der Schulter wies eine Verbesserung auf, die anderen Gelenke waren bezüglich ihrer Beweglichkeit stabil. Die Ausführung alltäglicher körperlicher Tätigkeiten zeigte eine signifikante Verbesserung, gemessen über den CHAQ Fragebogen (Childhood Health Assessment Questionnaire) (103). Die Enzymersatztherapie sollte so früh wie möglich nach Diagnosestellung eingeleitet werden (80). Eine Studie von Giugliani et al. 2013 zeigte, dass bei 28 Kindern mit M. Hunter im Alter von 1,4 bis 7,5 Jahren die Daten bezüglich Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit von Elaprase<sup>®</sup> vergleichbar mit den bisher publizierten Ergebnissen bei Patienten  $\geq 5$  Jahren waren (141). Schulze-Frenking et al. zeigte bereits zuvor, dass die ERT einen deutlich größeren Effekt auf das Wachstum bei M. Hunter-Patienten hat, wenn der Therapiestart vor dem zehnten Lebensjahr liegt (142). In einer japanischen Studie mit zehn erwachsenen

Patienten im Alter zwischen 21 und 53 Jahren, die eine milde Form von M. Hunter aufwiesen, zeigte sich, dass auch deutlich ältere Patienten vom Einsatz einer ERT profitieren (103;140;143).

Von den Folgen eines schnellen Therapieabbruchs bei fünf M. Hunter-Patienten berichteten Jurecka et al. 2012. Die Einstellung der ERT führt nicht nur zu einem Verlust der positiven Effekte der ERT, sondern zu einer signifikanten Verschlechterung des klinischen Status des Patienten (144). Vier von fünf Patienten erlitten nach Therapieabbruch rezidivierende Atemwegsinfektionen mit Ateminsuffizienz, Schwierigkeiten beim Laufen und Stehen und Verschlechterung der Gelenkbeweglichkeit. Ein Patient zeigte sogar eine Thrombozytopenie, die einen dreimaligen Krankenhausaufenthalt nötig machte. Ein weiterer Patient starb. Die Autoren empfehlen im Falle einer Beendigung der Therapie ein Ausschleichen der ERT (144;145).

Die Grenzen der ERT zeigen sich in der Behandlung der ZNS-Beteiligung, da das intravenös verabreichte Enzym die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann (3;6;80;146). Es zeigt keinen Einfluss auf die kognitiven Einschränkungen und Verhaltensprobleme bei M. Hunter-Patienten (80;146). Auch scheint keine klinische Verbesserung von Knorpel, Knochen oder Herzklappen durch ERT erreicht zu werden. Einige Symptome sind auch bei Langzeit ERT nicht mehr reversibel (82). Gemäß einem Konsens einer Expertengruppe sollen neuropathisch betroffenen Patienten, die sich nicht im Endstadium der Krankheit befinden, eine ERT ggf. als Therapieversuch über sechs bis zwölf Monate in Absprache zwischen den behandelnden Ärzten und Eltern des Patienten auf Grundlage realistischer Behandlungsziele angeboten werden (146).

### **1.5 Antikörper mit Neutralisationskapazität unter Enzymersatztherapie**

In verschiedenen Studien zu Elaprase<sup>®</sup> wurden die Patienten auf die Entwicklung von Anti-Idursulfase-Antikörpern untersucht (103;140;147). In regelmäßigen Abständen wurden Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin G (IgG) und Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin E (IgE) in Blutproben bestimmt. In einer Phase II/III Studie wurde zusätzlich Immunglobulin M (IgM)-Antikörper bestimmt. Die Messungen wurden von Shire Pharmaceuticals ausgeführt. Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper wurden im Plasma der Patienten mittels eines sogenannten confirmation-specific assay (CSA) detektiert, der auf einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)



basiert. Positive Resultate wurden durch eine Radioimmunpräzipitation (RIP) bestätigt. Der Titer wurde als ganze Zahl angegeben. Wurde die Probe mittels des RIP-Assays negativ getestet, so wurde sie als Antikörper negativ gewertet (103;140;147;148). Die genaue Bestimmungsmethode ist aufgrund von Patentrechten nicht bekannt.

In Phase I/II der klinischen Studie wurden bei sechs von zwölf Patienten zu einem oder mehreren Zeitpunkten IgG-Antikörper gegen Idursulfase gefunden. Jeweils drei Patienten wurden mit der Dosierung von 0,5 mg bzw. 1,5 mg Idursulfase/kg Körpergewicht behandelt. Die Bildung der IgG-Antikörper wurde bei einem Patient bereits nach drei Infusionen detektiert, bei einem weiteren Patient nach fünf Infusionen und bei vier Patienten nach sechs Infusionen. Einer der Patienten kehrte nach einem Jahr Therapie in einen Antikörper negativen Status zurück. Die Reduzierungen der GAG-Ausscheidung im Urin und der Hepatosplenomegalie, die Verbesserungen des 6-Minuten-Gehtests und der forcierten Volumenkapazität in Prozent vom Soll waren vergleichbar mit den Ergebnissen der Antikörper-negativen Patienten. Daraus wurde geschlossen, dass die Antikörperbildung keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der ERT hat. IgE-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper wurde in dieser Studie nicht gefunden (147).

In Phase II/III der klinischen Studie wurden bei jeweils 15 Patienten (47%) der wöchentlich und zweiwöchentlich therapierten Elaprase<sup>®</sup>-Gruppe IgG Anti-Idursulfase-Antikörper gefunden. Die Häufigkeit war in Woche 27 der Studie am höchsten, da zu diesem Zeitpunkt 44% der Patienten positiv auf IgG-Antikörper getestet wurden. Nach 53 Wochen waren nur noch 32% der Patienten Antikörper-positiv. IgM-Antikörper entwickelten sich bei je einem Patienten. Die GAG-Ausscheidung war bei den Antikörper-positiven Patienten um 33% weniger reduziert als bei den Antikörper-negativen Patienten. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Antikörpern und einer Verschlechterung des 6-Minuten-Gehtests, der forcierten Vitalkapazität oder dem Vorkommen von Nebenwirkungen. Wie in der vorangegangenen Studie wurden keine IgE-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper identifiziert (140).

In der offenen Anschlussstudie wurden die Patienten ebenfalls auf vorhandene Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper getestet. 47 Patienten zeigten zu einem beliebigen Zeitpunkt IgG Anti-Idursulfase-Antikörper. Dies entsprach 50% der Patienten. Am En-

de der zweijährigen Anschlussstudie waren bei 23 von 85 Patienten (27%) IgG-Antikörper zu finden. In dieser Studie wurde zusätzlich auf neutralisierende Antikörper geprüft. Ein *in vitro* Enzyminhibitions-Assay und ein Assay zur Bestimmung der Hemmung der Zellaufnahme von Idursulfase, erfolgte sobald eine IgG-positive Probe gefunden wurde (149;150). Die genaue Bestimmungsmethode ist aufgrund von Patentrechten nicht bekannt. Bei der Messung mittels des Enzyminhibitions-Assays wurde eine Hemmung von  $\geq 40\%$  als positiv für neutralisierende Antikörper definiert. Ebenfalls als positiv für neutralisierende Antikörper wurde eine Reduktion der Zellaufnahme von Idursulfase um mindestens 23% im Vergleich zu gepooltem Normalserum gewertet. 22 der 94 Patienten (23%) wiesen zu irgendeinem Zeitpunkt innerhalb der Studie neutralisierende Antikörper auf. Nach 105 Wochen traf dies für 19 von 85 Patienten (22%) zu. Die neutralisierenden Antikörper verminderten den Anstieg der absoluten forcierten Vitalkapazität im Vergleich zu den Patienten ohne neutralisierende Antikörper. Sie zeigten jedoch keine Effekte auf den 6-Minuten-Gehtest, Leber- und Milzvolumina und GAG-Ausscheidung im Urin. Wie in den beiden vorangegangenen Studien wurde keine IgE-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper identifiziert (103).

Eine Reevaluation der Studienergebnisse der Phase II/III und Anschlussstudie ergab für 32 der 63 Patienten (51%) bei mindestens einer Blutabnahme IgG-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper (148). Neun Patienten (14%) zeigten diese nur intermittierend oder isoliert; 23 Patienten (37%) entwickelten diese jedoch persistierend (an drei oder mehr aufeinanderfolgenden Blutuntersuchungen). 13 Patienten (21%) wurden positiv auf neutralisierende Antikörper getestet und acht Patienten (13%) zeigten persistierende neutralisierende Antikörper. Als positiv für persistierende neutralisierende Antikörper galten Patienten, die an drei oder mehr aufeinanderfolgenden Blutuntersuchungen neutralisierende Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper aufwiesen, unabhängig vom Ergebnis bei weiteren Blutabnahmen (148).

Alle 32 Patienten entwickelten die IgG-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper innerhalb der ersten 17 Wochen nach Therapiebeginn. Bei 23 Patienten entwickelten sich persistierende Antikörper innerhalb von 16 Wochen Patienten bei nach Therapiebeginn. Neutralisierende Antikörper traten innerhalb von 77 Wochen und persistierende neutralisierende Antikörper innerhalb von 70 Wochen nach dem Start der Enzyersatztherapie auf. Patienten wurden als positiv für neutralisierende Antikörper gewertet, wenn entweder der Enzyminhibitions-Assay oder der Assay mit dem Hemmung

der Zellaufnahme von Idursulfase gemessen wurde, positiv für neutralisierende Antikörper ausfiel (148).

Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von therapiebedingten oder schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen und dem Vorhandensein von (neutralisierenden) Antikörpern identifiziert (148).

Allerdings korrelierten höhere Raten an infusionsbedingten unerwünschten Ereignissen mit der Entwicklung von ERT Antikörpern noch vor dem Antikörpernachweis. Patienten, die nie Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper entwickelten, zeigten die geringsten Ereignisraten. Es folgten die Patienten, die IgG-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörper entwickelten und die Patienten mit persistierenden Antikörpern. Eine noch höhere Ereignisrate von infusionsbedingten unerwünschten Ereignissen war bei Patienten mit neutralisierenden Antikörpern zu verzeichnen. Die höchste Ereignisrate zeigte sich jedoch bei Patienten mit persistierenden, neutralisierenden Antikörpern. Sie lag etwa siebenmal so hoch wie die der Antikörper-negativen Patienten (148).

Sowohl bei Patienten mit neutralisierenden als auch mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern zeigte sich eine Tendenz, dass neutralisierende Antikörper das Risiko zum Auftritt einer infusionsbedingten Reaktion erhöhen. Eine Analyse des Genotyps für die 36 Patienten zeigte, dass Patienten mit Nonsense-oder Frameshift-Mutationen eine statistisch erhöhte Wahrscheinlichkeit hatten Antikörper oder sogar neutralisierende Antikörper und infusionsbedingte Reaktionen zu entwickeln. Eine signifikante Reduktion der GAG-Ausscheidung wurde bei allen Patienten nach Therapiestart beobachtet, jedoch war die Reduktion bei Antikörper-positiven Patienten im Vergleich zu den Antikörper-negativen Patienten schwächer ausgeprägt. Barbier et al. berichteten, dass Patienten mit einer Nonsense-oder Frameshift-Mutation eine signifikant weniger stark reduzierte GAG-Ausscheidung im Urin aufwiesen als Patienten mit Missense-Mutationen. Sie erklärten die Korrelation von Nonsense-oder Frameshift-Mutation und Antikörperbildung damit, dass diese Patienten außerstande sind eine Restmenge von antigen-intaktem IDS herzustellen. Patienten mit Missense-Mutationen können katalytisch mangelhaftes, aber antigen-intaktes Enzym produzieren, was das Risiko der Immunreaktion gegen Elaprase<sup>®</sup> reduziert (148).

Es wurde auch in dieser Analyse kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Antikörpern und der Änderung der Distanz im 6-Minuten-Gehtest, der forcier-

ten Vitalkapazität in Prozent vom Soll und der Leber- und Milzvolumina gesehen. Einzig die Patienten mit neutralisierenden Antikörpern zeigten eine statistisch signifikante, verminderte Reduktion des Lebervolumens im Vergleich zu Patienten ohne neutralisierende Antikörper (148).

Auch bei ERT für andere Erkrankungen wurde eine Antikörperbildung beobachtet (151-158). Sowohl bei Patienten mit Hurler-, Scheie- oder Hurler-Scheie-Syndrom (MPS I) als auch bei Patienten mit Maroteaux-Lamy-Syndrom (MPS VI) entwickelten sich Antikörper gegen das substituierte Enzym (152-154;158). Bei Patienten mit Hurler-, Scheie- oder Hurler-Scheie-Syndrom zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Antikörpern und einer verringerten Wirksamkeit der ERT und unerwünschten Ereignissen (154;158). Die bei Morbus Maroteaux-Lamy aufgetretenen Antikörper scheinen partiell die Wirksamkeit der ERT zu beeinflussen. In einer Studie von Harmatz et al. wurde von einer verminderten Reduktion der GAG-Ausscheidung berichtet (153). Auch Morbus Gaucher-Patienten entwickeln teilweise IgG-Antikörper, deren Einfluss auf die Wirksamkeit noch unklar ist (156;159). Antikörper gegen das substituierte Enzym treten auch bei Fabry-Patienten auf (151;155;157). Sie werden als nicht-neutralisierend und die Wirksamkeit der ERT nicht zu beeinflussend beschrieben (151;155). Im Unterschied dazu berichteten Vedder et al., dass nach 12 bzw. 24 Monaten der ERT die Reduktion des Enzymsubstrates im Urin von Patienten mit Nachweis von Antikörpern geringer ausfällt als bei Patienten ohne Antikörper (160;161). Die Antikörperbildung war jedoch nicht mit schlechteren Ergebnissen relevanter klinischer Endpunkte assoziiert (160). Bénichou et al. stellten fest, dass es bei M. Fabry-Patienten mit einem hohen Antikörpertiter zu einer Substratablagerung in Endothelzellen der Haut kommen kann. Dies kann als Hinweis auf eine reduzierte Clearance des Substrats gewertet werden (162). Zu einem ähnlichen Resultat kommen Linthorst et al., indem sie bei 11 von 16 untersuchten M. Fabry-Patienten hohe IgG-Titer mit Neutralisationskapazität zeigten. Damit assoziiert war eine geringere Reduktion der Substratausscheidung im Urin (163).

Auch bei Morbus Pompe wurde von Antikörpern gegen die Enzymersatztherapie berichtet, die zum Teil neutralisierender Natur sind und bereits erreichte motorische Verbesserungen wieder rückgängig machen können (164;165). In einem Fallbericht über einem Morbus Pompe-Patienten mit Antikörperbildung erlitt dieser ein nephrotisches Syndrom unter ERT, welches nach Reduzierung der ERT-Dosis

reversibel war. Eine histologische Untersuchung des Nierengewebes ergab, dass sich Immunkomplexe, die das substituierte Enzym beinhalteten, abgelagert hatten (166).

Eine vergleichbare Konstellation zum Zusammenhang zwischen Mutation, Restproteinproduktion, Immunreaktion und neutralisierenden Antikörpern liegt bei Patienten mit Gerinnungsfaktormangel vor (167). Für Faktor VIII- und Faktor IX-Mangel gilt, dass je größer das Ausmaß der genetischen Mutation und desto geringer die nachweisbaren Mengen an Restprotein sind, je höher ist die Konzentrationen der (neutralisierenden) Antikörper gegen das substituierte Enzym (167-169). Vries et al. beschrieben jedoch für einen Patienten mit M. Pompe eine messbare Konzentration an katalytisch aktivem Enzym und dennoch hohe Titer von neutralisierenden Antikörpern. Diese reduzierten die Zellaufnahme des Enzyms um etwa 40% und besitzt somit Potential die Wirksamkeit der ERT zu beeinträchtigen (170).

Betrachtet man die Literatur bzgl. der Auswirkungen der Antikörper mit Neutralisationskapazität unter Enzymersatztherapie, zeigt sich ein sehr heterogenes Bild und es bleibt unklar, inwieweit die Wirksamkeit der langjährigen Enzymersatztherapie, dadurch beeinträchtigt wird.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Für Patienten, die an M. Hunter (MPS II) erkrankt sind, besteht seit 2007 die Therapieoption einer Enzyersatztherapie (ERT). Einige Patienten entwickeln Antikörper gegen das substituierte Enzym, welche partiell neutralisierende Eigenschaften besitzen. Da die Antikörper die Aktivität des substituierten Enzyms und damit deren Nutzen, beeinträchtigen können, ist es essentiell zu klären, ob die klinische Effektivität der ERT durch die entwickelten Antikörper eingeschränkt ist. Bisher publizierte Untersuchungen zeigen ein sehr heterogenes Bild bezüglich der Auswirkungen der Antikörper mit Neutralisationskapazität unter Enzyersatztherapie.

Zielsetzung dieser Arbeit war daher in einer klinischen Studie mit prospektiven und retrospektiven Kohortendesign bei allen M. Hunter-Patienten mit ERT und regelmäßigen Verlaufskontrollen in der Villa Metabolica, der Arbeitsgemeinschaft für Lysosomale Speicherkrankheiten, des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, zu untersuchen, ob mittels einer Enzymaktivitätsmessung im Mischserum von substituierten Patienten und Gesunden die Neutralisationskapazität der gebildeten Antikörper bestimmt werden kann. In Ergänzung dazu sollten die spezifischen Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobuline G und E von Shire Pharmaceuticals bestimmt und der Zusammenhang mit den Ergebnissen des Enzymaktivitäts-Assay im Mischserum geprüft werden.

Die Ergebnisse der *in vitro* Bestimmungen zu den persistierenden Antikörpern mit Neutralisationskapazität sollten anschließend auf eine Einschränkung der Wirkung der ERT, erkennbar durch eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes mit klinischer Bedeutung, geprüft werden. Ob biochemische Parameter oder der klinische Verlauf der Erkrankung durch neutralisierende Antikörper unter ERT beeinflusst wird, sollte anhand folgender Parameter untersucht werden:

- Glykosaminoglykan-Ausscheidung im Urin
- Relative Wanddicke des linken Ventrikels (RWT)
- Auf die Körperlänge indizierte linksventrikuläre Muskelmasse (LVM\_H)
- Aortenklappen- und Mitralklappeninsuffizienz (AI, MI)
- Aorten- und Mitralstenose (AS, MS)

- Forcierte Vitalkapazität (FVC) in Prozent vom Soll
- Forciertes expiratorisches Volumen ( $FEV_1$ ) in Prozent vom Soll
- Schulterflexion
- Gelaufene Gehstrecke beim 6-Minuten-Gehtest (6MGT)
- Auftreten von infusionsassoziierten Hypersensitivitätsreaktionen
- Zwei Fragen der Kategorie „Greifen/ Fassen“ des validierten Fragebogens des Hunter Outcome Survey (HS-FOCUS)

Bisher existiert für M. Hunter-Patienten keine klinische oder biochemische Messmethode, die eine verlässliche Vorhersage für eine neuropathische Beteiligung bietet. Da die Neuronenspezifische Enolase (NSE) und S-100 bereits in der neurologischen Diagnostik als Marker einer Hirnschädigung eingesetzt werden, sollte untersucht werden, ob sich mittels Messung der NSE und S-100 Rückschlüsse auf eine neuropathische Beteiligung ziehen lassen (171;172).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Studienprotokoll und Materialien**

#### **3.1.1 Studiendesign und Patienten**

Die Patientenstudie wurde in der Villa Metabolica, der Arbeitsgemeinschaft für Lysosomale Speicherkrankheiten, des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Die Studie war als prospektive und retrospektive Kohortenstudie angelegt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz zur Durchführung der Studie wurde erteilt. Die Vorschriften zum Datenschutz wurden beachtet und Löschung der Daten ist zehn Jahre nach Studienende vorgesehen.

Die Studie wurde von Mitte 2011 bis Ende 2013 durchgeführt. Jeder M. Hunter-Patient mit Enzyersatztherapie (ERT), der in der Villa Metabolica medizinisch betreut wurde und der zu regelmäßigen Untersuchungen in die Villa Metabolica kam, wurde die Teilnahme an der Studie angeboten. Auf diesem Wege wurden insgesamt 30 Patienten rekrutiert.

Zur Studienrekrutierung wurden die Patienten bei ihrem ersten Besuch in der Villa Metabolica nach Studienbeginn bezüglich des Studienvorhabens von dem behandelnden Arzt angesprochen und mündlich aufgeklärt.

Jeder Patient erhielt die von der Ethikkommission genehmigte schriftliche Patienteninformation und Einwilligungserklärung, angepasst an das Alter des Patienten. War der Patient zwischen sechs und zwölf Jahre alt, so wurde ihm seine eigene Patienteninformation und Einwilligungserklärung für Sechs- bis Zwölfjährige ausgehändigt (siehe Anhang 3). Zusätzlich wurde seinen Eltern eine Patienten- bzw. Elterninformation und Einwilligungserklärung ausgehändigt (siehe Anhang 4 und Anhang 5). Analog wurde bei den 13- bis 17-jährigen Patienten gehandelt (siehe Anhang 6 und Anhang 7). Bei erwachsenen, neuropathisch betroffenen Patienten wurde die Unterschrift eines Vormundes akzeptiert. Die unterzeichneten Einwilligungserklärungen wurden von dem aufklärenden Arzt gegengezeichnet.

Alle Patienten erhielten während der Studie die übliche medizinische Versorgung. Es wurde lediglich mit dem routinemäßig abgenommenen Blut ein zusätzlicher



Test (Bestimmung der Iduronat-2-sulfatase-Aktivität im Mischserum) durchgeführt. Die routinemäßig erhobenen biochemischen und klinischen Parameter wurden prospektiv als auch retrospektiv erfasst. Tabelle 3 zeigt einen Überblick über die biochemischen und klinischen Parameter mit den optimalen Zeitabständen zwischen den Untersuchungen.

**Tabelle 3: Überblick über die biochemischen und klinischen Parameter mit den optimalen Zeitabständen zwischen den Untersuchungen**

<b>Erhobene biochemische und klinische Parameter</b>	<b>Optimale Zeitabstände zwischen den Untersuchungen</b>
IDS-Enzymaktivität im Serum und Mischserum	6 Monate
Glykosaminoglykan-Ausscheidung im Urin	6 Monate
Kardiologische Parameter <sup>1</sup>	12 Monate
Lungenfunktionsparameter <sup>2</sup>	12 Monate
Gelenkbeweglichkeit (Schulterflexion)	12 Monate
Gehstrecke	6 Monate
Immunreaktionen auf die ERT	6 Monate
Zwei Fragen der Kategorie „Greifen/ Fassen“ des Fragebogens HS-FOCUS	12 Monate

<sup>1</sup> Die kardiologischen Parameter umfassten die relative Wanddicke des linken Ventrikels, auf die Körperlänge indizierte linksventrikuläre Muskelmasse, Aorten- und Mitralklappeninsuffizienz, Aorten- und Mitralklappenstenose.

<sup>2</sup> Die auszuwertenden Parameter der Lungenfunktionsmessungen beinhalteten die Forcierte Vitalkapazität und das Forcierte expiratorische Volumen in einer Sekunde.

Die Ein- und Ausschlusskriterien wurden wie folgt gewählt:

#### Einschlusskriterien

- Neuropathischer oder nicht neuropathischer M. Hunter-Patient unter Enzyersatztherapie (ERT)
- Regelmäßige Untersuchungen in der Villa Metabolica
- Vorliegende unterschriebene Einwilligungserklärung des Patienten bzw. der Eltern

### Ausschlusskriterien

- M. Hunter-Patient ohne ERT
- M. Hunter-Patienten nach Stammzelltransplantation
- Keine regelmäßigen Untersuchungen in der Villa Metabolica
- Keine unterschriebene Einwilligungserklärung des Patienten bzw. der Eltern

### **3.1.2 Entnahme der Blutproben und Aufbereitung**

Alle IDS-Aktivitätsmessungen wurden mit Serum durchgeführt, das mittels Serumseparation aus Blutproben hergestellt wurde. Die Blutproben wurden den Patienten durch das Ärzte- und Pflegeteam der Villa Metabolica entnommen. Die Blutentnahme erfolgte jeweils vor der nächsten Elaprase<sup>®</sup>-Infusion in Serummonovetten der Firma Sarstedt. Die weitere Verarbeitung wurde im Biochemischen Labor der Kinder- und Jugendmedizin durchgeführt. Zur Serumgewinnung wurden die Serummonovetten für fünf Minuten mit 3000 U/min zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde im Anschluss in Rundbodenröhrchen der Firma Becton, Dickinson and Company pipettiert. Wenn die Enzymaktivitätsbestimmung nicht unmittelbar erfolgte, wurden die Proben bei -20° C tiefgefroren und kurz vor der Analyse im Wasserbad bei 37° C aufgetaut. Üblicherweise wurden aus Effizienzgründen jeweils mindestens 3 Blutproben zusammen analysiert.

### **3.1.3 Materialien**

#### **Chemikalien**

Aqua ad iniectabilia (Ampuwa <sup>®</sup> )	Fresenius Kabi Deutschland GmbH Bestellnummer: 1080753 Ch.-B.: 14FM1001
Blei(II)acetat-Trihydrat zur Analyse	Merck KGaA Bestellnummer: 1.07375.0250 Ch.-B.: K26889775024
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth GmbH und Co KG Bestellnummer: 5110.1 Ch.-B.:48789959

Dinatriumhydrogenphosphat wasserfrei	Merck KGaA Bestellnummer: 1065855000 Ch.-B.: 347A835486
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (Dulbecco Puffer)	Sigma-Aldrich Co. Bestellnummer: D8537 Ch.-B.: RNBC8475
Elaprase®	Shire Deutschland GmbH Bestellnummer: 9031 Ch.-B.: TELI06A02
Essigsäure (Eisessig) 100% wasserfrei zur Analyse	Merck KGaA Bestellnummer: 1.00063.1000 Ch.-B.: 103KI5293363
Human-Albumin 20% Behring 50 ml	CSL Behring GmbH Bestellnummer: OBDA505010 Ch.-B.: C8844411E
LEBT (Lysosomal Enzymes purified from Bovine Testis)	Moscerdam Substrates Bestellnummer: M2 Ch.-B.: 10-11
4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -Iduronat-2-sulfat	Moscerdam Substrates Bestellnummer: M2 Ch.-B.: 09-10
Natriumacetat-Trihydrat krist. zur Analyse	Merck KGaA Bestellnummer: 1062655000 Ch.-B.: 9622547
Natriumazid zur Synthese	Merck KGaA Bestellnummer: 8223350100 Ch.-B.: 2302123

Natriumcarbonat wasserfrei	Carl Roth GmbH und Co KG Bestellnummer: A135.1 Ch.-B.: 1711166743
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun 100 ml	B. Braun Melsungen AG Bestellnummer: 3200910 Ch.-B.: 1236388105
Natriumhydrogencarbonat zur Analyse	Merck KGaA Bestellnummer: 1063291000 Ch.-B.: 032K14370529
Triton X-100 100 ml	Merck KGaA Bestellnummer: 1122980101 Ch.-B.: 340ZA4028798

### Materialien

Combitips	Combitips advanced <sup>®</sup> , 25 mL, rot, Eppendorf AG; Bestellnummer 0030089472
Einmalkanülen	Sterican <sup>®</sup> 19 G x 1 ½"; B. Braun Melsungen AG; Bestellnummer 4657799
Einmalpipetten	VWR International GmbH; Bestellnummer 612-1756
Einmalplastikspritzen	BD Discardit <sup>™</sup> II Spritzen; Becton, Dickinson and Company; Bestellnummer 309110
Pipettenspitzen	1) epT.I.P.S <sup>®</sup> Standard, 50 – 1000 µL, 71 mm, blaue Spitzen; Eppendorf AG; Bestellnummer 0030000919 2) epT.I.P.S <sup>®</sup> Standard, 2 – 200 µL, 53 mm, gelbe Spitzen; Eppendorf AG; Bestellnummer 0030000870 3) epT.I.P.S <sup>®</sup> Standard, 0.5 – 20 µL L, 46 mm, hellgraue Spitzen; Eppendorf AG; Bestellnummer 0030000854

Reagiergefäße 1,5 ml aus PP, mit anhängendem PP-Stopfen	Eppendorf Caps; Sarstedt AG; Bestellnummer 72.690.001
Rundbodenröhrchen	BD Falcon™ Round-Bottom Tubes 14 ml; Becton, Dickinson and Company; Bestellnummer 352059
Serummonovetten	S-Monovette Serum-Gel 7,5 ml braun; Sarstedt AG; Bestellnummer 01.1602

### Geräte

Analysenwaage	Analysenwaage Sartorius Talent TE124S-OCE; Sartorius AG
Bechergläser	Duran® Becher, niedrige Form, mit Ausguss, Duran Group  1) 25 ml; Bestellnummer 21 106 14 2) 150 ml; Bestellnummer 21 106 29 3) 250 ml; Bestellnummer 21 106 36
Erlenmeyerkolben	Duran® Erlenmeyerkolben, weithalsig; Duran Group  1) 100 ml; Bestellnummer 21 226 24 2) 1000 ml; Bestellnummer 21 226 54
Fluoreszenz	
Spektralphotometer	Hitachi F-2000 Fluorescence Spectrophotometer
Gefrierschrank	1) Aufbewahrung von Substrat und Proben vor Bearbei- tung: Bosch; Modell nicht bekannt  2) Aufbewahrung der Proben nach Bearbeitung: Kirsch; Model BL 176
Kühlschrank	Bosch; Modell nicht bekannt
Magnetrührer	VMS-C4 advanced; VWR International GmbH; Bestellnummer 442-0661
Magnetrührstäbchen	VWR International GmbH; Bestellnummer 442-4523

Multipette	Multipette plus; Eppendorf AG; Bestellnummer 4981 000.019
pH-Meter	WTW Microprocessor pH Meter pH 537; WTW GmbH
Pipetten	alle Pipetten sind vom Typ Eppendorf Reference®; Eppendorf AG  1) 5 µL, fix, mittelgrau; Bestellnummer 4900000036 2) 10 µL, fix, mittelgrau; Bestellnummer 4900000044 3) 20 µL, fix, gelb; Bestellnummer 4900000117 4) 25 µL, fix, gelb; Bestellnummer 4900000150 5) 50 µL, fix, gelb; Bestellnummer 4900000125 6) 100 µL, fix, gelb; Bestellnummer 4900000133 7) 500 µL, fix, blau; Bestellnummer 4900000516 8) 1000 µL, fix, blau; Bestellnummer 4900000524 9) 0.5 – 10 µL, variabel, mittelgrau; Bestellnummer 4910000018 10) 10 – 100 µL, variabel, gelb; Bestellnummer 4910000042 11) 50 – 200 µL, variabel, gelb; Bestellnummer 4910000093 12) 100 – 1000 µL, variabel, blau; Bestellnummer 4910000069
Präzisionswaage	Präzisionswaage Sartorius Talent TE512-OCE; Sartorius AG
Pulverspatel, mikro	VWR International GmbH; Bestellnummer 231-2323
Schüttler	Vortex 4 basic; IKA-Werke GmbH & CO. KG, Bestellnummer 0004049600
Tischstoppuhr	Junghans; Modell nicht bekannt
Wasserbad	Modell 1003; GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH; Bestellnummer 1003

Zentrifuge Modell 5415C; Eppendorf - Netheler - Hinz GmbH

Zentrifuge (für Serummonovetten)

Heraeus Megafuge 1.0; Thermo Fisher Scientific Inc.;  
Bestellnummer 75003490/01

### **3.1.4 Reagenzienherstellung**

#### **LEBT (Lysosomal Enzymes purified from Bovine Testis)**

Eine Einheit des gefriergetrockneten Enzyms LEBT-M2 wurde aufgetaut und mit 2,2 ml Aqua ad iniectabilia aufgelöst. Das Reagenz wurde zu je 200 µl portioniert und bis zur Verwendung in Eppendorf Caps bei -20° C eingefroren. Bei Bedarf wurden die Eppendorf Caps einzeln aufgetaut.

#### **Pi/Ci-Puffer (double concentrated McIlvains phosphate/citric-acid buffer)**

0,4 M Dinatriumhydrogenphosphat / 0,2 M Citrat-Puffer (pH 4,5) + 0,02% Na-azid

Es wurden 5,678 g Dinatriumhydrogenphosphat eingewogen und mit Aqua ad iniectabilia auf 100 ml aufgefüllt. 4,203 g Citronensäure-Monohydrat wurden gewogen und mit Aqua ad iniectabilia auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend wurden ca. 60 ml Citrat-Puffer vorgelegt und mit der 0,4 M Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung zugegeben bis ein pH-Wert von 4,5 erreicht war. 100 ml der Lösung wurde 20 mg Natriumazid als Pulver zur Konservierung hinzugefügt. Die Lösung wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 2-8° C aufbewahrt.

#### **Stopp-Puffer**

0,5 M Natriumhydrogencarbonat / 0,5 M Natriumcarbonat (pH 10,7) + 0,0025% Triton X-100

Es wurden 4,201 g Natriumhydrogencarbonat eingewogen und mit Aqua ad iniectabilia auf 100 ml aufgefüllt. Es wurden 5,295 g Natriumcarbonat eingewogen und mit Aqua ad iniectabilia auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 100 ml der 0,5 M Natriumcarbonatlösung mit 20 ml der Natriumhydrogencarbonatlösung gemischt, 25 mg Triton X-100 zugegeben, erneut gemischt und der pH-Wert der

Lösung mittels des pH-Meters bestätigt. Die Lösung wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 2-8° C aufbewahrt.

### **Substrat-Lösung 1,25 mM**

1,25 mM 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -Iduronat-2-Sulfatase (4-MU- $\alpha$ -Idu-2S)

5 mg des gefriergetrockneten Substrates 4-MU- $\alpha$ -Idu-2S wurden in 8,3 ml des Substratpuffers gelöst, in verschließbare Eppendorf Caps zu je 200  $\mu$ l portioniert und bei -20° C eingefroren. Bei Bedarf wurden die Eppendorf Caps einzeln aufgetaut.

### **Substratpuffer**

0,1 M Natriumacetat / 0,1 M Essigsäure Puffer (pH 5,0)

10 mM Bleiacetat

1,361 g Natriumacetat-Trihydrat und 379,34 mg Blei(II)acetat-Trihydrat wurden gewogen und in ca. 80 ml Aqua ad iniectionem gelöst. Der pH-Wert des Substratpuffers wurde unter pH-Meter-Kontrolle mit konzentrierter Essigsäure auf pH 5 eingestellt und anschließend mit Aqua ad iniectionem auf 100 ml aufgefüllt. Am Ende wurde der pH-Wert der Lösung mittels des pH-Meters bestätigt.



### 3.2 Bestimmung der Iduronat-2-sulfatase (IDS)-Aktivität im Serum von Morbus Hunter-Patienten

Zur Enzymaktivitätsbestimmung von Iduronat-2-sulfatase (EC-Nr. 3.1.6.13) im Serum von M. Hunter-Patienten wurde die Umsatzrate eines künstlichen Substrates nach der Methode von Voznyi et al. (79) im Biochemischen Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin gemessen. 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -Iduronat-2-Sulfat (4-MU- $\alpha$ -Idu-2S) der Firma Moscerdam Substrates, Oegstgeest diente als künstliches Substrat.

Die Iduronat-2-sulfatase-Aktivitätsbestimmung beruht auf zwei Inkubationsschritten. Im ersten Schritt erfolgt die Desulfatierung von 4-MU- $\alpha$ -Idu-2S durch Iduronat-2-sulfatase innerhalb von vier Stunden. Im Anschluss folgt die Zugabe von  $\alpha$ -Iduronidase, welche  $\alpha$ -Iduronat von 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -Iduronat durch Hydrolyse abspaltet.  $\alpha$ -Iduronidase wird hierbei im Überschuss zugegeben, damit dieser Inkubationsschritt nicht der reaktionslimitierende Faktor ist. Das gebildete 4-Methylumbelliferon (4-MU) lässt sich fluoreszenzphotometrisch messen und die Enzymaktivität im Proben Serum in der Einheit nmol/4h/ml berechnen, welches eine Geschwindigkeit darstellt. Abbildung 7 stellt die Enzymaktivitätsmessung schematisch dar.

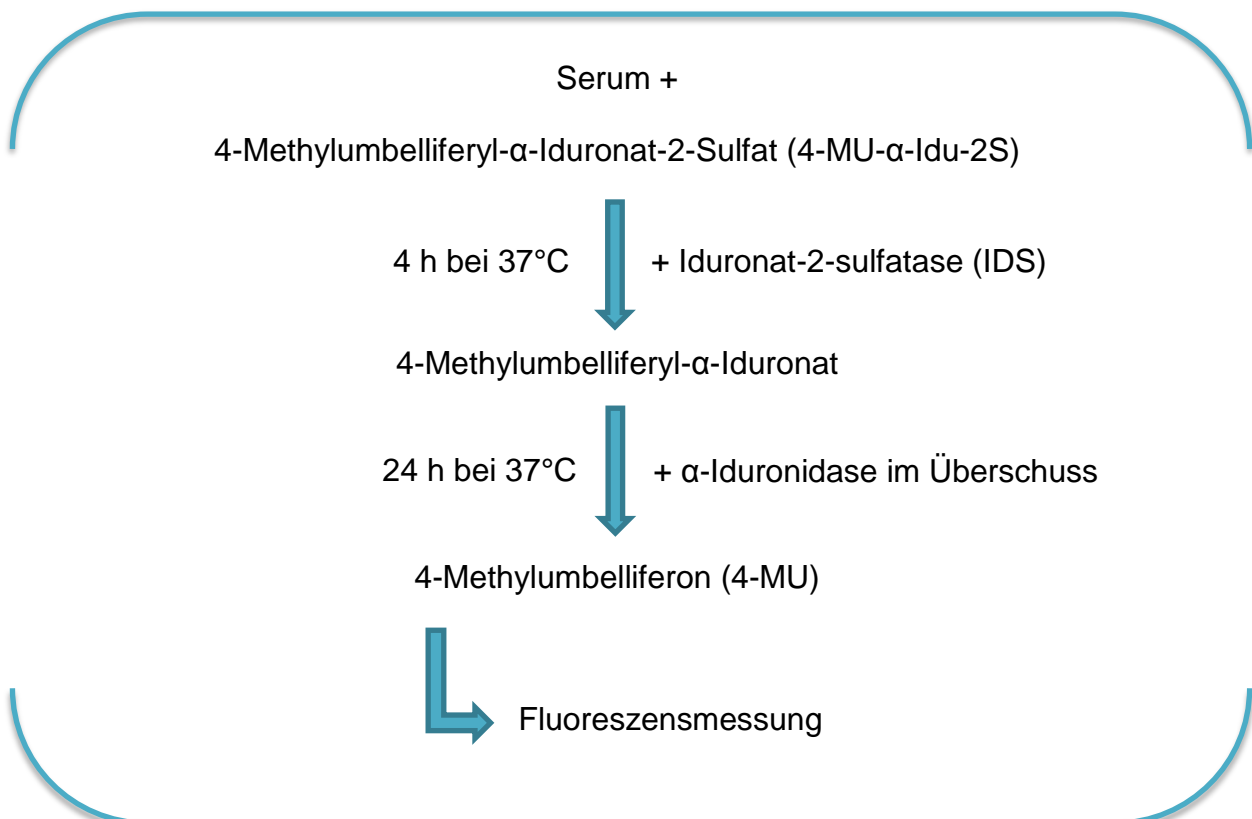


Abbildung 7: Enzymaktivitätsmessung von Iduronat-2-sulfatase nach Voznyi et al. (79)

### **Inkubationsschritt 1**

100 µl des zu untersuchenden Patientenserums wurden mit 400 µl Aqua ad iniectabilia gemischt, was einer Verdünnung von 1:5 entspricht. 10 µl dieser Verdünnung wurden in ein Reagiergefäß (Eppendorf Cap) pipettiert und 20 µl des Substrats (4-MU- $\alpha$ -Idu-2S) zugegeben. In dieser Art wurden jeweils zwei Proben zubereitet. Jedes Eppendorf Cap wurde zehn Sekunden auf den Schüttler gedrückt, um die Durchmischung des 30 µl großen Ansatzes zu gewährleisten. Anschließend wurden alle Reagiergefäße für zehn Sekunden bei 3000 U/min zentrifugiert, damit sich der komplette Ansatz wieder am Boden der Gefäße sammelte. Dann wurden die Proben in einem Wasserbad bei 37°C für vier Stunden inkubiert. Die Inkubationszeit wurde in der Einheit der Enzymaktivität berücksichtigt, da IDS vier Stunden für die Desulfatierung des künstlichen Substrats zur Verfügung stand. Als Nullwert wurden bei jeder IDS-Aktivitätsbestimmung zwei zusätzliche Blindproben mitgeführt. Diese Blindproben beinhalteten kein Serum, sondern 10 µl Aqua ad iniectabilia. Sie wurden in gleicher Weise behandelt wie die zu untersuchenden Serumproben.

### **Inkubationsschritt 2**

Nach Abschluss des Inkubationsschrittes 1 wurde zu jeder Probe 40 µl des Pi/Ci-Puffers pipettiert und anschließend jede Probe zehn Sekunden mit dem Schüttler durchmischt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 10 µl LEBT (Lysosomal Enzymes purified from Bovine Testis), eine zehn Sekunden Durchmischung mittels Schüttler und eine Zentrifugation über zehn Sekunden bei 3000 U/min. Die Proben wurden dann 24 Stunden in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Inkubationsschritt 2 war nötig, damit 4-MU durch  $\alpha$ -Iduronidase freigesetzt wurde.

### **Stoppen der Reaktion und Weiterverarbeitung der Proben**

Nach Inkubation über 24 Stunden wurden die Proben für zehn Sekunden bei 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von jeweils 1 ml Stopp-Puffer in jedes Reagiergefäß beendet. Nach erneutem gründlichem Mischen der Proben mittels Schüttler wurden die Proben fünf Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war am Boden der Eppendorf Caps eine leichte Trübung zu erkennen. Der Überstand wurde vor Messung der Enzymaktivität mittels einer Pipette in ein neues Eppendorf Cap überführt. Bei der

Ausfällung handelt es sich um Bleiausfällungen, die die Messergebnisse beeinträchtigen könnten.

### **Messung der IDS-Aktivität**

In den Überständen der einzelnen Proben, die als Doppelproben vorlagen, wurde an dem Hitachi F-2000 Fluorescence Spectrophotometer die Intensität der Fluoreszenz von 4-MU gemessen. Den Probenbestimmungen ging die Messung der Blindproben voraus. Die Intensität der Blindproben wurde automatisch von der Fluoreszenz der zu vermessenden Proben abgezogen. Der voreingestellte Messbereich (MB 3000) entsprach einer Exzitationswellenlänge von 369 nm und einer Emissionswellenlänge von 446 nm. Die ermittelte Fluoreszenzintensität des 4-MU ist proportional zu der IDS-Aktivität in der Probe. Nach jeder Messung einer Doppelprobe wurde das Gerät mit Aqua ad iniectabilia gespült.

Zur Berechnung der IDS-Aktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$\begin{aligned} & \text{IDS – Aktivität [nmol/4h/ml]} \\ & = \frac{\text{Mittelwert der IDS – Aktivität der Doppelproben (nmol/l)} \times \text{Gesamtvolumen } (\mu\text{l})}{1000 \times \text{Serum } (\mu\text{l})} \end{aligned}$$

Gesamtvolumen der Probe = 1080  $\mu\text{l}$ , = 10  $\mu\text{l}$  zu untersuchendes Serum

4 h = Inkubationszeit in Inkubationsschritt 1

Daraus folgt:

$$\begin{aligned} & \text{IDS – Aktivität [nmol/4h/ml]} \\ & = \text{Mittelwert der IDS – Aktivität der Doppelproben (nmol/l)} \times 0,108 \end{aligned}$$

Anschließend wurden die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung mit 5 multipliziert, um die Verdünnung der Probe im ersten Inkubationsschritt einzubeziehen.

### **Qualitätssicherung der IDS-Aktivitätsmessung im Serum**

Das Biochemische Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin nimmt an dem ERNDIM für Lysosomale Enzyme teil. ERNDIM steht hierbei für European

Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism. Neben den regelmäßigen internen Qualitätsprüfungen beteiligt sich das Biochemische Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin seit 2009 regelmäßig und erfolgreich an externen Testreihen für ERNDIM zur Qualitätssicherung der biochemischen Verfahren. 2012 war die Bestimmung der IDS-Enzymaktivität Teil der Testreihe. Anhang 8 zeigt das Zertifikat des Jahres 2012 für die IDS-Enzymaktivitätsmessung und belegt die zuverlässige Durchführung der Qualität dieser Bestimmungsmethode im Biochemischen Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin.

### **Validierung der Bestimmung der IDS-Aktivität im Serum**

Der Assay nach Voznyi et al. wurde im Biochemischen Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin in der Universitätsmedizin Mainz validiert. Die Validierung ergab - in Analogie zu der Arbeit von Voznyi et al. - eine optimale Inkubationsdauer in Inkubationsschritt 1 von vier Stunden und einen optimalen Serumgehalt von 10 µl pro Ansatz bei der Messung der IDS-Enzymaktivität im Serum (79;173). Bei der Validierung der Lagerungs- und Temperaturstabilität im hiesigen Biochemischen Labor zeigten sich nur leicht schwankende IDS-Aktivitäten im Serum bei Raumtemperaturlagerung über 30 Tage. Die niedrigste Aktivität wurde hierbei am Tag mit der niedrigsten Raumtemperatur und die höheren IDS-Aktivitäten an Tagen mit höheren Raumtemperaturen gemessen (173). Parkinson-Lawrence et al. zeigten in einer Arbeit die Stabilität der IDS-Aktivität bis 50°C. Erst oberhalb dieser Temperatur nahm die Enzymaktivität stetig ab, bis hin zu einem vollständigen Aktivitätsverlust oberhalb von 70°C (174). Eine Temperaturstabilität der IDS im tiefgefrorenen Serum wurde im hiesigen Biochemischen Labor ebenfalls getestet. Eine Langzeitlagerung des Serums ist für ein Jahr im gefrorenen Zustand ohne Enzymaktivitätsverluste möglich (173). Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  von IDS für 4-MU- $\alpha$ -Idu-2S wurde im Rahmen der Validierung untersucht und entspricht 0,6 mmol/l (173).

### **Normalwerte der IDS-Aktivität im Serum gesunder männlicher Personen**

Die Normalwerte der IDS-Aktivität im Serum gesunder männlicher Probanden wurden in der Validierung des Assays nach Voznyi et al. im Biochemischen Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin an 37 Probanden untersucht. Der

Median entsprach hierbei 350,7 nmol/4h/ml. Die Enzymaktivität weist bei gesunden Personen eine hohe Streubreite auf. Der Minimalwert betrug 169,3 nmol/4h/ml und der Maximalwert 540,5 nmol/4h/ml (79;173).

### 3.2.1 Bestimmung der IDS-Aktivität im Mischserum von Morbus Hunter-Patienten (Neutralisationskapazität)

Unter Neutralisationskapazität versteht man das Ausmaß an gebildeten Antikörpern unter ERT, die IDS neutralisieren. Die Bestimmung einer potentiell vorhandenen Neutralisationskapazität für IDS bei M. Hunter-Patienten kann gemessen werden durch Bestimmung der IDS-Aktivität im Mischserum von M. Hunter-Patienten. Diese erfolgte in Analogie zur unter 3.2 beschriebenen Enzymaktivitätsmessung von IDS. Die Bestimmung der Neutralisationskapazität erfolgte üblicherweise alle 6 Monate im Rahmen der routinemäßigen Verlaufskontrollen der M. Hunter-Patienten.

Anstelle von 100 µl Patientenserum wurden 50 µl Patientenserum und 50 µl Serum einer gesunden Person verwendet. 100 µl Mischserum wurden in die Reagiergefäße pipettiert und die zweifache Bestimmung der Enzymaktivitätsmessung wie in 3.2 beschrieben, durchgeführt. Das Testserum der gesunden Person wurde immer von derselben Person gewonnen. Im Serum der gesunden Person lag eine normale IDS-Aktivität vor. Sie wurde bei jeder Messung der Neutralisationskapazität zusätzlich zweifach bestimmt. Ebenso wurde parallel die IDS-Aktivität von jedem Patient in dessen reinem Serum zweifach bestimmt.

Aus den Ergebnissen der IDS-Aktivitätsbestimmung im Mischserum wurde wie folgt der prozentuale Anteil der Ist-von Soll-IDS-Aktivität und die Neutralisationskapazität berechnet:

Prozentualer Anteil der Ist – von Soll – IDS – Aktivität [%]

$$= \frac{\text{IDS – Aktivität im Mischserum} \times 100}{[(\text{IDS – Aktivität im Patientenserum} + \text{IDS – Aktivität im Serum der gesunden Person}) \div 2]}$$

Neutralisationskapazität [%]

$$= 100 \% - \text{Prozentualer Anteil der Ist – von Soll – IDS – Aktivität}$$

Eine um  $\geq 40\%$  verminderte IDS-Aktivität der rechnerisch zu erwartenden IDS-Aktivität wurde als reduziert gewertet und entspricht einer Neutralisationskapazität  $\geq 40\%$  der gebildeten Antikörper (103). Die Neutralisationskapazität kann keine negativen Werte annehmen.

### 3.2.2 Validierung der Neutralisationskapazitätsbestimmung und der Einfluss der Verdünnungslösung

#### Validierung der Bestimmung der Neutralisationskapazität

##### Verdünnungsreihe mit Serum von Patient Nr. 26 und Messung der IDS-Aktivität im Mischserum

Eine Validierung der Neutralisationskapazitätsbestimmung erfolgte mittels einer Verdünnungsreihe. Es war nicht möglich, einen Standard mit Antikörpern mit Neutralisationskapazität zu erhalten. Daher wurde ein Patientenserum zur Validierung ausgewählt, das in den vorangegangenen fünf Neutralisationskapazitätsbestimmungen jeweils um  $> 74\%$  verminderte IDS-Aktivität von der rechnerisch zu erwartenden Aktivität ergeben hatte.

Folgende Verdünnungsreihe wurde in Eppendorf Caps hergestellt:

**Tabelle 4: Verdünnungsreihe mit Serum von Patient Nr. 26 und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung**

Bezeichnung	Prozentualer Anteil an Patientenserum [%]	Volumen Patientenserum [ $\mu\text{l}$ ]	Volumen Aqua ad iniectabilia [ $\mu\text{l}$ ]
S1	80	80	20
S2	60	60	40
S3	40	40	60
S4	20	40	160
S5	15	75 aus S4	25
S6	10	50 aus S4	50
S7	100	100	-

Jeweils 50 µl von S1 – S6 wurden mit 50 µl Serum eines gesunden Menschen gemischt und die IDS-Aktivität, wie in 3.2.1 beschrieben, bestimmt bzw. die Neutralisationskapazität berechnet.

S7 entsprach dem Ansatz einer regulären IDS-Aktivitätsbestimmung im Mischserum und beinhaltete demnach 50 µl Serum von Patient Nr. 26 und 50 µl Serum einer gesunden Person.

Alle Proben wurden als Vierfachproben angesetzt. Alle Proben enthielten 50 µl Serum der gleichen gesunden Person mit der gleichen Enzymaktivität. Die zu bestätigenden Hypothese lautete, dass je mehr Patientenserum und somit Antikörper mit Neutralisationskapazität im Mischserum vorhanden war, desto stärker sollte die Enzymaktivität des Gesunden beeinträchtigt sein. Die IDS-Aktivität des gesunden Individuums wurde parallel vierfach bestimmt.

Zusätzlich wurde ein Blindwert ohne Serum und demnach ohne IDS-Aktivität in Doppelproben mitgeführt.

#### Verdünnungsreihe mit Serum von Patient Nr. 23 und Messung der IDS-Aktivität im Mischserum

Der oben beschriebene Versuch einer Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Neutralisationskapazität wurde in gleicher Art mit Patientenserum von Patient 23 durchgeführt (genaue Beschreibung s. oben). In drei vorangegangenen Untersuchungen von Patient 23 wurde jeweils um > 75% verminderte IDS-Aktivität von der rechnerisch zu erwartenden Aktivität gemessen.

Folgende Verdünnungsreihe wurde in Eppendorf Caps hergestellt:

**Tabelle 5: Verdünnungsreihe mit Serum von Patient Nr. 23 und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung**

Bezeichnung	Prozentualer Anteil an Patientenserum [%]	Volumen Patientenserum [ $\mu$ l]	Volumen Aqua ad iniectabilia [ $\mu$ l]
S1	80	80	20
S2	60	60	40
S3	40	40	60
S4	20	40	160
S5	15	75 aus S4	25
S6	10	50 aus S4	50
S7	100	100	-

### **Einfluss der Verdünnungslösung auf die IDS-Aktivität**

Um den Einfluss der Verdünnungslösung zu untersuchen wurden vier unterschiedliche Experimente an vier unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

#### 1. Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität von Serum eines gesunden Menschen und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung

Die Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität wurde mit Serum des gesunden Menschen und Wasser als Verdünnungslösung durchgeführt.

Folgende Verdünnungsreihe wurde in Eppendorf Caps hergestellt:



**Tabelle 6: Verdünnungsreihe mit Serum eines Gesunden und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung**

Bezeichnung	Prozentualer Anteil an Serum des Gesunden [%]	Volumen Serum des gesunden Menschen [µl]	Volumen Aqua ad iniectabilia [µl]
S1	100	100	-
S2	80	80	20
S3	70	70	30
S4	60	60	40
S5	50	50	50
S6	40	40	60
S7	35	35	65
S8	30	30	70
S9	25	25	75
S10	20	40	160
S11	15	75 aus S10	25
S12	10	50 aus S10	50

Jeweils 100 µl von S1 – S12 wurden mit 400 µl Aqua ad iniectabilia gemischt und die IDS-Aktivität, wie in 3.2. beschrieben, bestimmt.

Alle Proben wurden als Vierfachproben angesetzt. Zusätzlich wurde ein Blindwert ohne Serum und demnach ohne IDS-Aktivität in Doppelproben mitgeführt.

## 2. Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität mit Elaprase<sup>®</sup> und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung

Die Verdünnung des Serums eines Gesunden zeigt sehr geringe Enzymaktivität, deshalb wurde im zweiten Versuch Elaprase<sup>®</sup> in verschiedenen Verdünnungen mit Aqua ad iniectabilia hergestellt und ebenfalls die IDS-Aktivität gemessen.

Elaprase<sup>®</sup> ist ein Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung. Jeder ml enthält 2 mg Idursulfase. Elaprase<sup>®</sup> wird wöchentlich in einer Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht durch intravenöse Infusion gegeben. Die zur Verdünnung benötigte Anzahl Durchstechflaschen, die sich nach dem individuellen Gewicht der Patien-

ten richten, werden in 100 ml einer 0,9%igen Natriumchlorid-Infusionslösung verdünnt (139).

Die für diesen Versuch verwendeten Reste von zwei Ampullen Elaprase® wurden am Tag zuvor in der Villa Metabolica für die Therapie eines Patienten verwendet. Die Ampullen wurden sofort nach dem Anstechen wieder in einen Kühlschrank in der Villa Metabolica gelegt und dort über Nacht gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde die Ampulle direkt aus dem Kühlschrank in das Biochemische Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin getragen und direkt nach dem Eintreffen für den Versuch verwendet.

Folgende Verdünnungsreihe wurde in Eppendorf Caps hergestellt. Die Verdünnungen, die eine Probenbezeichnung erhielten, wurden im Anschluss zur IDS-Enzymaktivitätsmessung verwendet.

**Tabelle 7: Verdünnungsreihe mit Elaprase® und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung**

Bezeichnung der Probe	Verdünnung	Volumen Elaprase® oder Verdünnung	Volumen Aqua ad iniectabilia [µl]
-	1:10	100 µl Elaprase®	900
-	1:100	100 µl von 1:10	900
-	1:1.000	100 µl von 1:100	900
W1	1:8.000	100 µl von 1:1.000	700
W2	1:10.000	100 µl von 1:1.000	900
W3	1:12.500	100 µl von 1:1.000	1150
W4	1:15.000	100 µl von 1:1.000	1400
W5	1:20.000	100 µl von 1:10.000	100
W6	1:30.000	100 µl von 1:10.000	200
W7	1:50.000	100 µl von 1:10.000	400
W8	1:70.000	100 µl von 1:10.000	600
W9	1:90.000	100 µl von 1:10.000	800
W10	1:100.000	100 µl von 1:10.000	900

Jeweils 100 µl jeder Probe W1 – W10 wurden mit 400 µl Aqua ad iniectabilia gemischt und die IDS-Aktivität, wie in 3.2 beschrieben, gemessen.

Alle Proben wurden als Vierfachproben angesetzt. Zusätzlich wurde ein Blindwert ohne Serum und demnach ohne IDS-Aktivität in Doppelproben mitgeführt.

### 3. Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität mit Elaprase<sup>®</sup> und Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung

Im dritten Versuch wurde Elaprase<sup>®</sup> in verschiedenen Volumenverhältnissen mit Dulbecco Puffer verdünnt und die IDS-Aktivität gemessen.

Die für diesen Versuch verwendeten Reste von zwei Ampullen Elaprase<sup>®</sup> wurden am Tag zuvor in der Villa Metabolica für die Therapie eines Patienten verwendet. Die Ampullen wurden sofort nach dem Anstechen wieder in einen Kühlschrank in der Villa Metabolica gelegt und dort über Nacht gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde die Ampulle direkt aus dem Kühlschrank in das Biochemische Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin getragen und direkt nach dem Eintreffen für den Versuch verwendet.

Folgende Verdünnungsreihe wurde in Eppendorf Caps hergestellt. Die Verdünnungen, die eine Probenbezeichnung erhielten, wurden im Anschluss zur IDS-Enzymaktivitätsmessung verwendet.

**Tabelle 8: Verdünnungsreihe mit Elaprase<sup>®</sup> und Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung**

Bezeichnung der Probe	Verdünnung	Volumen Elaprase <sup>®</sup> oder Vorverdünnung	Volumen Dulbecco Puffer [µl]
-	1:10	100 µl Elaprase <sup>®</sup>	900
-	1:100	100 µl von 1:10	900
-	1:1.000	100 µl von 1:100	900
W1	1:10.000	100 µl von 1:1.000	900
W2	1:20.000	100 µl von 1:10.000	100
W3	1:30.000	100 µl von 1:10.000	200
W4	1:50.000	100 µl von 1:10.000	400
W5	1:70.000	100 µl von 1:10.000	600
W6	1:90.000	100 µl von 1:10.000	800

Jeweils 100 µl jeder Probe W1 – W6 wurden mit 400 µl Aqua ad iniectionem gemischt und die IDS-Aktivität, wie in 3.2 beschrieben, gemessen.

Alle Proben wurden als Vierfachproben angesetzt. Zusätzlich wurde ein Blindwert ohne Serum und demnach ohne IDS-Aktivität in Doppelproben mitgeführt.

#### 4. Messung der IDS-Aktivität von Elaprase® 1:10.000 Verdünnung und vier verschiedenen Verdünnungslösungen

Es wurde jeweils eine 1:10.000 Verdünnung von Elaprase® mit unterschiedlichen Verdünnungslösungen hergestellt und die IDS-Aktivität gemessen. Es kamen folgende vier Verdünnungslösungen zum Einsatz:

- Aqua ad iniectabilia
- Dulbecco Puffer
- Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%
- Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% mit Zusatz von 0,2% Humanalbumin

Die für diesen Versuch verwendeten Reste von drei Ampullen Elaprase® wurden am Tag zuvor in der Villa Metabolica für die Therapie eines Patienten verwendet. Die Ampullen wurden sofort nach dem Anstechen wieder in einen Kühlschrank in der Villa Metabolica gelegt und dort über Nacht gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde die Ampulle direkt aus dem Kühlschrank in das Biochemische Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin getragen und direkt nach dem Eintreffen für den Versuch verwendet.

Folgende Verdünnungsreihen mit den unterschiedlichen Verdünnungslösungen wurden in Eppendorf Caps hergestellt. Die Verdünnungen, die eine Probenbezeichnung erhielten, wurden im Anschluss zur IDS-Enzymaktivitätsmessung verwendet.

#### Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung

**Tabelle 9: Verdünnungsreihe mit Elaprase® und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung**

Bezeichnung der Probe	Verdünnung	Volumen Elaprase® oder Vorverdünnung	Volumen Aqua ad iniectabilia [µl]
-	1:10	100 µl Elaprase®	900
-	1:100	100 µl von 1:10	900
-	1:1.000	100 µl von 1:100	900
W1	1:10.000	100 µl von 1:1.000	900

100 µl der Probe W1 wurden anschließend in ein Eppendorf Cap pipettiert die IDS-Aktivität, wie in 3.2 beschrieben, bestimmt.

#### Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung

**Tabelle 10: Verdünnungsreihe mit Elaprase® und Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung**

Bezeichnung der Probe	Verdünnung	Volumen Elaprase® oder Vorverdünnung	Volumen Dulbecco Puffer [µl]
-	1:10	100 µl Elaprase®	900
-	1:100	100 µl von 1:10	900
-	1:1.000	100 µl von 1:100	900
D1	1:10.000	100 µl von 1:1.000	900

100 µl der Probe D1 wurden anschließend in ein Eppendorf Cap pipettiert die IDS-Aktivität, wie in 3.2 beschrieben, bestimmt. Weitere 100 µl der Probe D1 wurden in ein anderes Reagiergefäß gegeben und als Probe D2 gekennzeichnet. Für die 1:5 Verdünnung wurde anstelle von Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung Dulbecco Puffer eingesetzt. Anschließend wurde die IDS-Aktivität in den Proben, wie in 3.2 beschrieben, bestimmt.

#### Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% als Verdünnungslösung

**Tabelle 11: Verdünnungsreihe mit Elaprase® und isotoner Kochsalz-Lösung 0,9% als Verdünnungslösung**

Bezeichnung der Probe	Verdünnung	Volumen Elaprase® oder Vorverdünnung	Volumen Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% [µl]
-	1:10	100 µl Elaprase®	900
-	1:100	100 µl von 1:10	900
-	1:1.000	100 µl von 1:100	900
N1	1:10.000	100 µl von 1:1.000	900

100 µl der Probe N1 wurden anschließend in ein Eppendorf Cap pipettiert die IDS-Aktivität, wie in 3.2 beschrieben, bestimmt. Weitere 100 µl der Probe N1 wurden in ein anderes Reagiergefäß gegeben und als Probe N2 gekennzeichnet. Für die 1:5

Verdünnung wurde anstelle von Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung isotoner Kochsalz-Lösung 0,9% eingesetzt. Anschließend wurde die IDS-Aktivität in den Proben, wie in 3.2 beschrieben, bestimmt.

Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% und Zusatz von 0,2% Humanalbumin als Verdünnungslösung

Das Verdünnungsmittel wurde unmittelbar von Verwendung hergestellt. Hierzu wurden 9,9 ml isotoner Kochsalz-Lösung 0,9% mit 0,1 ml einer 20%igen Humanalbumin-Lösung in einem Becherglas gemischt.

**Tabelle 12: Verdünnungsreihe mit Elaprase® und isotoner Kochsalz-Lösung 0,9% und Zusatz von 0,2% Humanalbumin als Verdünnungslösung**

Bezeichnung der Probe	Verdünnung	Volumen Elaprase® oder Vorverdünnung	Volumen Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% + 0,2% Humanalbumin [ $\mu$ l]
-	1:10	100 $\mu$ l Elaprase®	900
-	1:100	100 $\mu$ l von 1:10	900
-	1:1.000	100 $\mu$ l von 1:100	900
A1	1:10.000	100 $\mu$ l von 1:1.000	900

100  $\mu$ l der Probe A1 wurden anschließend in ein Eppendorf Cap pipettiert die IDS-Aktivität, wie in 3.2 beschrieben, bestimmt. Weitere 100  $\mu$ l der Probe A1 wurden in ein anderes Reagiergefäß gegeben und als Probe A2 gekennzeichnet. Für die 1:5 Verdünnung wurde anstelle von Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung isotoner Kochsalz-Lösung 0,9% und Zusatz von 0,2% Humanalbumin eingesetzt. Anschließend wurde die IDS-Aktivität in den Proben, wie in 3.2 beschrieben, bestimmt.

Alle Proben wurden als Vierfachproben angesetzt und die IDS-Aktivität gemessen. Zusätzlich wurde ein Blindwert ohne Serum und demnach ohne IDS-Aktivität in Doppelproben mitgeführt.

### **3.3 Bestimmung von Anti-Elaprase®-Immunglobulin G und E bei Morbus Hunter-Patienten**

Der Hunter Outcome Survey (HOS) ist eine internationale, multizentrische Langzeitbeobachtungsstudie bei Patienten mit M. Hunter (Mukopolysaccharidose II). Die Anti-Elaprase®-Immunglobulin-Bestimmung ist Teil der Studie. Alle M. Hunter-Patienten der Villa Metabolica haben eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der HOS-Studie gegeben. Bei ihren regelmäßigen Verlaufskontrollen, die üblicherweise halbjährlich stattfanden, wurde daher allen M. Hunter-Patienten Blutproben für die Anti-Elaprase®-Immunglobulin-Bestimmung abgenommen. Die Ergebnisse der Bestimmung von Anti-Elaprase®-Immunglobuline G und E wurden den online einsehbaren Daten der HOS entnommen und mittels den Papierakten der Patienten in der Villa Metabolica überprüft.

#### **3.3.1 Methode der Immunglobulin-Bestimmung**

Die Immunglobulin-Bestimmungen (IgG, IgE) wurden von Shire Pharmaceuticals, wie von Muenzer et al. (140;147) beschrieben, durchgeführt. Anti-Elaprase®-Antikörper wurden im Plasma der Patienten mittels eines sogenannten confirmation-specific assay (CSA) detektiert, der auf einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) basiert. Positive Resultate wurden durch eine Radioimmunpräzipitation (RIP) bestätigt. Der Titer wurde als ganze Zahl angegeben. Wurde die Probe mittels des RIP-Assays negativ getestet, so wurde sie als Antikörper negativ gewertet (148). War die Bestätigung durch die RIP positiv, so wurde gegebenenfalls ein in vitro Enzyminhibitions-Assay durchgeführt, der es ermöglichte die prozentuale Inhibition des Enzyms zu bestimmen, falls neutralisierende Antikörper vorhanden waren (149). Bei der Messung mittels des Enzyminhibitions-Assays wurde eine Hemmung von  $\geq 40\%$  als positiv für neutralisierende Antikörper gewertet (103). Die genaue Bestimmungsmethode unterliegt dem Patentschutz und ist nicht veröffentlicht. Die Resultate der Bestimmung wurden den behandelnden Ärzten der Villa Metabolica schriftlich mitgeteilt und den online einsehbaren Daten der HOS hinzugefügt. Die Ergebnisse wurden in Form einer patientenindividuellen Darstellung der Anti-Elaprase®-Immunglobulin G-Titer im Zeitverlauf nach Beginn der ERT gezeigt, um zu veranschaulichen welche Patienten einen Nachweis von Anti-Elaprase®-Antikörpern aufwiesen.

### **3.4 Bestimmung biochemischer und klinischer Parameter bei Morbus Hunter-Patienten**

Zur Klärung der Frage, ob sich Antikörperbildung negativ auf die Klinik der Patienten auswirkt, wurden biochemische und klinische Parameter bei M. Hunter-Patienten erhoben. Alle ausgewählten Parameter wurden retrospektiv als auch prospektiv ausgewertet. Die Daten wurden sowohl der webbasierten HOS als auch den lokalen Papierakten der Patienten in der Villa Metabolica entnommen.

Einen Überblick über die biochemischen und klinischen Parameter mit den optimalen Zeitabständen zwischen den Untersuchungen wird in Tabelle 3 unter 3.1.1 gezeigt.

Wurde der jeweilige Parameter in patientenindividuellen Verläufen dargestellt und anschließend analysiert ob sich eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung des jeweiligen Parameters unter ERT bezogen auf den Ausgangswert eingestellt hat, so zählten als Ausgangswerte alle Werte bis drei Monate vor Beginn der ERT. Waren innerhalb dieses Zeitintervalls mehrere Werte vorhanden, so wurde der am nächsten zum Beginn der ERT liegende als Ausgangswert gewertet. In Fällen in denen kein Basiswert vorlag, so wurde das Ergebnis der jeweilig ersten Bestimmung als Ausgangswert gewertet. Ob sich die Antikörperbildung negativ auf den jeweiligen Parameter auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

#### **3.4.1 Glykosaminoglykan-Ausscheidung (DMB-Test)**

Die Quantifizierung der Glykosaminoglykan (GAG)-Ausscheidung wurde im Biochemischen Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin nach der Methode von de Jong et al. bestimmt und beruht auf einer Absorptionsverschiebung des Farbstoffes 1,9-Dimethylmethylenblau (DMB) in Gegenwart negativ geladener Gruppen (77). Da GAG eine Vielzahl an negativer Ladung aufweisen, eignet sich die Methode als spezifischer Nachweis. Die GAG-Ausscheidung wurde in mg/mmol Kreatinin angegeben, so dass eine Kreatinin-Bestimmung im Urin notwendig war. Die hierzu verwendete Methode stammt von Jaffé (78). Die GAG-Ausscheidung ist altersabhängig. Die verwendeten oberen Normwerte für die Auswertung finden sich ebenso in der Publikation von de Jong (77) und werden in Tabelle 13 aufgeführt.



**Tabelle 13: Altersabhängige obere Normwerte der GAG-Ausscheidung**

<b>Alter des Patienten bei Probenentnahme [Jahre]</b>	<b>Normwerte der GAG-Ausscheidung [mg/mmol Kreatinin]</b>
0 – 1	27,2
1 – 2	13,4
2 – 4	12,0
4 – 6	8,3
6 – 10	7,7
10 – 15	5,6
15 – 20	3,9
20 – 50	2,4

Die GAG-Ausscheidung im Urin wurde in patientenindividuellen Verläufen dargestellt und analysiert ob sich eine Abnahme, keine Veränderung oder eine Zunahme der GAG-Ausscheidung unter ERT bezogen auf den Ausgangswert eingestellt hat. Die Definition der Ausgangswerte ist in 3.4 beschrieben. Eine Abnahme der GAG-Ausscheidung wurde erreicht, wenn der Patient zu Beginn der ERT GAG-Ausscheidungen im Urin oberhalb des Normwertes zeigte und bei seiner letzten Untersuchung diese unterhalb des Normwertes gefallen waren. Der Patient zeigte keine Veränderung, wenn die GAG-Ausscheidungen sowohl zu Beginn der ERT als auch bei seiner letzten Untersuchung oberhalb des Normwertes lagen. Als Zunahme wurde definiert, wenn der Patient zu Beginn der ERT GAG-Ausscheidungen unterhalb des Normwertes zeigte und bei seiner letzten Untersuchung diese oberhalb des Normwertes lagen. Der Verlauf der GAG-Ausscheidung wurde für die Gruppe der M. Hunter-Patienten in einer Box Plot-Darstellung veranschaulicht. Dafür wurde im ersten Jahr der ERT die GAG-Ausscheidung halbjährlich und anschließend jährlich analysiert. Als 6-Monatswerte wurden alle Werte akzeptiert, die  $\pm 90$  Tage des errechneten 6-Monatsintervalls bestimmt wurden. Analog wurden die jährlichen Werte mit einer Abweichung von  $\pm 90$  Tagen der berechneten Jahresuntersuchung akzeptiert. Lagen innerhalb eines Zeitintervalls mehrere Untersuchungsergebnisse zur GAG-Ausscheidung vor, wurde der Wert gewertet, der am nächsten zum Ende des halbjährlichen bzw. jährlichen Auswertungsintervalls lag. Ob sich die Antikörperbildung negativ auf die GAG-

Ausscheidung auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

### 3.4.2 Kardiologische Parameter

Alle kardiologischen Parameter wurden alle zwölf Monate in der Kinderkardiologie des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mittels echokardiographischer Untersuchungen bestimmt. Die Untersuchungen wurden entsprechend der Richtlinien der American Society of Echocardiography (175) im Liegen unter Ruhebedingungen nach 15 Minuten ohne äußere Störeinflüsse durchgeführt.

Bei jeder kardiologischen Untersuchung wurden folgende Parameter erhoben:

1. Alter bei Untersuchung
2. Geschlecht
3. Körpergewicht
4. Körperlänge
5. Relative Wanddicke des linken Ventrikels (RWT)
6. Auf die Körperlänge indizierte linksventrikuläre Muskelmasse (LVM\_H)
7. Aortenklappeninsuffizienz (AI)
8. Mitralklappeninsuffizienz (MI)
9. Aortenstenose (AS)
10. Mitralklappenstenose (MS)

#### **1. Relative Wanddicke des linken Ventrikels (RWT) und auf die Körperlänge indizierte linksventrikuläre Muskelmasse (LVM\_H)**

Eine hypertrophe Kardiomyopathie wurde in Analogie zu Devereux und de Simone (176;177) als eine Zunahme der  $LVM_H \geq 50$  definiert.

Die Einteilung unterschiedlicher Geometrien des linken Ventrikels erfolgte nach Ganau et al. (178). Abbildung 8 zeigt dies adaptiert und die LVM\_H nach de Simone (177).

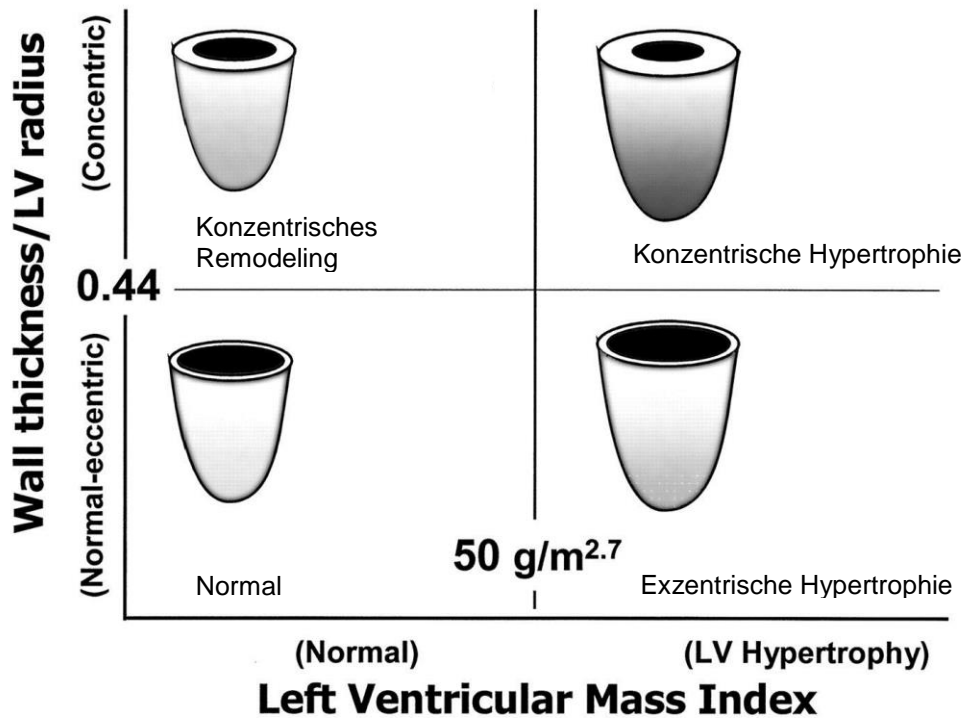


Abbildung 8: Einteilung unterschiedlicher Geometrien des linken Ventrikels aufgrund von relativer Wanddicke und auf die Körperlänge indizierte linksventrikuläre Muskelmasse; adaptiert nach de Simone (177)

**Normal:**  $LVM_H < 50$  und relative Wanddicke  $< 0.44$ .

**Konzentrisches Remodeling:**  $LVM_H < 50$  und erhöhte relative Wanddicke  $\geq 0.44$ .

**Konzentrische Hypertrophie:**  $LVM_H \geq 50$  und erhöhte relative Wanddicke  $\geq 0.44$ .

**Exzentrische Hypertrophie:**  $LVM_H \geq 50$  und relative Wanddicke  $< 0.44$ .

Die Beschreibung erfolgte modifiziert nach Kampmann und de Simone (177;179).

Die mittels echokardiographischer Untersuchungen ermittelten Werte der  $LVM_H$  und RWT wurde in patientenindividuellen Verläufen dargestellt und analysiert ob sich eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung der  $LVM_H$  bzw. RWT unter ERT bezogen auf den Ausgangswert eingestellt hat. Die Definition der Ausgangswerte ist in 3.4 beschrieben. Eine Verbesserung der  $LVM_H$  bzw. RWT wurde erreicht, wenn der Patient zu Beginn der ERT die  $LVM_H$  bzw. RWT oberhalb des Normwertes zeigte und bei seiner letzten Untersuchung diese unterhalb des Normwertes gefallen waren. Der Patient zeigte keine Veränderung, wenn die  $LVM_H$  bzw. RWT sowohl zu Beginn der ERT als auch bei seiner letzten Untersuchung oberhalb des Normwertes lagen. Als Verschlechter-

nung wurde definiert, wenn der Patient zu Beginn der ERT LVM\_H bzw. RWT unterhalb des Normwertes zeigte und bei seiner letzten Untersuchung diese oberhalb des Normwertes lagen. Der Verlauf der LVM\_H bzw. RWT wurde für die Gruppe der M. Hunter-Patienten in einer Box Plot-Darstellung veranschaulicht. Dafür wurde im ersten Jahr der ERT die LVM\_H bzw. RWT halbjährlich und anschließend jährlich analysiert. Als 6-Monatswerte wurden alle Werte akzeptiert, die  $\pm 90$  Tage des errechneten 6-Monatsintervalls bestimmt wurden. Analog wurden die jährlichen Werte mit einer Abweichung von  $\pm 90$  Tagen der berechneten Jahresuntersuchung akzeptiert. Lagen innerhalb eines Zeitintervalls mehrere Untersuchungsergebnisse vor, wurde der Wert gewertet, der am nächsten zum Ende des halbjährlichen bzw. jährlichen Auswertungsintervalls lag. Ob sich die Antikörperbildung negativ auf die LVM\_H bzw. RWT auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

## **2. Aortenklappeninsuffizienz (AI) und Mitralklappeninsuffizienz (MI)**

Die Aorten- und Mitralklappen wurden echokardiographisch auf Insuffizienzen und Stenosen untersucht. Die Einteilung des Schweregrades der Insuffizienzen wurde vom Untersucher in Grad I – bis Grad IV nach Zoghbi et al. vorgenommen (180). Grad I bezeichnet hierbei den geringsten Grad der Insuffizienz und Grad IV die schwerste Insuffizienz.

Die Schweregrade der AI und MI wurden in patientenindividuellen Verläufen dargestellt und analysiert ob sich eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung der AI bzw. MI unter ERT bezogen auf den Ausgangswert eingestellt hat. Die Definition der Ausgangswerte ist in 3.4 beschrieben. Eine Verbesserung der AI bzw. MI wurde erreicht, wenn der Patient zu Beginn der ERT einen höheren Schweregrad der AI bzw. MI zeigte als bei der letzten Untersuchung. Der Patient zeigte keine Veränderung, wenn der gleiche Schweregrad sowohl zu Beginn der ERT als auch bei der letzten echokardiographischen Untersuchung vorlag. Als Verschlechterung wurde definiert, wenn der Patient zu Beginn der ERT einen niedrigeren Schweregrad der AI bzw. MI zeigte als bei der letzten Untersuchung. Ob sich die Antikörperbildung negativ auf die AI bzw. MI auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

### 3. Aortenstenose (AS) und Mitralkstenose (MS)

Der Schweregrad der Stenose wurde als mittlerer Druckgradient über der jeweiligen Klappe berechnet und entsprechend Tabelle 14 zugeordnet. Die Einteilung der Schweregrade der Aortenstenose erfolgte nach Kampmann et al. (181), die der Mitralkstenose nach Bonow et al. (182).

**Tabelle 14: Einteilung der Schweregrade der Aorten- bzw. Mitralkstenose entsprechend dem mittleren Druckgradienten über der jeweiligen Klappe [mmHg]**

Art der Stenose	Grad 1 leichte Stenose [mmHg]	Grad 2 mittelschwere Stenose [mmHg]	Grad 3 schwere Stenose [mmHg]
Aortenstenose	< 25	25 – 40	> 40
Mitralkstenose	2,5 – 4,5	4,5 – 10	> 10

Die Schweregrade der Stenosen wurden in patientenindividuellen Verläufen dargestellt und analysiert ob sich eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung der AS bzw. MS unter ERT bezogen auf den Ausgangswert eingestellt hat. Die Definition der Ausgangswerte ist in 3.4 beschrieben. Eine Verbesserung der Stenose wurde erreicht, wenn der Patient zu Beginn der ERT einen höheren Schweregrad der AS bzw. MS zeigte als bei der letzten Untersuchung. Der Patient zeigte keine Veränderung, wenn der gleiche Schweregrad sowohl zu Beginn der ERT als auch bei der letzten echokardiographischen Untersuchung vorlag. Als Verschlechterung wurde definiert, wenn der Patient zu Beginn der ERT einen niedrigeren Schweregrad der Stenose zeigte als bei der letzten Untersuchung. Ob sich die Antikörperbildung negativ auf die AS bzw. MS auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

#### 3.4.3 Lungenfunktionsmessungen

Alle Parameter der Lungenfunktion wurden alle zwölf Monate in der Kinderpneumologie des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durch Spirometrie oder Bodyplethysmographie erfasst. Die Untersuchung erfolgte analog der Richtlinien der American Thoracic Society (ATS) und der European Respiratory Society (ERS). Die Messung wurde bei dazu fähigen M. Hunter-Patienten vorgenommen. Eine

optische Kontrolle der Fluss-Volumen-Kurven durch erfahrene Personen erfolgte nach jeder Messung. Ausgewertet wurden die Forcierte Vitalkapazität (FVC) und das Forcierte expiratorische Volumen ( $FEV_1$ ). FVC bezeichnet das Lungenvolumen, das nach maximaler Inspiration forciert ausgeatmet werden kann und  $FEV_1$  das Lungenvolumen, das nach maximaler Inspiration in der ersten Sekunde forciert ausgeatmet werden kann. Die Parameter wurden absolut und als Prozent der Sollwerte ausgewertet. Als Sollwerte wurden für Kinder, die von Zapletal et al. (183) und für Erwachsene die von Quanjer et al. (184) publizierten, eingesetzt. Die Einteilung der vier Schweregrade für die Auswertung richtete sich für FVC nach Muenzer et al. (103;140). Analog hierzu wurden die Schweregrade für  $FEV_1$  eingeteilt. FVC oder  $FEV_1 \geq 80\%$  keine Einschränkung, FVC oder  $FEV_1 < 80\%$  und  $\geq 70\%$  leichte Einschränkung, FVC oder  $FEV_1 < 70\%$  und  $\geq 50\%$  moderate Einschränkung, FVC oder  $FEV_1 < 50\%$  starke Einschränkung.

Die FVC oder  $FEV_1$  jeweils in Prozent vom Soll wurde in patientenindividuellen Verläufen dargestellt und analysiert ob sich eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung der respiratorischen Einschränkung unter ERT bezogen auf den Ausgangswert eingestellt hat. Die Definition der Ausgangswerte ist in 3.4 beschrieben. Eine Verbesserung der Einschränkung wurde erreicht, wenn der Patient zu Beginn der ERT eine stärkere Einschränkung bezogen auf FVC bzw.  $FEV_1$  jeweils in Prozent vom Soll zeigte als bei der letzten Untersuchung. Der Patient zeigte keine Veränderung, wenn die gleiche Einschränkung sowohl zu Beginn der ERT als auch bei der letzten Spirometrie oder Bodyplethysmographie vorlag. Als Verschlechterung wurde definiert, wenn der Patient zu Beginn der ERT eine geringere Einschränkung bezogen auf FVC bzw.  $FEV_1$  jeweils in Prozent vom Soll zeigte als bei der letzten Untersuchung. Ob sich die Antikörperbildung negativ auf die respiratorische Beteiligung auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

#### **3.4.4 Messung der Gelenkbeweglichkeit**

Das Bewegungsausmaß, das sogenannte Range of motion (ROM), der Gelenke von M. Hunter-Patienten wurde mittels eines zweiarmigen Goniometers von einer Physiotherapeutin bzw. vor 2008 von zwei Ärzten alle zwölf Monate gemessen. Die Messung erfolgte nach der standardisierten Neutral-Null-Methode bei den re-

gulären Verlaufskontrollen. Das passive ROM der Hand-, Ellenbogen- und Schultergelenke wurden im Sitzen vermessen, Hüft-, Knie- und Fußsprunggelenke im Liegen in Rückenlage. Die gemessenen Werte wurden auf dem standardisierten HOS-Formblatt mit Anleitung für die Gelenkbeweglichkeitsmessung notiert (siehe Anhang 9). Auf dem Formblatt finden sich zu jeder ROM die Maximalwerte, die nach Norkin et al. generiert wurden (185). In diese Untersuchung ging die ROM der Schulterflexion ein, da diese die höchste Sensitivität besitzt. Nach Muenzer et al. wurde für die Auswertung festgelegt, dass eine Änderung der ROM der Schulterflexion von  $\geq 10^\circ$  als klinisch relevant anzusehen ist (103).

Die Schulterflexion wurde in patientenindividuellen Verläufen dargestellt und analysiert ob sich eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung der Gelenkbeweglichkeit unter ERT bezogen auf den Ausgangswert eingestellt hat. Die Definition der Ausgangswerte ist in 3.4 beschrieben. Eine Verbesserung der Schulterflexion wurde erreicht, wenn der Patient bei seiner letzten Untersuchung eine um  $\geq 10^\circ$  höhere Schulterflexion zeigte als zu Beginn der ERT. Der Patient zeigte keine Veränderung, wenn die Schulterflexion sich um weniger als  $10^\circ$  von Beginn der ERT verglichen mit der letzten Untersuchung geändert hatte. Als Verschlechterung wurde definiert, wenn der Patient zu Beginn der ERT eine um  $\geq 10^\circ$  geringere Schulterflexion zeigte als bei der letzten Untersuchung. Ob sich die Antikörperbildung negativ auf die Gelenkbeweglichkeit auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

### **3.4.5 Messung der Gehstrecke**

Um die Belastbarkeit der M. Hunter-Patienten zu testen, wurde bei den alle 6-monatlich stattfindenden Verlaufskontrollen ein 6-Minuten-Gehtest (6MGT) nach den Richtlinien der American Thoracic Society (ATS) unter Kontrolle der Sauerstoffsättigung, der Herz- und Atemfrequenz durchgeführt (186). Der Gehtest wurde unter ständiger Beobachtung auf einem ebenen Flur realisiert. Der Flur hatte zwei 15 m entfernte Markierungen zwischen denen die Patienten liefen. Am Ende der 6 Minuten wurde wiederum auf einem HOS-Formblatt für den 6-Minuten-Gehtest die gelaufene Strecke notiert (siehe Anhang 10). Zur Auswertung dieses Parameters wurde nach Puhan et al. (187) festgelegt, dass eine Änderung des

6MGT um mehr als 35 m als klinisch relevant einzuschätzen ist. Die Messung erfolgte bei allen Patienten, bei denen eine Mitarbeit gewährleistet werden konnte.

Die Gehstrecke des 6MGT wurde in patientenindividuellen Verläufen dargestellt und analysiert ob sich eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung der Gehstrecke unter ERT bezogen auf den Ausgangswert eingestellt hat. Die Definition der Ausgangswerte ist in 3.4 beschrieben. Eine Verbesserung der Gehstrecke wurde erreicht, wenn der Patient bei seiner letzten Untersuchung eine um > 35 m längere Gehstrecke absolvieren konnte als zu Beginn der ERT. Der Patient zeigte keine Veränderung, wenn die Gehstrecke von Beginn der ERT verglichen mit der letzten Untersuchung sich um sich um < 35 m geändert hatte. Als Verschlechterung wurde definiert, wenn der Patient zu Beginn der ERT eine um > 35 m längere Gehstrecke bewältigen konnte als bei der letzten Untersuchung. Ob sich die Antikörperbildung negativ auf die Gehstrecke auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

### **3.4.6 Immunantwort auf die Enzyersatztherapie**

Bei allen Patienten wurde während der Infusion von Idursulfase (Elaprase<sup>®</sup>) auf mögliche unerwünschte Reaktionen geachtet. Die Gabe von Elaprase<sup>®</sup> in der Villa Metabolica erfolgte während der alle sechsmonatlich stattfindenden Verlaufskontrollen der Patienten. Nach Muenzer et al. (103) und der Fachinformation von Elaprase<sup>®</sup> (139) sind Hautreaktionen wie Ausschlag, Pruritus und Urtikaria sowie Pyrexie, Kopfschmerzen, Hypertonie und Rötung die häufigsten infusionsbedingten Reaktionen. Zu jeder Enzyminfusion wurde ein HOS-Formblatt für Infusionsdetails ausgefüllt (siehe Anhang 11). Kam es zu einer infusionsbedingten Reaktion, so wurde dies auf einem separaten Formblatt für unerwünschte Ereignisse dokumentiert. Zur Klärung der Frage, ob Patienten, die eine infusionsbedingte Reaktion zeigen, in der Folge ein größeres Risiko zum Auftreten von persistierenden Antikörpern mit Neutralisationskapazität haben, wurde nach einer Korrelation gesucht.

Bei sechs Patienten war in der Akte nicht spezifiziert, ob jemals eine infusionsbedingte Reaktion aufgetreten war. Bei diesen Patienten ergab eine Anfrage bei den behandelnden Ärzten, dass dies nicht der Fall sei und so wurden diese Fälle auch als Patienten ohne infusionsbedingte Reaktionen gewertet. Es wurde eine patientenindividuelle Übersicht erstellt, die die Ausprägung der neurologischen Beteili-



gung, das Auftreten von infusionsbedingten Reaktionen und persistierenden neutralisierenden Antikörpern zeigt.

### **3.4.7 Validierter Fragebogen des Hunter Outcome Survey (HS-FOCUS)**

Der idealerweise jährlich ausgeteilte HS-FOCUS ist ein validierter Fragebogen für M. Hunter, der es ermöglicht, die Progredienz dieser Erkrankung standardisiert zu erfassen (188;189). HS-FOCUS ist in zwei Versionen verfügbar: ein Elternfragebogen mit 68 Fragen und ein Patienten-Selbstberichtsformular mit 54 Fragen für Patienten über zwölf Jahren. HS-FOCUS umfasst die folgenden sechs Fragekategorien: Gehen/ Stehen (Unterkörperfunktionen), Greifen/ Fassen (Oberkörperfunktionen), Schlafen, Schule/ Arbeit, Atmen und Zufriedenheit (siehe Anhang 12 und 13). Jede Frage hat die folgenden sechs Bewertungen (außer für Zufriedenheit) für den Antwortenden zur Auswahl: 1 = gar nicht schwierig, 2 = etwas schwierig, 3 = sehr schwierig, 4 = unterschiedlich, ist manchmal dazu in der Lage, 5 = gar nicht dazu in der Lage, 6 = nicht anwendbar. Für die Fragen der Kategorie Zufriedenheit gibt es folgende Antwortmöglichkeiten: 1 = sehr zufrieden, 2 = etwas zufrieden, 3 = weder zufrieden noch unzufrieden, 4 = etwas unzufrieden, 5 = sehr unzufrieden, 6 = nicht anwendbar. HS-Focus wurde seit Oktober 2006 bei den regelmäßigen Verlaufskontrollen an die Patienten bzw. deren Eltern verteilt. Insgesamt wurden 94 Fragebögen ausgewertet. Bei zehn unterschiedlichen Fragen fiel auf, dass von den Ausfüllenden zwischen zwei Kästchen ein Kreuz gesetzt wurde. In diesen Fällen wurde der jeweils schlechtere Wert gezählt. Für die Auswertung wurden folgende zwei Fragen genauer betrachtet, die in einer Vorauswahl die höchste Sensitivität gezeigt hatten.

1. Sind Sie/ Ist Ihr Kind in der Lage eine Münze mit Daumen und Zeigefinger von einem Tisch zu nehmen?

2. Sind Sie/ Ist Ihr Kind in der Lage die Hände ganz zu öffnen?

Beide ausgewerteten Fragen gehören in die Kategorie „Greifen/ Fassen“, da gezeigt wurde, da auch in diesem Gebiet die Aussagen des Fragebogens gut mit objektiven Messergebnissen der ROM korrelieren (189). Eine Veränderung in dem

Bereich der Gelenksteifigkeit und der Beugekontrakturen kann in einem schwerwiegenden Verlust in der Gesamtfunktion und den Auswirkungen auf die täglichen Aktivitäten des Patienten haben (189).

Die Antworten der beiden ausgewählten Fragen wurden in patientenindividuellen Verläufen dargestellt und analysiert ob sich eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung der Handfunktion unter ERT bezogen auf den Ausgangswert im Fragebogen des jeweiligen Patienten bzw. dessen Eltern eingestellt hat. Die Definition der Ausgangswerte ist in 3.4 beschrieben. Die Verschlechterung der Handfunktion steigt in folgender Reihenfolge der Antwortmöglichkeiten an: 1 (= gar nicht schwierig) – 2 (= etwas schwierig) – 3 (= sehr schwierig) – 5 (= gar nicht dazu in der Lage). Folgende Antwortmöglichkeiten wurden aufgrund der schlechten Auswertbarkeit nicht berücksichtigt: 4 (= unterschiedlich, ist manchmal dazu in der Lage), 6 (= nicht anwendbar). Eine Verbesserung der Handfunktion wurde erreicht, wenn der Patient bzw. die Eltern bei der Beantwortung des letzten Fragebogens eine um mindestens eine Kategorie bessere Antwortmöglichkeit bezogen auf die Handfunktion ausgewählt hatten als zu Beginn der ERT. Keine Veränderung wurde angenommen, wenn dieselbe Antwortmöglichkeit von Beginn der ERT verglichen mit der Antwort des zuletzt ausgefüllten Fragebogens ausgewählt wurde. Als Verschlechterung wurde definiert, wenn der Patient bzw. die Eltern bei der Beantwortung des letzten Fragebogens eine um mindestens eine Kategorie schlechtere Antwortmöglichkeit bezogen auf die Handfunktion ausgewählt hatten als zu Beginn der ERT. Ob sich die Antikörperbildung negativ auf Fähigkeit der Handfunktion, die durch die Beantwortung dieser Fragen erfasst wurde, auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

### **3.5 Bestimmung der Neuronenspezifischen Enolase und S-100 bei Morbus Hunter-Patienten**

Für die Bestimmung der Neuronenspezifische Enolase (NSE) und S-100 wurden während den sechsmonatlich stattfindenden Verlaufskontrollen den Patienten Blutproben abgenommen. Die NSE und S-100 wurden im Serum der Patienten im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bestimmt. Die Analyse der NSE erfolgte mittels eines Brahms Kryptors von Brahms GmbH. Dieser

Messmethode liegt die TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) Technologie zugrunde. Die gerätespezifischen altersabhängigen oberen Normwerte sind wie folgt: bei null bis elf Monate alten Babys 25 ng/ml, bei Kindern zwischen dem ersten und achten Lebensjahr 20 ng/ml, bei Kindern ab acht Jahren und Erwachsenen 12,5 ng/ml. Die Untersuchungsmethode der NSE im Serum wurde Anfang November 2013, unabhängig von dieser Studie, wie die Bestimmung von S-100 auf einem Cobas® E 411 von Roche Deutschland Holding GmbH durchgeführt. Die Methode beruht auf einer Elektrochemilumineszenz-Technologie. Normwerte der NSE und S-100 betragen bei dieser Methode altersunabhängig 16,3 ng/ml für NSE und 0,105 µg/l für S-100.

Es wurde analysiert, ob bei Patienten mit einer oder mehreren erhöhten NSE- oder S-100-Werten eine neuropathische Beteiligung vorliegt.

### **3.6 Statistik und Auswertung**

Die erhobenen Daten wurden zunächst in das Tabellenkalkulationssoftware Excel (Fa. Microsoft) eingegeben und während des Studienverlaufs in das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 22.0 überführt, darin weiter erfasst und ausgewertet. Die Auswertung der Datensammlung erfolgte mittels SPSS Statistics 22.0, Excel und SAS 9.4 mit Unterstützung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin Mainz (IMBEI).

Für jeden klinischen und biochemischen Parameter, außer der Immunantwort auf die ERT, wurde eine patientenindividuelle graphische Darstellung erstellt, die veranschaulicht, wie sich die Parameter bei den einzelnen Patienten im Zeitverlauf nach Beginn der ERT entwickelten. Anschließend wurden die Patienten kategorisiert, ob sich eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung des jeweiligen Parameters unter ERT im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert eingestellt hat. Ob sich eine Antikörperbildung negativ auf den jeweiligen Parameter auswirkt, wurde durch eine deskriptive Untersuchung der Entwicklung der beiden PNAK+ Patienten beschrieben.

Für die deskriptive Darstellung der Ergebnisse wurden für stetige Variablen Median, Minimum und Maximum bestimmt und ggf. in Form von Box Plots dargestellt. Da nur bei sehr wenigen Patienten neutralisierende Antikörper gefunden wurden, wurde auf die Durchführung von Signifikanztests verzichtet.

Für die Korrelation des Phänotyps der M. Hunter-Patienten mit Erhöhungen der Neuronenspezifischen Enolase und S-100 als auch für die Korrelation des Auftretens von persistierenden neutralisierenden Antikörpern und infusionsbedingten Reaktionen wurde mittels einer patientenindividuellen tabellarischen Übersicht nach einem Zusammenhang gesucht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Studienprotokoll

#### 4.1.1 Demographische Daten und Merkmale des Patientenkollektivs

Es konnten insgesamt 30 Patienten rekrutiert und ausgewertet werden. Der Rekrutierungszeitraum erstreckte sich von Beginn der Studie, Mitte 2011, bis in das Frühjahr 2013. Alle Patienten hatten bereits vorher ihre schriftliche Einwilligung gegeben an der HOS-Studie teilzunehmen. Mit den beiden Einwilligungserklärungen konnten die Daten aller Patientenakten und der HOS-Datenbank, auch retrospektiv, ausgewertet werden. Die ältesten Daten, die retrospektiv erfasst wurden, stammen aus Dezember 2003. Die neuesten Daten, die prospektiv erfasst wurden, stammen aus Januar 2014. Der Messzeitraum der IDS-Enzymaktivität im Mischserum erstreckte sich von September 2009 bis Dezember 2013.

Alle Patienten waren männlichen Geschlechts. Zum Auswertungstermin betrug das mediane Alter der Patienten 13 Jahre. Der jüngste Patient war drei Jahre und der älteste 51 Jahre alt. Jeweils 15 Patienten (50%) waren neuropathisch und 15 Patienten (50%) nicht neuropathisch betroffen. Die Patienten wurden im Mittel bereits 72,3 Monate mit Elaprase<sup>®</sup> behandelt. Die kürzeste Therapiedauer betrug sechs Monate, die längste 120 Monate.

### 4.2 Bestimmung der Iduronatsulfatase (IDS)-Aktivität im Serum von Morbus Hunter-Patienten

#### Normalwerte der IDS-Aktivität im Serum gesunder männlicher Personen

Die Enzymaktivität weist bei gesunden Personen eine hohe Streubreite auf. Wie aus Tabelle 38 (siehe Anhang 14) ersichtlich ist die intraindividuelle Streubreite der IDS-Aktivität im Serum der gesunden Person, die für die Messungen im Mischserum verwendet wurde, ebenfalls sehr hoch. Die gesunde Person zeigte eine minimale IDS-Aktivität von 126 nmol/4h/ml und eine maximale IDS-Aktivität von 438 nmol/4h/ml. Der Median betrug hierbei 289 nmol/4h/ml. Die zu einem Zeitpunkt niedrige IDS-Aktivität im Serum des Gesunden hat jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis im Mischserum, da die IDS-Aktivität im Mischserum immer noch deutlich höher als bei den M. Hunter-Patienten ist.

#### 4.2.1 Neutralisationskapazität im Mischserum

Unter Neutralisationskapazität versteht man das Ausmaß der Neutralisation der IDS-Enzymaktivität durch die unter ERT gebildeten Antikörper gegen Elaprase®.

Von allen 30 Patienten konnte mindestens zweimal die Enzymaktivität im Mischserum gemessen werden, um die Neutralisationskapazität potentiell vorhandener Anti-Elaprase®-Antikörper festzustellen. Insgesamt konnte in 131 Blutproben die IDS-Aktivität im Mischserum bestimmt werden. Dies entspricht im Durchschnitt 4,4 Blutproben pro Patient.

Bei fünf (17%) der untersuchten Patienten war die IDS-Enzymaktivität – nicht jedoch in allen Serumproben – reduziert. Bei zwölf Mischseren dieser Patienten betrug die IDS-Aktivität im Median 18% (mindestens 2%, maximal 26%) was einer Neutralisationskapazität von 82% (mindestens 74%, maximal 98%) entspricht. Die Ergebnisse der Patienten mit Neutralisationskapazität im Mischserum, d.h. die mindestens einmalig eine  $\geq 40\%$  reduzierte IDS-Aktivität aufwiesen, sind in Tabelle 15 gezeigt. Aus Tabelle 15 ist ersichtlich, dass drei Patienten, die jeweils einmalig eine reduzierte IDS-Aktivität im Mischserum aufwiesen, in weiteren Serumproben keine reduzierte IDS-Aktivität im Mischserum gemessen wurde. Bei 28 Patienten betrug die Enzymaktivität in 119 Proben im Median 110%. Tabelle 16 zeigt die Messergebnisse der Patienten ohne Neutralisationskapazität ( $< 40\%$  verminderte IDS-Aktivität).

**Tabelle 15: Ergebnisse der Patienten mit IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum mit Neutralisationskapazität (mindestens einmalig  $\geq 40\%$  verminderte IDS-Aktivität; Neutralisationskapazität  $\geq 40\%$ )**

Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]	Neutralisationskapazität [%]
1	45,0	275,0	160,0	18,9	11,8	88,2
	12,5	310,0	161,2	155,0	96,1	3,9
	11,1	347,0	179,1	211,0	117,8	-
	29,0	227,0	128,0	188,0	146,9	-
3	3,4	348,0	175,7	7,7	4,4	95,6
	93,0	275,0	184,0	182,5	99,2	0,8
	35,5	193,3	114,4	114,0	99,7	0,3
	150,0	347,0	248,5	257,0	103,4	-
	80,1	350,6	215,4	232,0	107,7	-
23	0,5	324,0	162,3	18,4	11,3	88,7
	6,5	242,0	124,3	21,1	17,0	83
	0,9	309,0	154,9	38,3	24,7	75,3
	0,0	344,0	172,0	45,0	26,2	73,8
26	4,3	398,0	201,1	4,9	2,4	97,6
	0,3	254,1	127,2	26,2	20,6	79,4
	0,2	243,4	121,8	29,1	23,9	76,1
	1,6	289,0	145,3	36,5	25,1	74,9
	0,1	347,0	173,6	34,0	19,6	80,4
27	3,9	350,6	177,3	150,1	84,7	15,3
	1,3	324,0	162,7	20,0	12,3	87,7

**Tabelle 16: Ergebnisse der Patienten mit IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum ohne Neutralisationskapazität (< 40% verminderte IDS-Aktivität; Neutralisationskapazität < 40%)**

Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]	Neutralisationskapazität [%]
2	15,7	260,0	137,9	168,0	121,9	-
	19,9	183,6	101,8	126,9	124,7	-
	7,8	238,0	122,9	135,0	109,8	-
	276,0	415,0	345,5	338,0	97,8	2,2
4	0,0	357,0	178,5	180,0	100,8	-
	17,3	344,0	180,7	204,0	112,9	-
5	0,9	248,3	124,6	109,9	88,2	11,8
	1,2	279,0	140,1	137,0	97,8	2,2
6	11,3	324,0	167,7	192,0	114,5	-
	12,1	273,0	142,6	175,0	122,8	-
	10,4	253,5	131,9	146,8	111,3	-
	10,8	239,8	125,3	156,0	124,5	-
	4,3	271,0	137,7	148,0	107,5	-
	3,4	279,0	141,2	179,0	126,8	-
	38,2	427,0	232,6	262,0	112,6	-
7	7,1	273,0	140,1	144,0	102,8	-
	0,0	271,0	135,5	148,0	109,2	-
	4,5	397,0	200,8	191,0	95,1	4,9
	31,4	350,6	191,0	212,0	111,0	-
	17,9	301,0	159,5	184,0	115,4	-
8	18,4	340,2	179,3	176,0	98,2	1,8
	6,8	281,0	143,9	149,0	103,6	-
	12,0	193,3	102,7	131,0	127,6	-
	8,8	427,0	217,9	218,0	100,1	-
	3,4	269,0	136,2	158,0	116,0	-
9	6,9	248,3	127,6	124,4	97,5	2,5
	20,9	239,8	130,4	175,0	134,3	-
	12,8	310,0	161,4	170,0	105,3	-



Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]	Neutralisationskapazität [%]
9	9,9	295,0	152,5	152,0	99,7	0,3
	14,4	344,0	179,2	200,0	111,6	-
10	4,6	342,4	173,5	171,2	98,7	2,3
	6,2	237,2	121,7	142,0	116,7	-
	14,6	183,6	99,1	113,9	114,9	-
11	18,6	322,0	170,3	172,0	101,0	-
	6,7	243,4	125,1	144,3	115,4	-
	11,3	126,0	141,2	126,0	89,3	10,7
	297,0	295,0	296,0	291,0	98,3	1,7
	203,0	415,0	309,0	306,0	99,0	1,0
12	6,4	248,3	127,3	135,4	106,3	-
	17,8	224,6	121,2	165,7	136,7	-
	21,1	183,6	102,4	137,2	134,1	-
	282,0	307,0	294,5	323,0	109,7	-
	118,0	415,0	266,5	266,0	99,8	0,2
13	15,6	340,2	177,9	182,0	102,3	-
	158,1	243,4	200,8	198,2	98,8	1,2
	77,0	307,0	192,0	195,0	101,6	-
	61,0	227,0	144,0	140,0	97,2	2,8
14	12,6	342,0	177,3	187,0	105,5	-
	20,2	281,0	150,6	148,0	98,3	1,7
	24,7	193,3	109,0	119,0	109,2	-
	0,7	279,0	139,8	159,0	113,7	-
	11,0	301,0	156,0	149,0	95,5	4,5
	19,0	301,0	160,0	179,0	111,9	-
15	28,0	311,0	169,5	172,0	101,5	-
	12,6	309,0	160,8	189,0	117,5	-
	9,4	350,6	180,0	210,0	116,7	-
16	3,3	299,0	151,1	166,9	110,4	-
	8,7	239,8	124,2	165,0	132,8	-

Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]	Neutralisationskapazität [%]
16	14,0	183,6	98,8	113,4	114,8	-
	11,3	307,0	159,2	181,0	113,7	-
	19,0	237,0	128,0	150,0	117,2	-
17	26,0	273,0	149,5	179,0	119,7	-
	19,5	224,6	122,1	152,8	125,2	-
	334,2	183,6	258,9	366,7	141,6	-
	241,0	306,0	273,5	235,0	85,9	14,1
	25,0	185,0	105,0	127,0	121,0	-
	309,0	324,0	316,5	326,0	103,0	-
18	1,5	310,0	155,8	171,0	109,8	-
	3,8	350,6	177,2	196,0	110,6	-
19	0,9	240,8	120,9	115,5	95,6	4,4
	6,7	324,0	165,4	222,0	134,3	-
	13,3	424,0	218,6	200,0	91,5	8,5
	11,1	238,7	124,9	140,4	112,4	-
	9,6	256,0	132,8	151,2	113,9	-
	5,7	309,0	157,4	182,0	115,7	-
	11,4	427,0	219,2	220,0	100,4	-
20	11,0	269,0	140,0	161,0	115,0	-
	0,8	242,0	121,4	113,4	93,4	6,6
	185,2	183,6	184,4	223,0	120,9	-
	6,6	438,0	222,3	259,0	116,5	-
21	187,0	344,0	265,5	263,0	99,1	0,9
	15,1	282,0	148,6	300,8	202,5	-
	3,3	254,1	128,7	143,4	111,4	-
	64,3	235,0	149,7	145,0	96,9	3,1
22	15,4	193,3	104,4	131,0	125,5	-
	5,0	342,0	173,5	159,0	91,6	8,4
	1,4	254,1	127,7	119,5	93,6	6,4
	3,3	310,0	156,6	150,0	95,8	4,2

Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]	Neutralisationskapazität [%]
22	13,5	397,0	205,3	184,0	89,7	10,3
	3,5	427,0	215,3	214,0	99,4	0,6
24	17,0	289,0	153,0	170,0	111,1	-
	25,9	183,6	104,8	123,8	118,2	-
	26,0	387,0	206,5	208,0	100,7	-
	38,0	179,0	108,5	143,0	131,8	-
25	15,3	333,2	174,3	337,5	193,7	-
	5,6	324,0	164,8	188,0	114,1	-
	8,3	348,0	178,2	186,0	104,4	-
	0,7	224,6	112,6	138,0	122,5	-
25	18,1	238,0	128,1	136,0	106,2	-
	11,0	301,0	156,0	152,0	97,4	2,6
	26,0	325,0	175,5	222,0	126,5	-
28	12,0	254,1	133,0	141,6	106,5	-
	6,0	213,0	109,5	127,0	116,0	-
	10,3	307,0	158,7	171,0	107,8	-
	9,7	344,0	176,9	222,0	125,5	-
29	2,7	377,5	190,1	227,4	119,6	-
	1,8	271,0	136,4	165,0	121,0	-
	13,0	237,0	125,0	178,0	142,4	-
30	7,3	424,0	215,7	144,0	66,8	33,2
	0,3	239,8	120,0	129,0	107,5	-
	10,6	193,3	101,9	82,7	81,1	18,9

Alle IDS-Aktivitäten wurden mindestens ein Tage nach der letzten ERT-Gabe gemessen. Für Idursulfase wird eine Plasmahalbwertszeit von 44-160 Minuten angegeben (190). Eine Vergleichbarkeit der gemessenen Werte ist demnach gegeben.

In Tabelle 17 sind die Zeitabstände zwischen Beginn der ERT und erstmals aufgetretener reduzierter IDS-Aktivität im Mischserum der betroffenen Patienten angegeben.

**Tabelle 17: Zeitabstände zwischen dem Beginn der ERT und erstmals aufgetretener reduzierter IDS-Aktivität im Mischserum für die betroffenen Patienten**

Patient N°	Zeitabstand zwischen Beginn der ERT und erstmals festgestellter reduzierter IDS-Aktivität [Monate]
1	43
3	86
23	50
26	51
27	7

Bei den **Patienten Nr. 1, 3, 23 und 26** entspricht die IDS-Aktivitätsmessung mit verminderter Aktivität im Mischserum auch der ersten untersuchten Blutprobe dieser Patienten. Der IDS-Aktivitätsstatus dieser Patienten vor der ersten Messung ist unbekannt. Bei **Patient Nr. 1** und **3** zeigten sich in nachfolgenden Messungen keine reduzierten IDS-Aktivitäten. Bei den **Patienten Nr. 23** und **26** war in allen nachfolgenden Untersuchungen die IDS-Aktivität im Mischserum reduziert. Nur bei **Patient Nr. 27** nahm die IDS-Aktivität im Mischserum im zeitlichen Verlauf ab und damit die Neutralisationskapazität zu. Aufgrund der stark variierenden Zeitabstände zwischen Beginn der ERT und erstmals gemessener reduzierter IDS-Aktivität im Mischserum und dem unbekanntem Status der Patienten vor der ersten Messung bei vier Patienten kann kein Zusammenhang zwischen dem erstmaligen Auftreten der Antikörper mit Neutralisationskapazität und dem Beginn der ERT gefunden werden.

Barbier et al. sprechen von persistierenden neutralisierenden Antikörpern, wenn drei oder mehr aufeinander folgende Blutuntersuchungen neutralisierende Elaprase®-Antikörper aufwiesen, unabhängig vom Ergebnis bei weiteren Blutabnahmen (148). Bei den **Patienten Nr. 23 und 26** sind demnach als Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern einzustufen, denn sämtliche Blutproben dieser Patienten wiesen eine deutlich reduzierte IDS-Aktivität und ausgeprägte Neutralisationskapazität auf (siehe Tabelle 15). Dies entspricht 7% der 30 untersuchten

Patienten. **Patient Nr. 27** ist nicht klassifizierbar, da die zweite gemessene Probe eine verminderte Aktivität zeigte, aber keine weiteren Messungen wegen Beendigung der Studie stattfanden. Die beiden Patienten mit den persistierenden neutralisierenden Antikörpern sind für die Auswertung der klinischen Verläufe am bedeutendsten, da dort ein relevanter Effekt der Antikörper vermutet werden kann.

Die beiden Patienten, die als positiv für persistierende neutralisierende Antikörper eingestuft wurden, sind beide neuropathisch betroffen. Ein Patient weist eine interstitielle Deletion einschließlich des benachbarten Locus DXS962 auf, bei dem anderen Patient liegt eine Missense Mutation vor. Die Deletion wird zu den großen, die Missense Mutation den kleinen Genveränderungen zugeordnet.

#### **4.2.2 Validierung der Neutralisationskapazitätsbestimmung und der Einfluss der Verdünnungslösung**

##### **Validierung der Bestimmung der Neutralisationskapazität**

###### Verdünnungsreihe mit Serum von Patient Nr. 26 und Messung der IDS-Aktivität im Mischserum

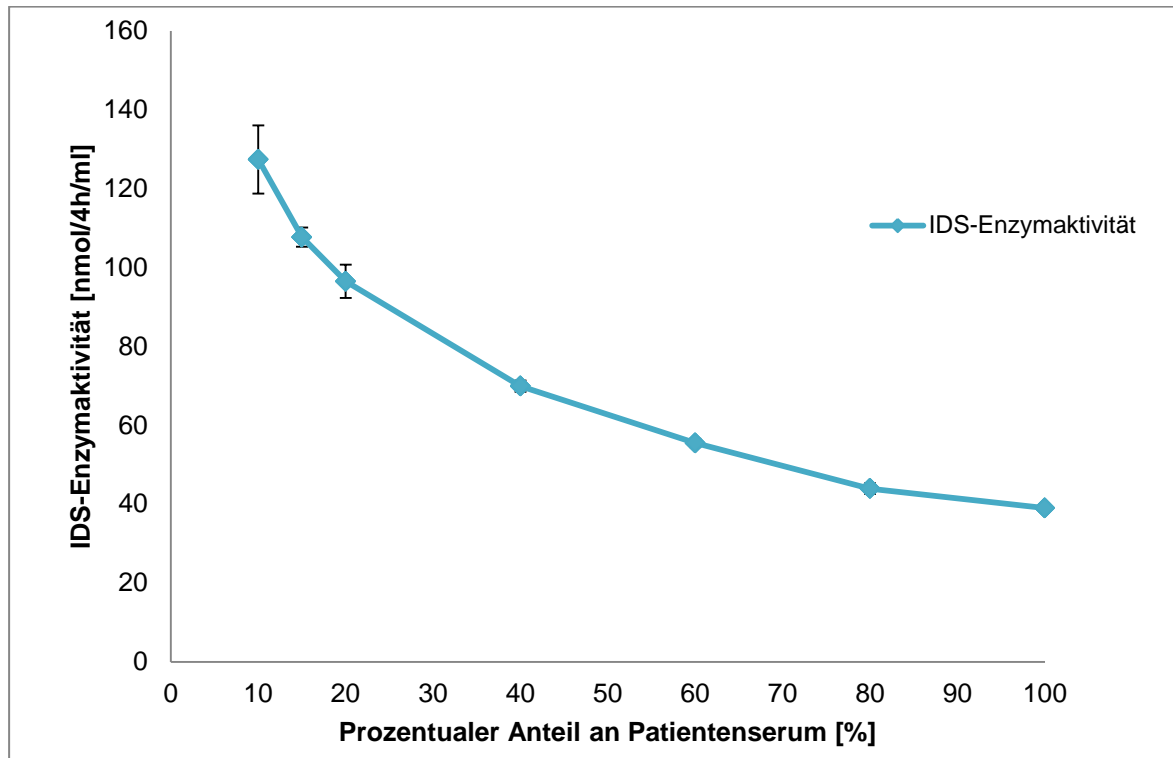
Das Mischserum besteht – wie in 3.2.1 bei der Messung der Neutralisationskapazität beschrieben – aus 50 µl Serum eines gesunden Individuums und 50 µl Serum des jeweiligen Patienten. Da alle Proben die gleiche Menge Serum eines gesunden Individuums beinhalten, besitzen alle die gleiche Menge an intaktem Enzym. Für die Validierung wurde Serum des Patienten abnehmend bis zu einem Gehalt von nur 10% in dem Gesamtvolumen von 50 µl mit Aqua ad iniectabilia verdünnt (siehe Tabelle 4 in 3.2.2). Die zu bestätigende Hypothese lautete, dass je mehr Patientenserum und somit auch Antikörper mit Neutralisationskapazität im Mischserum vorhanden war, desto stärker müsste die Enzymaktivität des Gesunden beeinträchtigt sein.

Die Ergebnisse der Bestimmung sind in Tabelle 18 mit Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) dargestellt.

**Tabelle 18: Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum unter Verwendung der Verdünnungsreihe des Serums von Patient Nr. 26**

<b>Prozentualer Anteil Patientenserum in 50 µl des Patiententeils des Mischserums [%]</b>	<b>Gemessene IDS-Aktivität [nmol/4h/ml]</b>	<b>Mittelwert ± SD der gemessenen IDS-Aktivitäten [nmol/4h/ml]</b>
100	37,9	39,0 ± 0,98
	38,7	
	40,3	
	39,0	
80	42,2	43,8 ± 1,34
	43,3	
	44,7	
	45,1	
60	55,9	55,5 ± 1,05
	56,7	
	55,1	
	54,3	
40	68,9	69,9 ± 1,44
	68,4	
	71,3	
	70,9	
20	101,2	96,5 ± 4,22
	91,0	
	97,7	
	96,2	
15	107,4	107,7 ± 2,42
	109,3	
	104,4	
	109,7	
10	118,3	127,4 ± 8,64
	131,8	
	122,3	
	137,2	

Abbildung 9 zeigt die graphische Darstellung der IDS-Enzymaktivitäten der Vierfachbestimmungen abhängig vom Gehalt des Patientenserums in Prozent.



**Abbildung 9: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im 1:1 Mischserum eines Gesunden und einer Verdünnungsreihe des Serums von Patient Nr. 26 (10% bis 100%, Verdünnungslösung Aqua ad iniectabilia)**

Abbildung 9 und Tabelle 18 bestätigen die Hypothese, dass je größer der Anteil an Patientenserum mit Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörpern in der untersuchten Probe ist, desto größer ist die Neutralisationskapazität und desto geringer die gemessene IDS-Enzymaktivität.

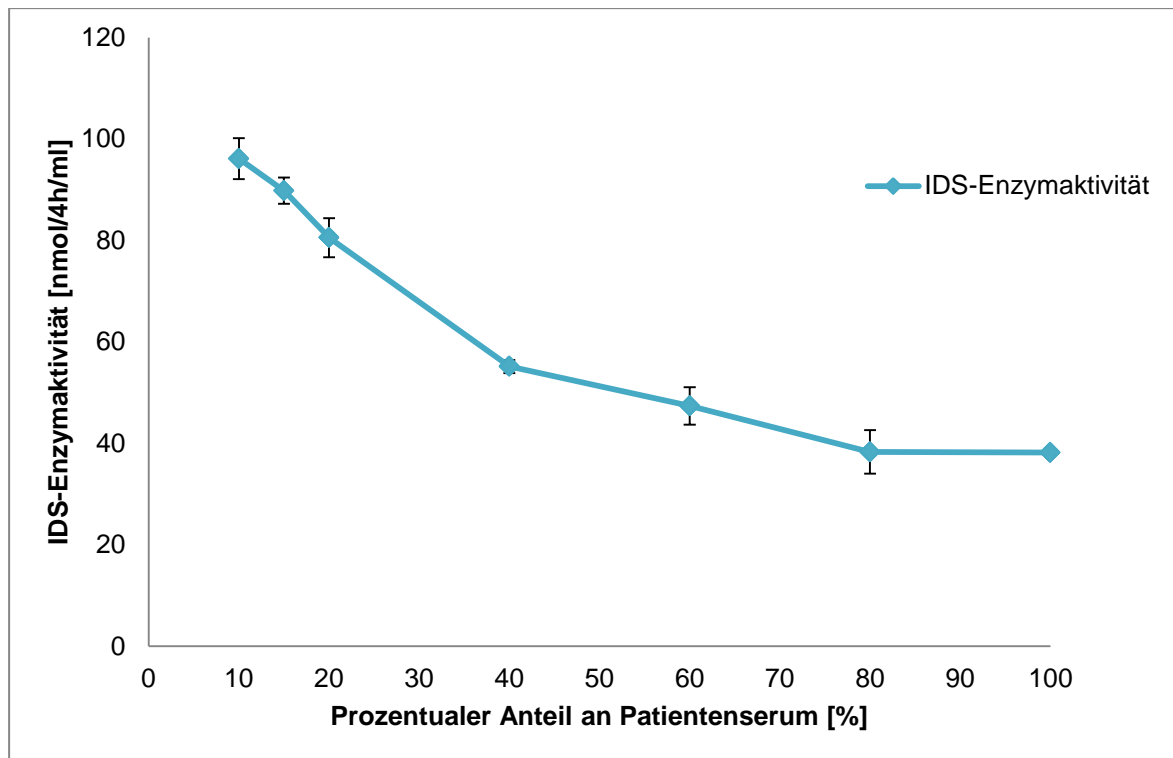
#### Verdünnungsreihe mit Serum von Patient Nr. 23 und Messung der IDS-Aktivität im Mischserum

Auch bei Patient Nr. 23 zeigte sich eine deutlich erkennbare Abnahme der IDS-Enzymaktivität bei steigendem Anteil von Patientenserum in der Probe. Die Ergebnisse der Bestimmung sind in Tabelle 19 mit Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) und in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

**Tabelle 19: Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum unter Verwendung der Verdünnungsreihe des Serums von Patient Nr. 23**

<b>Prozentualer Anteil Patientenserum in 50 µl des Patiententeils des Mischserums [%]</b>	<b>Gemessene IDS-Aktivität [nmol/4h/ml]</b>	<b>Mittelwert ± SD der gemessenen IDS-Aktivitäten [nmol/4h/ml]</b>
100	37,9	38,2 ± 0,31
	38,6	
	38,3	
	38,1	
80	31,9	38,3 ± 4,29
	40,1	
	41,2	
	40,1	
60	49,7	47,4 ± 3,71
	49,9	
	42,0	
	48,0	
40	55,0	55,2 ± 1,30
	53,5	
	56,7	
	55,4	
20	80,9	80,6 ± 3,84
	85,8	
	77,2	
	78,2	
15	86,9	89,8 ± 2,58
	91,6	
	91,0	
	nicht auswertbar	
10	91,4	96,1 ± 4,02
	94,3	
	98,7	
	100,1	





**Abbildung 10: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im 1:1 Mischserum eines Gesunden und einer Verdünnungsreihe des Serums von Patient Nr. 23 (10% bis 100%, Verdünnungslösung Aqua ad iniectiones)**

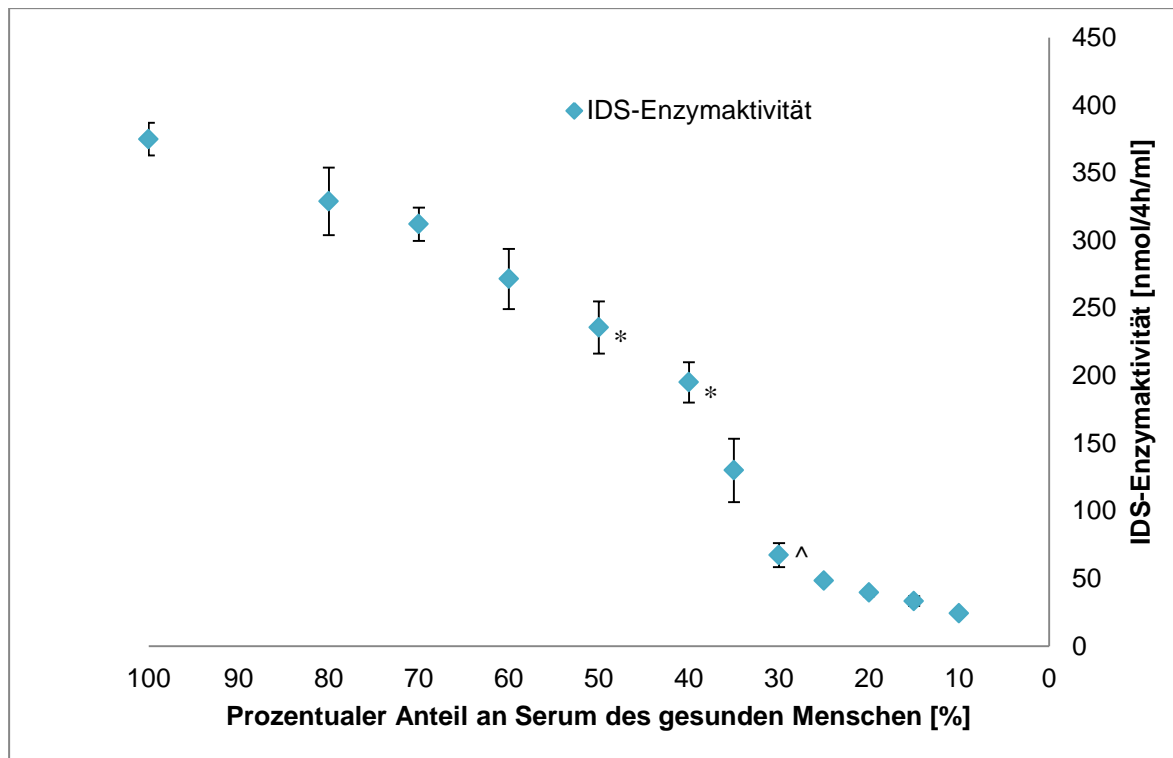
Die gemessene Enzymaktivität sinkt ebenfalls mit zunehmendem Gehalt an Patientenserum von Patient Nr. 23 und die Standardabweichung steigt mit höherer Verdünnung an. Da die Standardabweichungen unter 5% lagen, kann von Validität der Methode ausgegangen werden.

### **Einfluss der Verdünnungslösung auf die IDS-Aktivität**

Zur weiteren Validierung der Messmethode wurde im Anschluss der Einfluss der eingesetzten Verdünnungslösung geprüft.

#### 1. Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität von Serum eines gesunden Menschen und Aqua ad iniectiones als Verdünnungslösung

Die Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsbestimmung mit einer Verdünnungsreihe von Serum des gesunden Individuums und Wasser als Verdünnungslösung sind graphisch in Abbildung 11 dargestellt.

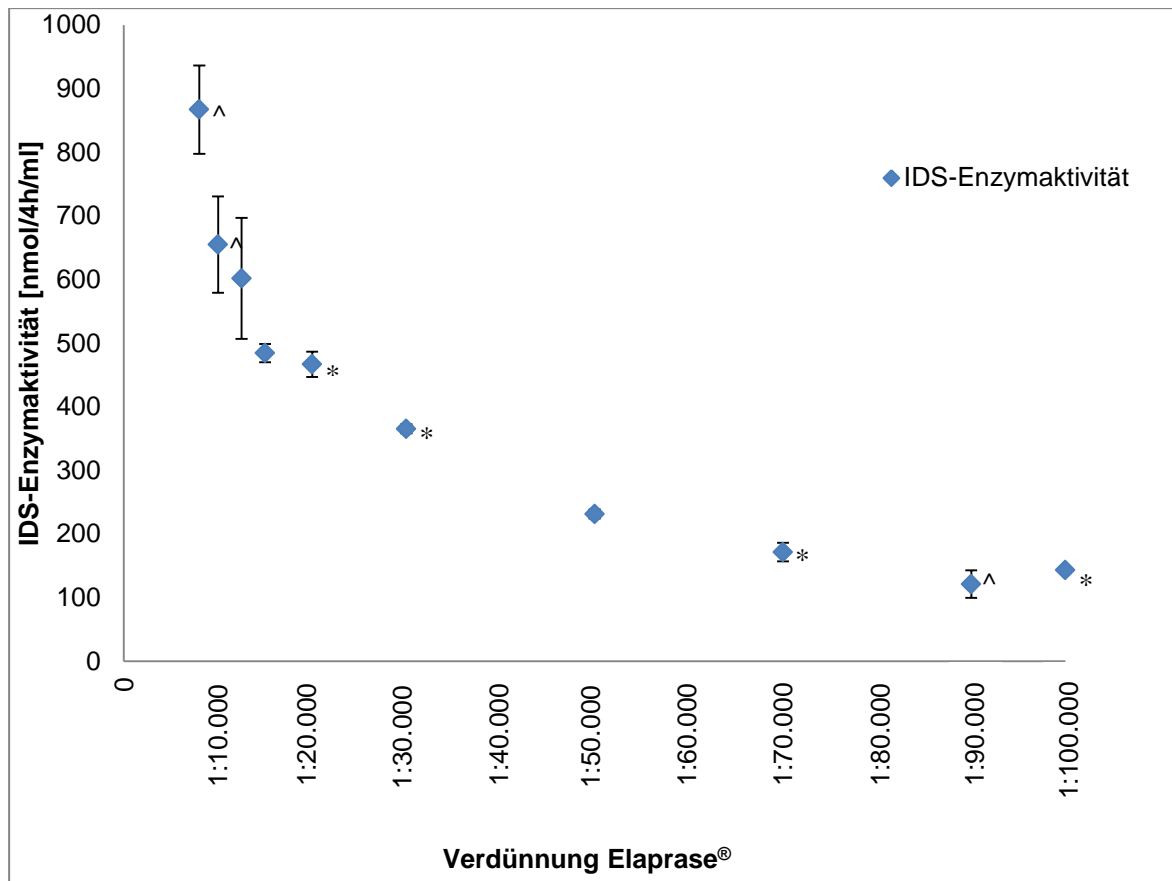


**Abbildung 11: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung der Verdünnungsreihe von Serum eines Gesunden (10% bis 100%, Verdünnungslösung Aqua ad iniectabilia (\*n=3, ^n=2))**

Mit steigendem Anteil des Serums eines Gesunden steigt die Enzymaktivität an. Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt einen S-förmigen Verlauf. Bei 40% Anteil an Serum und einer IDS-Enzymaktivität von 195 nmol/4h/ml zeigt die Enzymaktivität bei einem Anteil von 35% an Serum und einer IDS-Enzymaktivität von 130 nmol/4h/ml einen deutlichen Abfall.

## 2. Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität mit Elaprase® und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung

Die Verdünnungen von Serum eines gesunden Menschen und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung beinhalteten das physiologische und nicht das in der ERT eingesetzte Enzym Elaprase®. Die gemessenen IDS-Enzymaktivitäten der Verdünnungsreihe der in der ERT eingesetzten Elaprase® sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt.



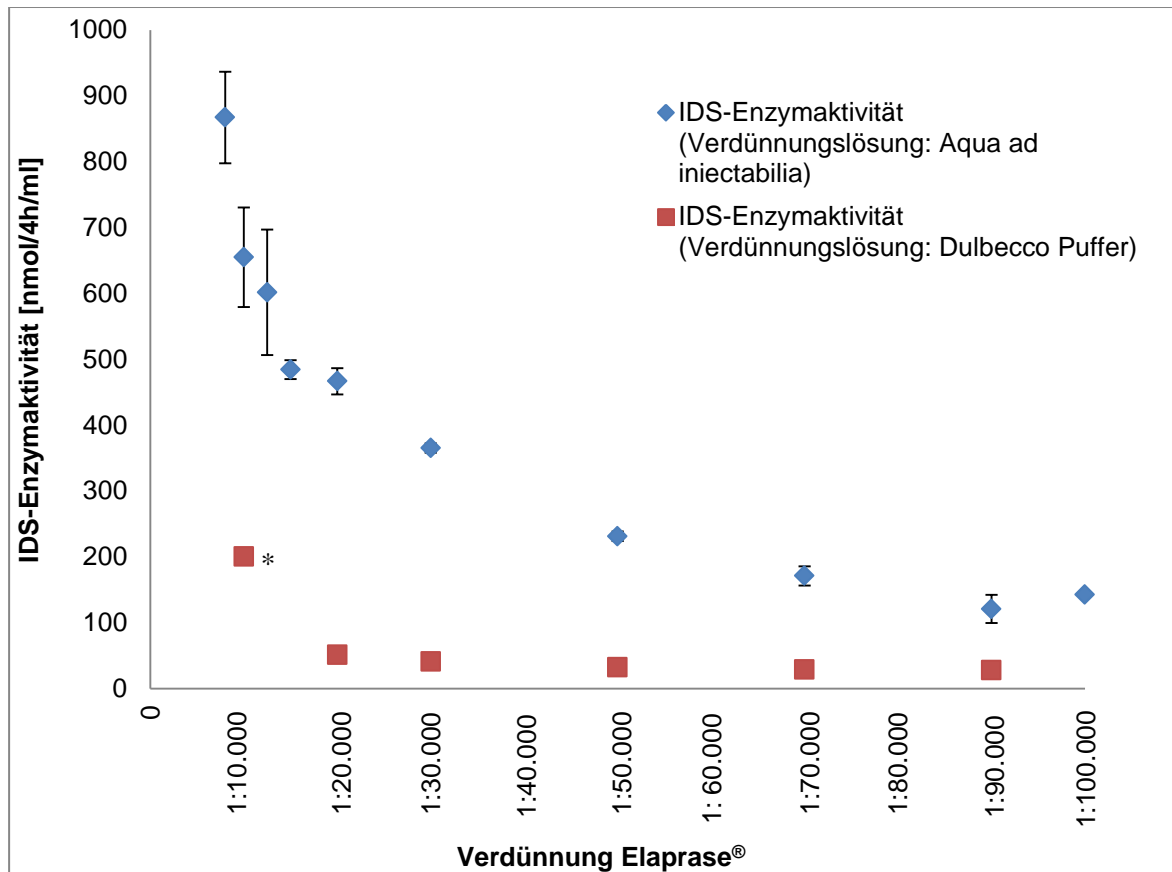
**Abbildung 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung von ausgewählten Elaprase®-Verdünnungen mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung (\*n=3, ^n=2)**

Auch bei der rekombinanten Enzymvariante wurden bei stärkeren Verdünnungen geringere Enzymaktivitäten gemessen. Nur bei sehr hohen Elaprase®-Konzentrationen waren die Standardabweichungen sehr groß und die Messergebnisse in diesen Konzentrationsbereichen als nicht valide einzustufen.

### 3. Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität mit Elaprase® und Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung

In einer weiteren Verdünnungsreihe wurde Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung für Elaprase® eingesetzt. Entgegen der Erwartung erwies sich der Einsatz einer physiologischen Verdünnungslösung als ungeeignet. Die gemessenen IDS-Aktivitäten waren im Vergleich zu den Ergebnissen mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung deutlich erniedrigt. Bei der 1:10.000 Verdünnung von Elaprase® wurde mit Aqua ad iniectabilia bzw. Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung eine IDS-Aktivität von 655 nmol/4h/ml bzw. 200 nmol/4h/ml gemessen. Im Vergleich zu Wasser als Verdünnungslösung beträgt die Wiederfindungsrate durch-

schnittlich 20%. Die Ergebnisse sind zusammen mit den Ergebnissen der IDS-Aktivitätsmessung mit Elaprase<sup>®</sup> und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung graphisch in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13: Graphische Darstellung der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung von ausgewählten Elaprase<sup>®</sup>-Verdünnungen mit Dulbecco Puffer und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösungen (\*n=3)**

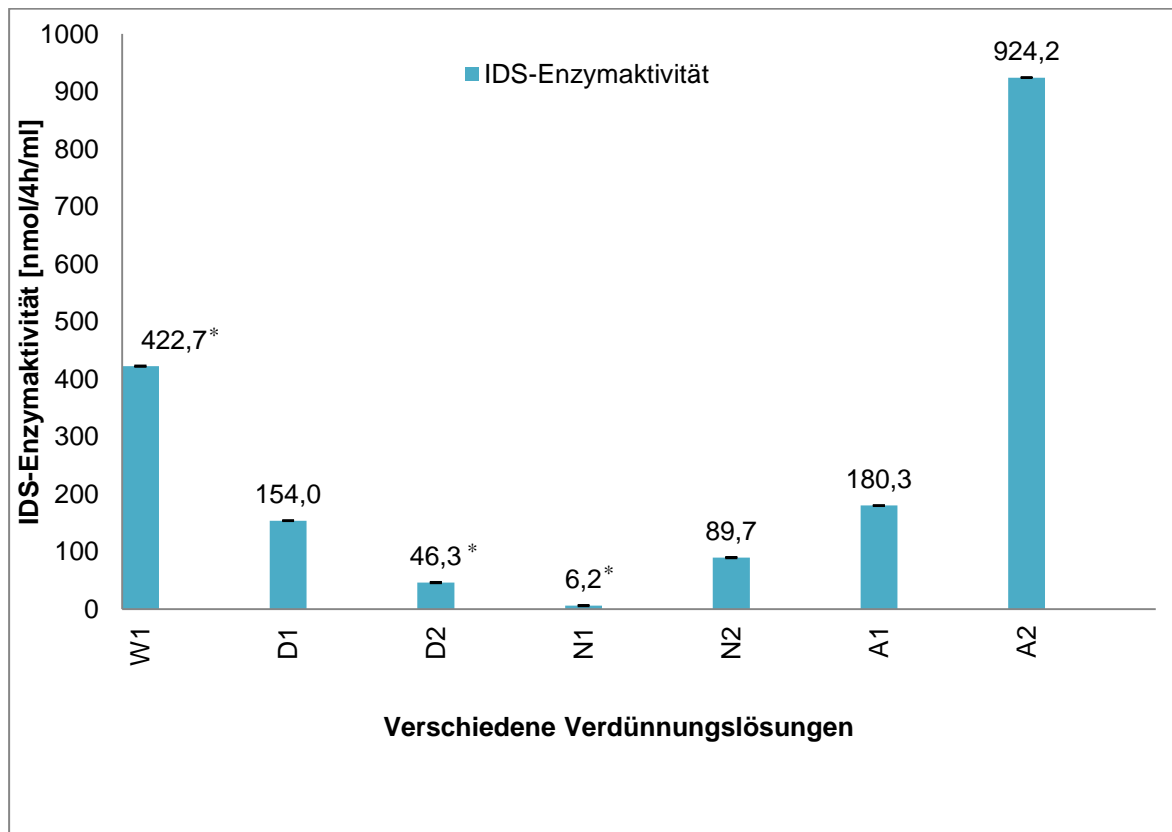
(Anzahl Proben der IDS-Enzymaktivitätsbestimmung mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung siehe Abbildung 12)

#### 4. Messung der IDS-Aktivität von Elaprase<sup>®</sup> 1:10.000 Verdünnung und vier verschiedenen Verdünnungslösungen

Der Einfluss der Art der eingesetzten Verdünnungslösungen (identisch oder verschieden in Verdünnungsschritt 1 bzw. 2) auf die Enzymaktivität von Elaprase<sup>®</sup> bei der Standardverdünnung von 1:10.000 ist in Abbildung 14 inklusive der Standardabweichungen dargestellt.

Isotone Kochsalz-Lösung mit dem Zusatz von 0,2% Humanalbumin zeigte die höchste Enzymaktivität, wenn beide Verdünnungsschritte – Herstellung der

1:10.000 Verdünnung und der 1:5 Verdünnung aus Inkubationsschritt 1 – mit dieser Verdünnungslösung erfolgten. Die zweithöchste Enzymaktivität wurde mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung in beiden Verdünnungsschritten gemessen. Alle anderen Verdünnungslösungen führten zu niedrigeren Messwerten. Die Art der Verdünnungslösung hat einen sehr starken Einfluss auf die Enzymaktivität. Hohe Elektrolytkonzentrationen wirken sich nachteilig auf die Enzymaktivität aus.



**Abbildung 14: Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IDS-Enzymaktivität der 1:10.000 Verdünnung von Elaprase® mit vier verschiedenen Verdünnungslösungen (\*n=3)**

W1: Verdünnungsschritt 1 und 2: Aqua ad iniectabilia

D1: Verdünnungsschritt 1: Dulbecco Puffer; Verdünnungsschritt 2: Aqua ad iniectabilia

D2: Verdünnungsschritt 1 und 2: Dulbecco Puffer

N1: Verdünnungsschritt 1: Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%; Verdünnungsschritt 2: Aqua ad iniectabilia

N2: Verdünnungsschritt 1 und 2: Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%

A1: Verdünnungsschritt 1: Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% und Zusatz von 0,2% Humanalbumin; Verdünnungsschritt 2: Aqua ad iniectabilia

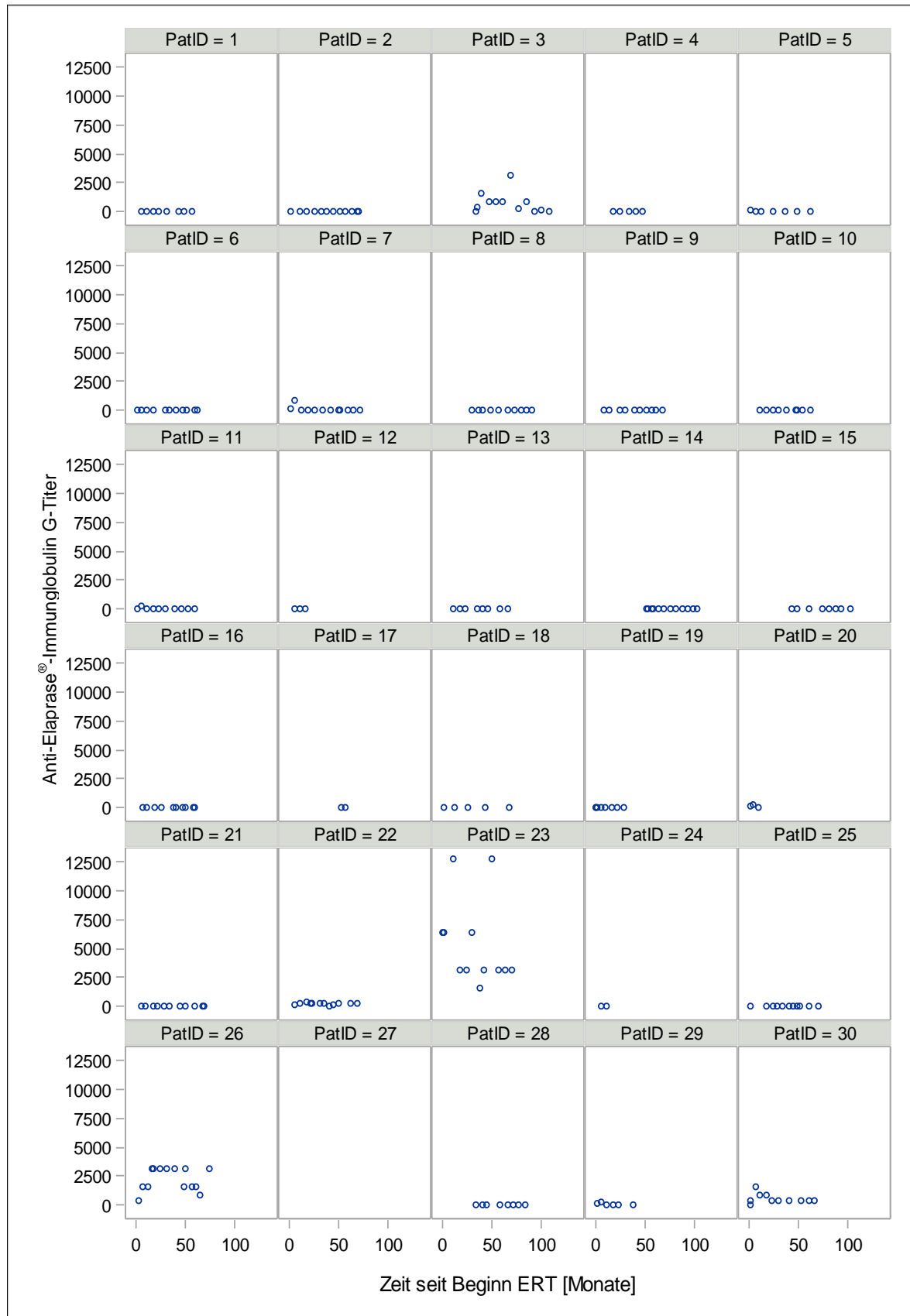
A2: Verdünnungsschritt 1 und 2: Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% und Zusatz von 0,2% Humanalbumin

### **4.3 Ergebnisse der Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin G und E Bestimmungen bei Morbus Hunter-Patienten**

Bei 29 Studienteilnehmern wurden im Rahmen der regelmäßigen Verlaufskontrollen von 2006 bis 2012 in 255 Blutproben extern auf Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin G und Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin E geprüft. Die Resultate vom Jahr 2013 standen zum Auswertzeitpunkt aus logistischen Gründen noch nicht zur Verfügung und konnten nicht in die Auswertung mit eingehen. Für Patient Nr. 27, der im Jahr 2013 die ERT begann, standen keine Ergebnisse zur Verfügung.

Bei 52% (n=15) der untersuchten Patienten wurde in mindestens einer Blutprobe mit dem CSA und RIP Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin G nachgewiesen. Diese 15 M. Hunter-Patienten wurden in insgesamt 83 Proben und damit zu 33% positiv auf Anti-Elaprase<sup>®</sup>-IgG getestet. Es wurde bei keinem Patienten Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin E nachgewiesen.

Abbildung 15 zeigt die patientenindividuelle Darstellung der Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin G-Titer im Zeitverlauf nach Beginn der ERT.



**Abbildung 15: Patientenindividuelle Darstellung der Anti-Elaprase®-Immunglobulin G-Titer im Zeitverlauf nach Beginn der ERT**

Patienten Nr. 6, 13, 14, 16 und 21 zeigten Anti-Elaprase®-Immunglobulin G-Titer < 100. Diese sind aufgrund von programmtechnischer Darstellungsweise nicht abbildbar.

Nach Bestätigung der IgG-Antikörperbildung im RIP-Assay wurde in 23 Blutproben im Enzyminhibitions-Assay eine Inhibition  $\geq 40\%$  gefunden und diese Proben wurden als positiv für neutralisierende Antikörper gewertet. Es handelt sich dabei um 9% der gemessenen Proben. Bei einer Blutprobe ist unbekannt, ob trotz Anti-Elaprase<sup>®</sup>-IgG-Titer ein Enzyminhibitions-Assay durchgeführt wurde. Tabelle 20 gibt eine Übersicht über alle Patienten, die in mindestens einer Blutprobe im Inhibitionsassay eine prozentuale Enzyminhibition  $\geq 40\%$  aufwiesen.

**Tabelle 20: Ergebnisse der Anti-Elaprase<sup>®</sup>-IgG-Bestimmung für Patienten mit mindestens einmalig positiven Resultaten für neutralisierende Antikörper**

Patient N°	Datum der Blutprobe	Gemessener Titer für Anti-Elaprase <sup>®</sup> -IgG	Mittels Enzym-inhibitions-Assay ermittelte prozentuale Inhibition durch neutralisierende Antikörper [%]	Sind neutralisierende Antikörper vorhanden? (Enzyminhibition $\geq 40\%$ )
3	20.10.2006	50	Keine Angabe <sup>1</sup>	Nein
	24.11.2006	400	Keine Angabe <sup>1</sup>	Nein
	13.04.2007	1600	Keine Angabe <sup>1</sup>	<b>Ja</b>
	21.11.2007	800	Keine Angabe <sup>1</sup>	Nein
	19.06.2008	800	6	Nein
	20.01.2009	800	20	Nein
	31.08.2009	3200	21	Nein
	28.04.2010	200	15	Nein
	08.02.2011	800	0	Nein
	28.09.2011	50	4	Nein
	22.03.2012	100	12	Nein
	28.11.2012	50	6	Nein
23	07.09.2006	6400	Keine Angabe <sup>1</sup>	Keine Angabe <sup>1</sup>
	06.12.2006	6400	27	Nein
	29.08.2007	12800	94	<b>Ja</b>
	19.03.2008	3200	84	<b>Ja</b>
	24.09.2008	3200	82	<b>Ja</b>

<sup>1</sup> Die Ergebnisse der prozentualen Inhibition durch neutralisierende Antikörper sind nicht bekannt.

<sup>2</sup> Keine Testung erfolgt, da der RIP-Assay negativ ausfiel.



Patient N°	Datum der Blutprobe	Gemessener Titer für Anti-Elaprase®-IgG	Mittels Enzym-inhibitions-Assay ermittelte prozentuale Inhibition durch neutralisierende Antikörper [%]	Sind neutralisierende Antikörper vorhanden? (Enzyminhibition $\geq 40\%$ )
23	25.03.2009	6400	93	<b>Ja</b>
	01.12.2009	1600	55	<b>Ja</b>
	25.03.2010	3200	89	<b>Ja</b>
	08.11.2010	12800	Unzureichende Probenmenge	
	31.05.2011	3200	59	<b>Ja</b>
	15.12.2011	3200	56	<b>Ja</b>
	02.08.2012	3200	50	<b>Ja</b>
26	07.12.2006	400	Keine Angabe <sup>1</sup>	Nein
	25.04.2007	1600	Keine Angabe <sup>1</sup>	Nein
	25.09.2007	1600	Keine Angabe <sup>1</sup>	<b>Ja</b>
	16.01.2008	3200	Keine Angabe <sup>1</sup>	<b>Ja</b>
	01.04.2008	3200	Keine Angabe <sup>1</sup>	<b>Ja</b>
	24.09.2008	3200	92	<b>Ja</b>
	04.05.2009	3200	78	<b>Ja</b>
	16.12.2009	3200	60	<b>Ja</b>
	23.09.2010	1600	24	Nein
	01.12.2010	3200	76	<b>Ja</b>
	23.05.2011	1600	64	<b>Ja</b>
	06.10.2011	1600	64	<b>Ja</b>
	23.01.2012	800	35	Nein
19.11.2012	3200	34	Nein	
29	30.03.2009	160	43	<b>Ja</b>
	03.08.2009	200	34	Nein
	27.01.2010	50	9	Nein
	17.08.2010	0	Keine Testung <sup>2</sup>	Keine Testung <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Die Ergebnisse der prozentualen Inhibition durch neutralisierende Antikörper sind nicht bekannt.

<sup>2</sup> Keine Testung erfolgt, da der RIP-Assay negativ ausfiel.

Patient N°	Datum der Blutprobe	Gemessener Titer für Anti-Elaprase®-IgG	Mittels Enzym-inhibitions-Assay ermittelte prozentuale Inhibition durch neutralisierende Antikörper [%]	Sind neutralisierende Antikörper vorhanden? (Enzyminhibition ≥ 40%)
29	09.02.2011	0	Keine Testung <sup>2</sup>	Keine Testung <sup>2</sup>
	26.04.2012	0	Keine Testung <sup>2</sup>	Keine Testung <sup>2</sup>
30	20.10.2006	50	Keine Angabe <sup>1</sup>	Nein
	24.11.2006	400	46	<b>Ja</b>
	13.04.2007	1600	66	<b>Ja</b>
	28.08.2007	800	Keine Angabe <sup>1</sup>	Nein
	17.03.2008	800	51	<b>Ja</b>
	10.09.2008	400	53	<b>Ja</b>
	23.03.2009	400	45	<b>Ja</b>
	22.02.2010	400	28	Nein
	08.03.2011	400	22	Nein
	03.11.2011	400	26	Nein
	14.03.2012	400	22	Nein

<sup>1</sup> Die Ergebnisse der prozentualen Inhibition durch neutralisierende Antikörper sind nicht bekannt.

<sup>2</sup> Keine Testung erfolgt, da der RIP-Assay negativ ausfiel.

Basierend auf den Ergebnissen der Bestimmung von Anti-Elaprase®-IgG und des Enzyminhibitions-Assays wurden die Patienten analog der Einteilung von Barbier et al. eingeordnet (148). Patienten, die isoliert oder intermittierend Anti-Elaprase®-IgG aufwiesen, wurden als Antikörper positiv gewertet (AK+). Die Antikörper galten als persistierend, wenn an drei oder mehr aufeinanderfolgenden Blutuntersuchungen innerhalb der Studie IgG-Elaprase®-Antikörper gefunden wurden, unabhängig von den Ergebnissen von weiteren Blutuntersuchungen (PAK+). Ebenso erfolgte die Definition bei neutralisierenden Antikörpern (NAK+ und PNAK+) (148). 15 von 29 Patienten (52%) wurden positiv auf Anti-Elaprase®-IgG getestet, sieben (24%) waren persistierend Anti-Elaprase®-IgG positiv. Fünf Patienten (17%) wiesen isoliert oder intermittierend neutralisierende Antikörper und drei (10%) persistierende neutralisierende Antikörper auf. Tabelle 21 zeigt eine Übersicht über den Antikörperstatus und der Beziehung von Anti-Elaprase®-IgG und neutralisierenden Antikörpern.

**Tabelle 21: Antikörperstatus und die Beziehung zwischen dem Auftreten von Anti-Elaprased<sup>®</sup>-IgG und neutralisierenden Antikörpern in Anzahl der Patienten**

	<b>AK+ (N = 15)</b>	<b>PAK+ (N = 7)</b>	<b>NAK+ (N = 5<sup>1</sup>)</b>	<b>PNAK+ (N = 3<sup>1</sup>)</b>	<b>Total (N = 29)</b>
AK+	-	7 (100%)	5 (100%)	3 (100%)	15 (52%)
PAK+	7 (47%)	-	5 (100%)	3 (100%)	7 (24%)
NAK+	5 (33%)	5 (71%)	-	3 (100%)	5 (17%)
PNAK+	3 (20%)	3 (43%)	3 (60%)	-	3 (10%)

Die Prozente beziehen sich auf die Gesamtanzahl der Patienten innerhalb des Antikörperstatus.

<sup>1</sup> Bei Patient Nr. 23 fehlen zwei Ergebnisse des Inhibitions-Assays (siehe Tabelle 20). Diese Blutproben wurden als negativ für neutralisierende Antikörper gewertet. Die Zuordnung war jedoch aufgrund der restlichen Ergebnisse nicht relevant für die Einteilung des Patienten.

Bei drei Patienten wurden von Shire Pharmaceuticals persistierende neutralisierende Antikörper (PNAK+) gefunden. Dabei handelt es sich um die Patienten 23, 26 und 30. Bei Patient Nr. 23 und 26 waren bei der Messung der IDS-Aktivität im Mischserum auch wiederholt um  $\geq 40\%$  reduzierte Enzymaktivitäten gemessen worden (siehe 4.2.1). Bei Patient Nr. 30 wurden insgesamt elfmal von Shire Pharmaceuticals auf Anti-Elaprased<sup>®</sup>-IgG und neutralisierende Antikörper getestet. In den Jahren 2006 – 2009 wurden dabei neutralisierende Antikörper nachgewiesen. Die Messungen von Shire Pharmaceuticals sind ab Februar 2010 ebenfalls negativ (siehe Tabelle 20). Die Messung der IDS-Enzymaktivität im Mischserum erfolgte bei diesem Patienten ab März 2011 und zeigte ebenfalls keine  $\geq 40\%$  reduzierte Aktivität im Mischserum (siehe Tabelle 16).

#### **4.4 Ergebnisse und Korrelation der biochemischen und klinischen Parameter mit Antikörperbestimmungen**

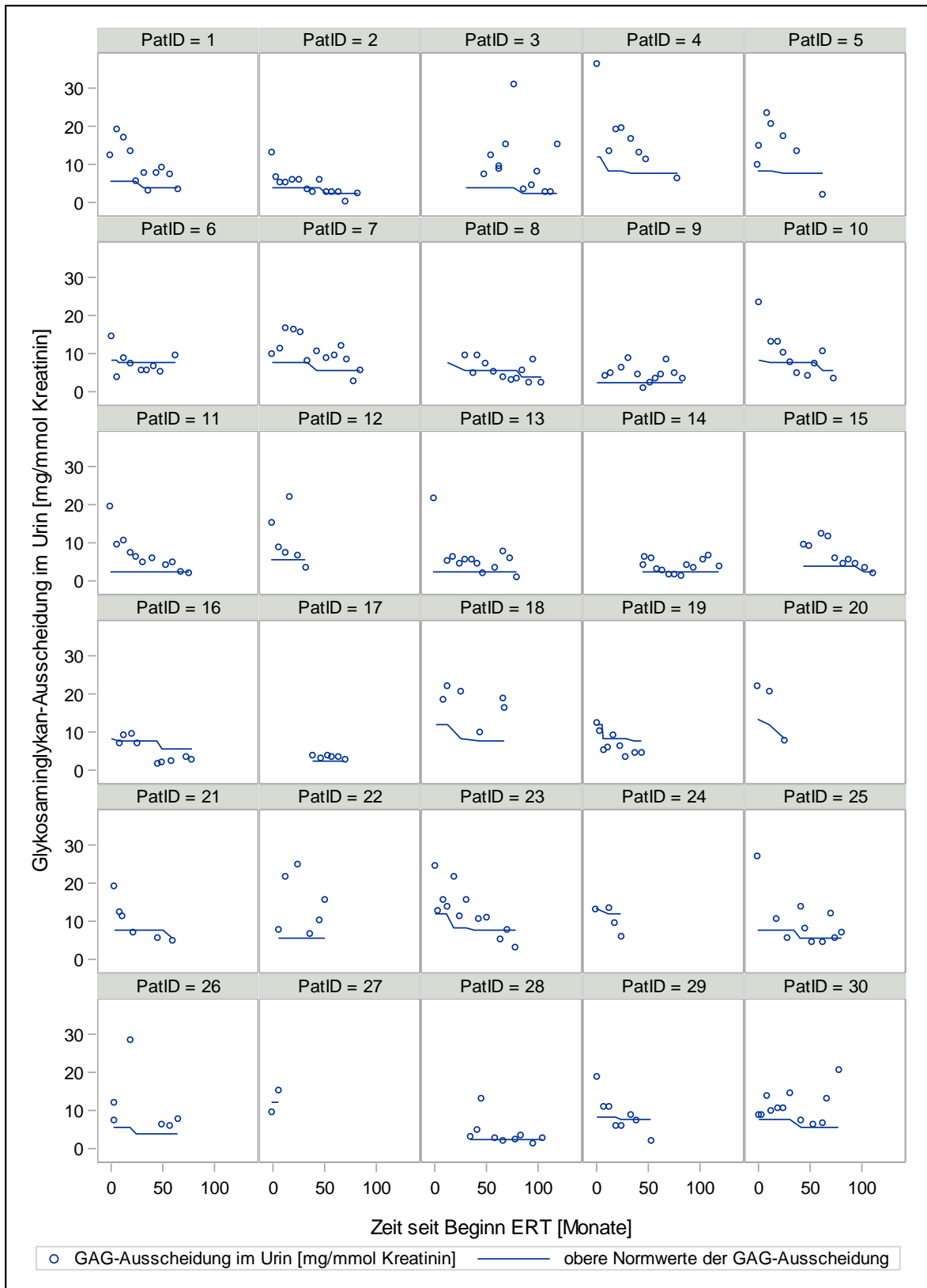
Zur Klärung der Frage, ob sich Antikörperbildung negativ auf die Klinik der Patienten auswirkt, wurden biochemische und klinische Parameter bei den teilnehmenden M. Hunter-Patienten im Verlauf erhoben.

##### **4.4.1 Glykosaminoglykan-Ausscheidung (DMB-Test)**

Die Quantifizierung der GAG-Ausscheidung wurde zwischen 2006 und 2013 in 268 Urinproben von 30 Patienten durchgeführt. Dies entspricht im Durchschnitt 8,9

Proben pro Patient. Die maximale GAG-Ausscheidung betrug 36,5 und die minimale 0,6 mg/mmol Kreatinin.

Abbildung 16 zeigt eine patientenindividuelle Darstellung der GAG-Ausscheidung im Urin im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneten altersabhängigen oberen Normwerten.



**Abbildung 16: Patientenindividuelle Darstellung der GAG-Ausscheidung im Urin im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneten altersabhängigen oberen Normwerten**

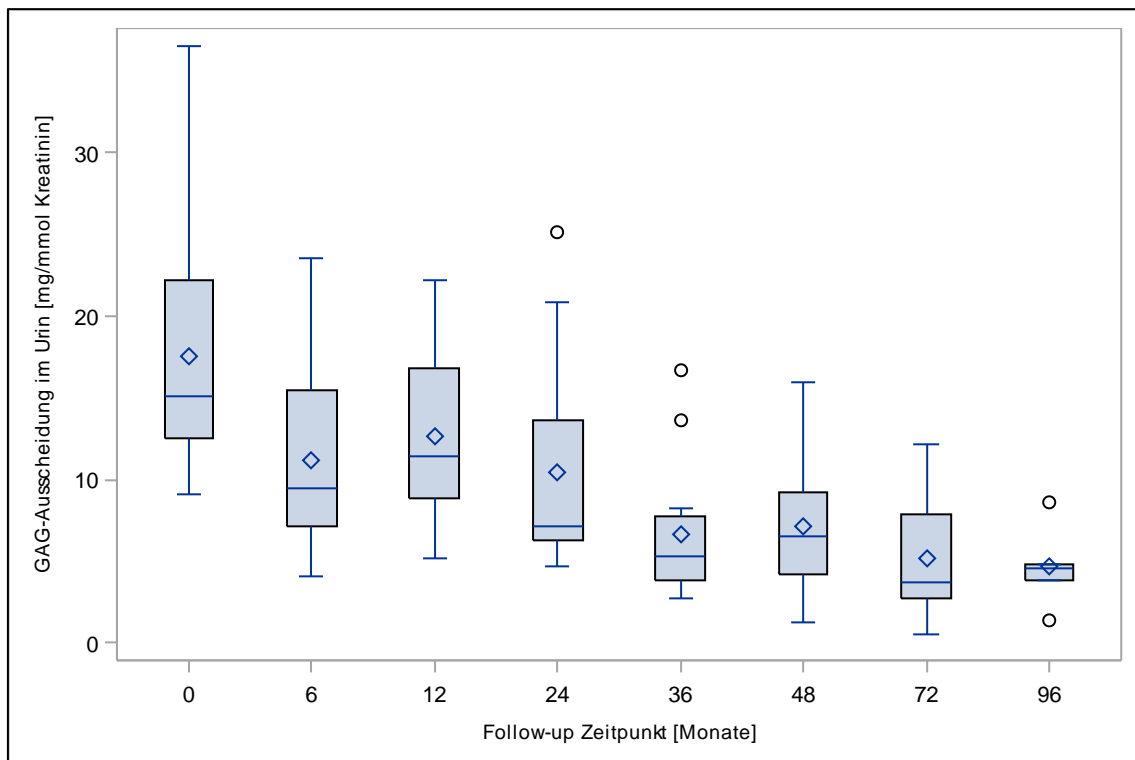
Die patientenindividuellen Verläufe lassen keine generelle Aussage zur Entwicklung der GAG-Ausscheidung im Urin für auf das Gesamtkollektiv der Patienten zu. Es ist allenfalls eine geringe Tendenz zu einer abnehmenden GAG-Ausscheidung im Urin erkennbar ist (siehe Abbildung 16). Die Patienten wurden eingeteilt, ob eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung der GAG-Ausscheidung im Urin seit Beginn der ERT eingetreten ist. Die gemessenen Werte wurden dazu ins Verhältnis zu den Normwerten gesetzt.

**Tabelle 22: Veränderungen der GAG-Ausscheidungen im Urin unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten**

	<b>Abnahme der GAG-Ausscheidung im Urin</b>	<b>Keine Veränderung der GAG-Ausscheidung im Urin</b>	<b>Zunahme der GAG-Ausscheidung im Urin</b>
Patientenanzahl [n=30]	16 (=53%)	13 (=43%)	1 (=3%)

Bei den Patienten Nr. 23 und 26, die als PNAK+ eingestuft waren, wurde 18-mal die GAG-Ausscheidung gemessen. Nur zwei Urinproben von Patient 23 waren unterhalb des Normwertes (=11%). Die restlichen 16 Urinproben der beiden PNAK+ Patienten waren oberhalb der Normwerte (=88%). Patient 23 zeigte im Verlauf jedoch eine Abnahme der GAG-Ausscheidung im Urin. Patient 26 hingegen blieb im Verlauf immer oberhalb der oberen Normwerte und zeigte somit keine Veränderung.

Abbildung 17 zeigt eine Box Plot-Darstellung der GAG-Ausscheidung im Urin in Abhängigkeit von der Zeit seit Beginn der ERT mit halbjährlichen und anschließend jährlichen Follow-up Zeitpunkten, bereinigt auf den letzten Wert im jeweiligen Zeitintervall (n=176).



**Abbildung 17: Box Plot-Darstellung der GAG-Ausscheidung im Urin in Abhängigkeit von der Zeit seit Beginn der ERT für die Follow-up Zeitpunkte**

In Abbildung 17 ist erkennbar, dass die GAG-Ausscheidung im Urin für das Gesamtkollektiv zu Beginn der Therapie (Zeitpunkt 0) die höchsten Werte aufweist. Die GAG-Ausscheidung im Urin nimmt im Verlauf nach Beginn der ERT ab.

#### 4.4.2 Kardiologische Beteiligung

Alle kardiologischen Parameter wurden mittels echokardiographischer Untersuchungen bestimmt.

##### 1. Relative Wanddicke des linken Ventrikels (RWT) und auf die Körperlänge indizierte linksventrikuläre Muskelmasse (LVM\_H)

Insgesamt liegen für 29 Patienten 204 Werte für die LVM\_H bzw. 221 für die RWT zwischen 1990 und 2014 vor. Dies entspricht im Durchschnitt 7 bzw. 7,6 Werten pro Patient. Ein Patient (PatID 19) wurde zu keinem Zeitpunkt in der hiesigen Kinderkardiologie des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin untersucht.

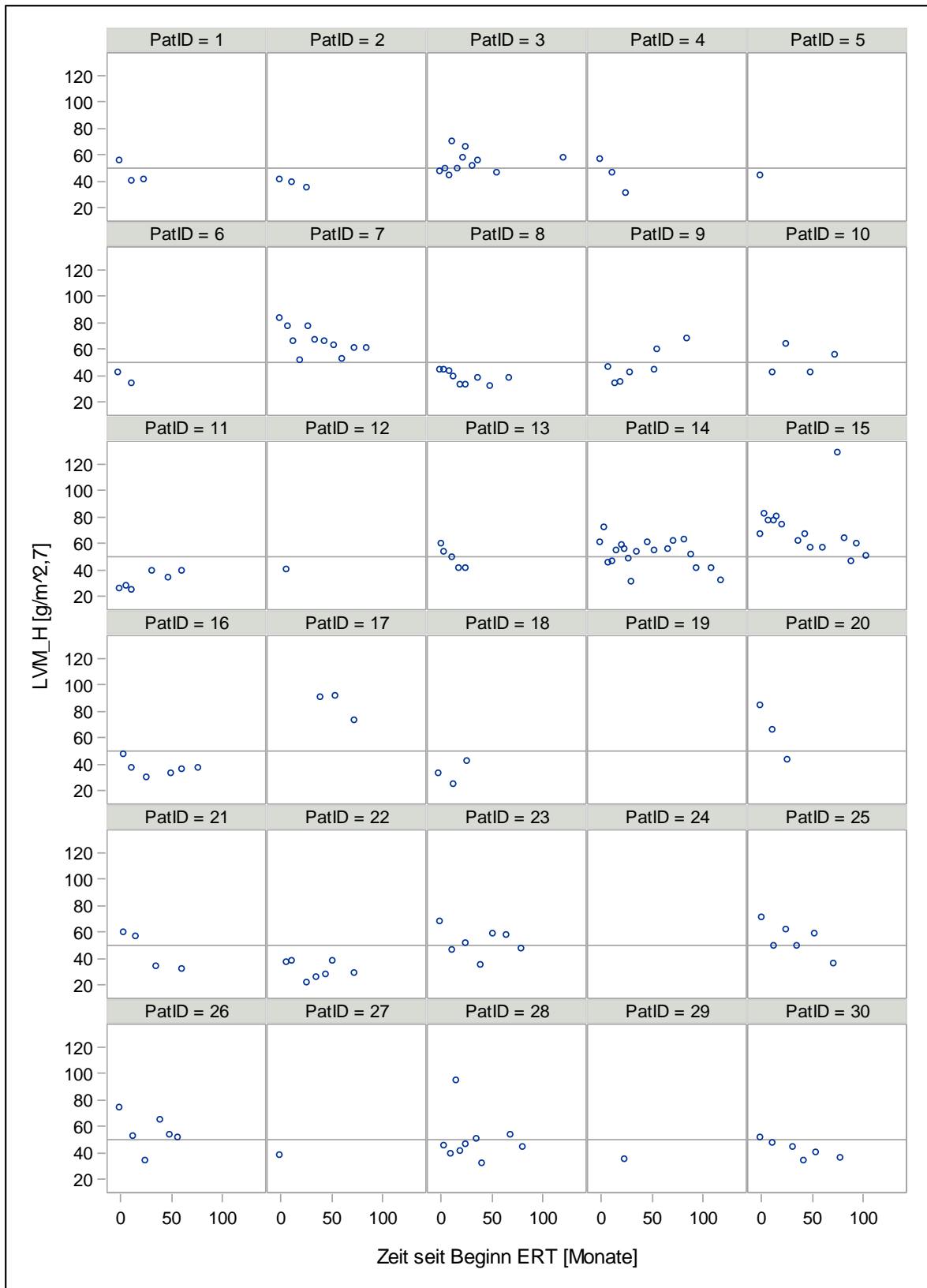
**Tabelle 23: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der LVM\_H und der RWT**

<b>Kardiologischer Parameter</b>	<b>Median</b>	<b>Minimaler Wert - Maximaler Wert</b>
LVM_H [g/m <sup>2,7</sup> ]	49,01	22,09 – 187,69
RWT [mm]	0,38	0,22 – 0,74

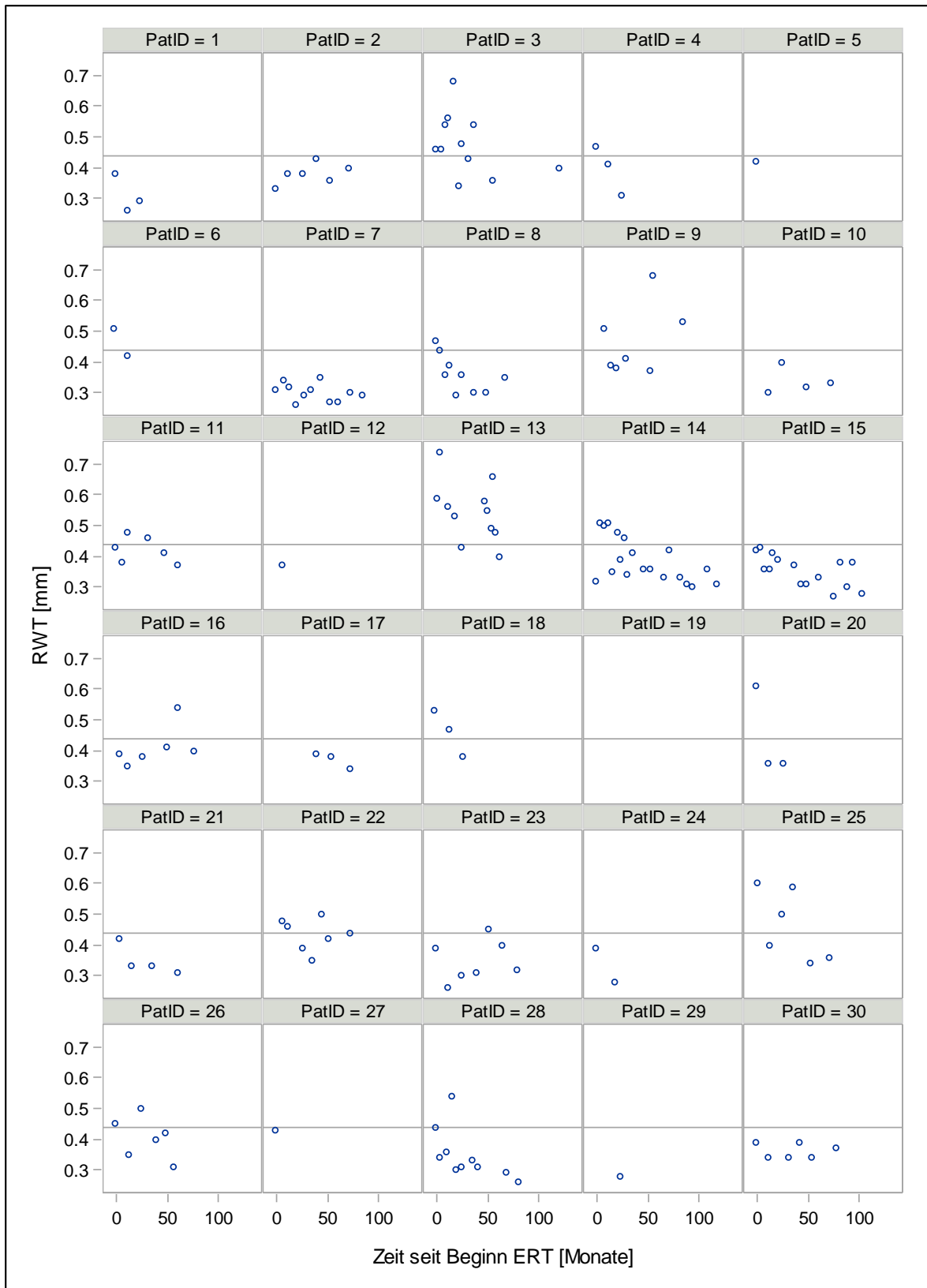
Wie aus Tabelle 23 ersichtlich, weisen die Patienten im Median keine erhöhte RWT oder hypertrophe Kardiomyopathie auf.

Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen eine patientenindividuelle Darstellung der LVM\_H und der RWT im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneten Normwerten.





**Abbildung 18: Patientenindividuelle Darstellung der LVM\_H im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichnetem Normwert**



**Abbildung 19: Patientenindividuelle Darstellung der RWT im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichnetem Normwert**

Die patientenindividuellen Verläufe erlauben keine allgemeine Aussage hinsichtlich der Entwicklung der LVM\_H und RWT für das Gesamtkollektiv der Patienten, auch wenn eine geringe Tendenz hin zu einer abnehmenden LVM\_H und RWT erkennbar ist. In Tabelle 24 sind die Patienten bezüglich Verbesserung, keine Veränderung und Verschlechterung bezüglich LVM\_H und RWT eingeteilt.

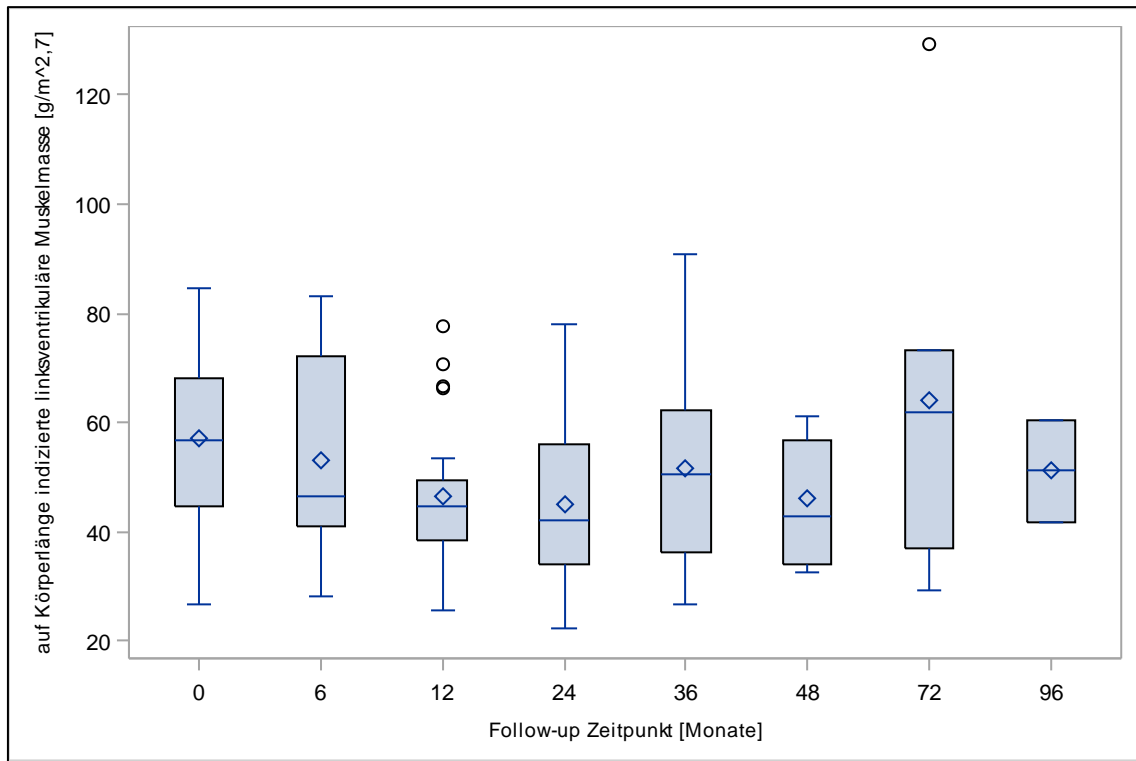
**Tabelle 24: Veränderungen der LVM\_H und RWT unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten**

	Verbesserung	Keine Veränderung	Ver-schlechterung	Fehlende Daten/ Nicht auswertbar
LVM_H (Patienten-anzahl) [n=30]	9 (=30%)	12 (=40%)	3 (=10%)	6 (=20%)
RWT (Patienten-anzahl) [n=30]	10 (=33%)	15 (=50%)	-	5 (=17%)

Patienten Nr. 5, 12, 27, 29 besitzen jeweils nur einen Wert für LVM\_H und RWT, so dass diese Patienten bzgl. einer Veränderung nicht auswertbar waren. Patient Nr. 24 hatte keine Werte für LVM\_H.

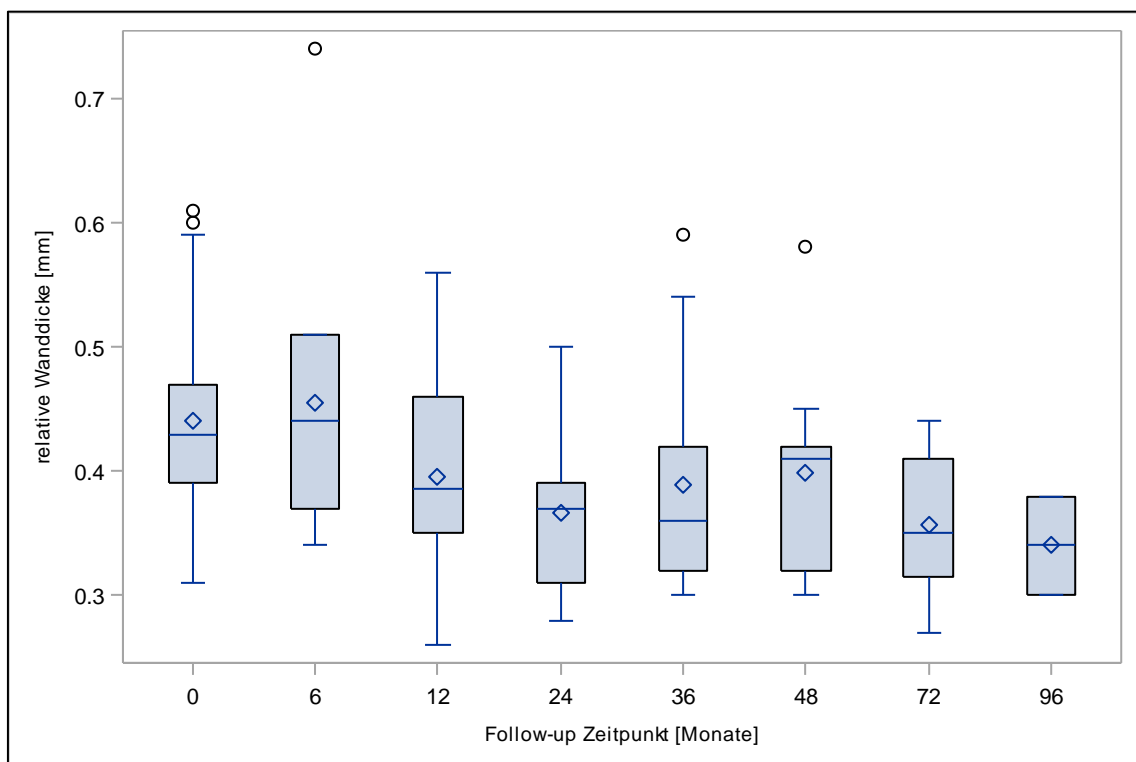
Bei den Patienten Nr. 23 und 26 mit PNAK+ wurden insgesamt 13 echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Patient Nr. 23 zeigte im Verlauf eine Verbesserung der LVM\_H und keine Veränderung der RWT. Patient Nr. 26 hingegen zeigte im Verlauf keine Veränderung der LVM\_H und eine Verbesserung der RWT.

Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen in einer Box Plot-Darstellung die Entwicklung der LVM\_H bzw. der RWT in Abhängigkeit von der Zeit seit Beginn der ERT für die festgelegten Follow-up Zeitpunkte, bereinigt auf den letzten Wert im jeweiligen Zeitintervall (n=176).



**Abbildung 20: Box Plot-Darstellung der LVM\_H in Abhängigkeit von der Zeit seit Beginn der ERT für die Follow-up Zeitpunkte**

In Abbildung 20 ist erkennbar, dass die LVM\_H nach Beginn der ERT leicht abnimmt. Diese jedoch im Verlauf auch wieder ansteigt.



**Abbildung 21: Box Plot-Darstellung der RWT in Abhängigkeit von der Zeit seit Beginn der ERT für die Follow-up Zeitpunkte**

In Abbildung 21 ist erkennbar, dass die RWT nach Beginn der ERT zuerst leicht ansteigt und dann im Verlauf abnimmt.

## **2. Aortenklappeninsuffizienz (AI) und Mitralklappeninsuffizienz (MI)**

Insgesamt liegen für 28 Patienten 263 Werte für die AI und MI zwischen 1990 und 2014 vor. Dies entspricht im Durchschnitt 9,4 Werten pro Patient. Patienten Nr. 4 und 19 wurden zu keinem Zeitpunkt bzgl. AI und MI in der hiesigen Kinderkardiologie des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin untersucht.

Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen eine patientenindividuelle Darstellung der AI und MI im Zeitverlauf nach Beginn der ERT.

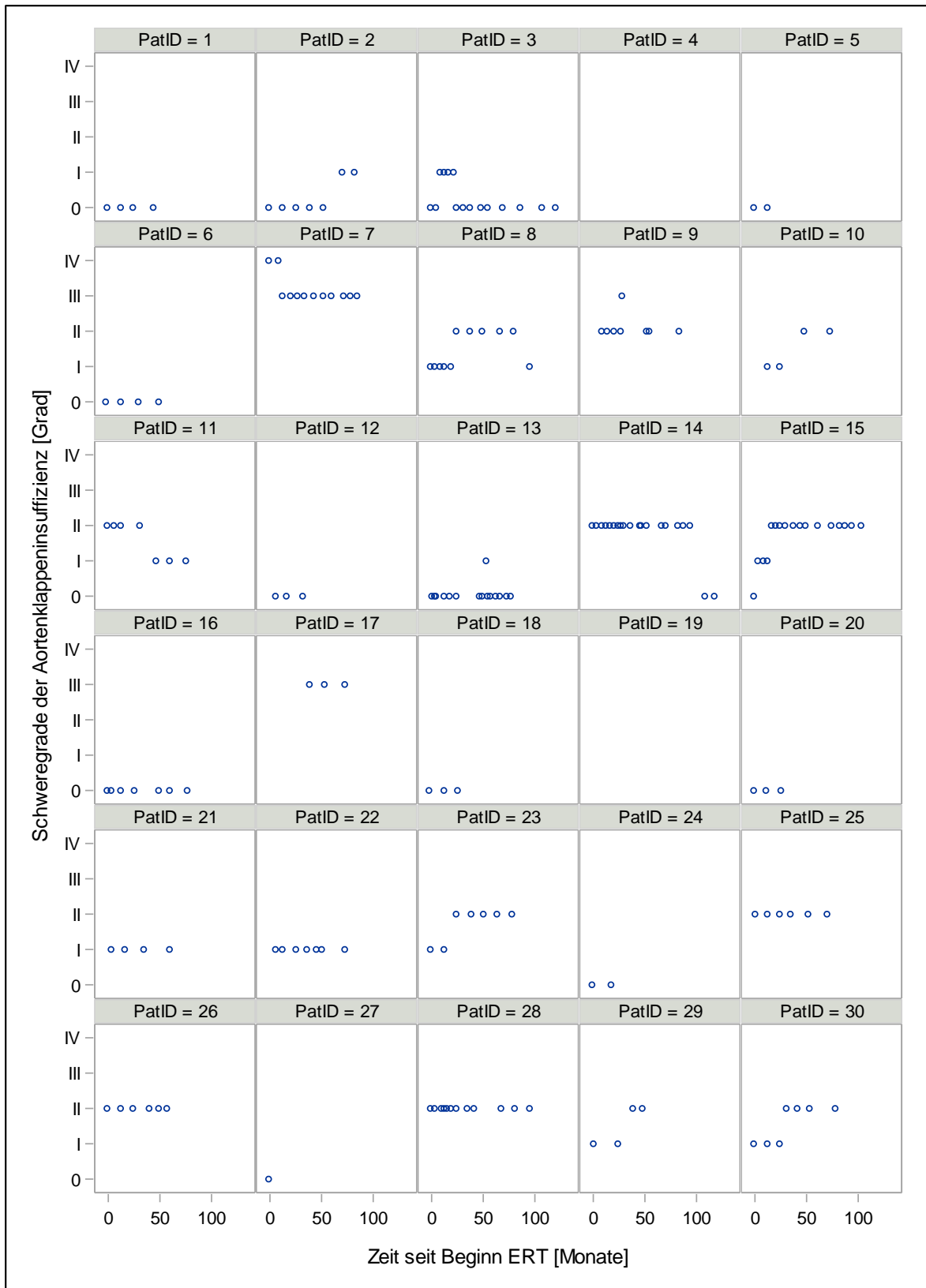


Abbildung 22: Patientenindividuelle Darstellung der Schweregrade der Aortenklappeninsuffizienz im Zeitverlauf nach Beginn der ERT

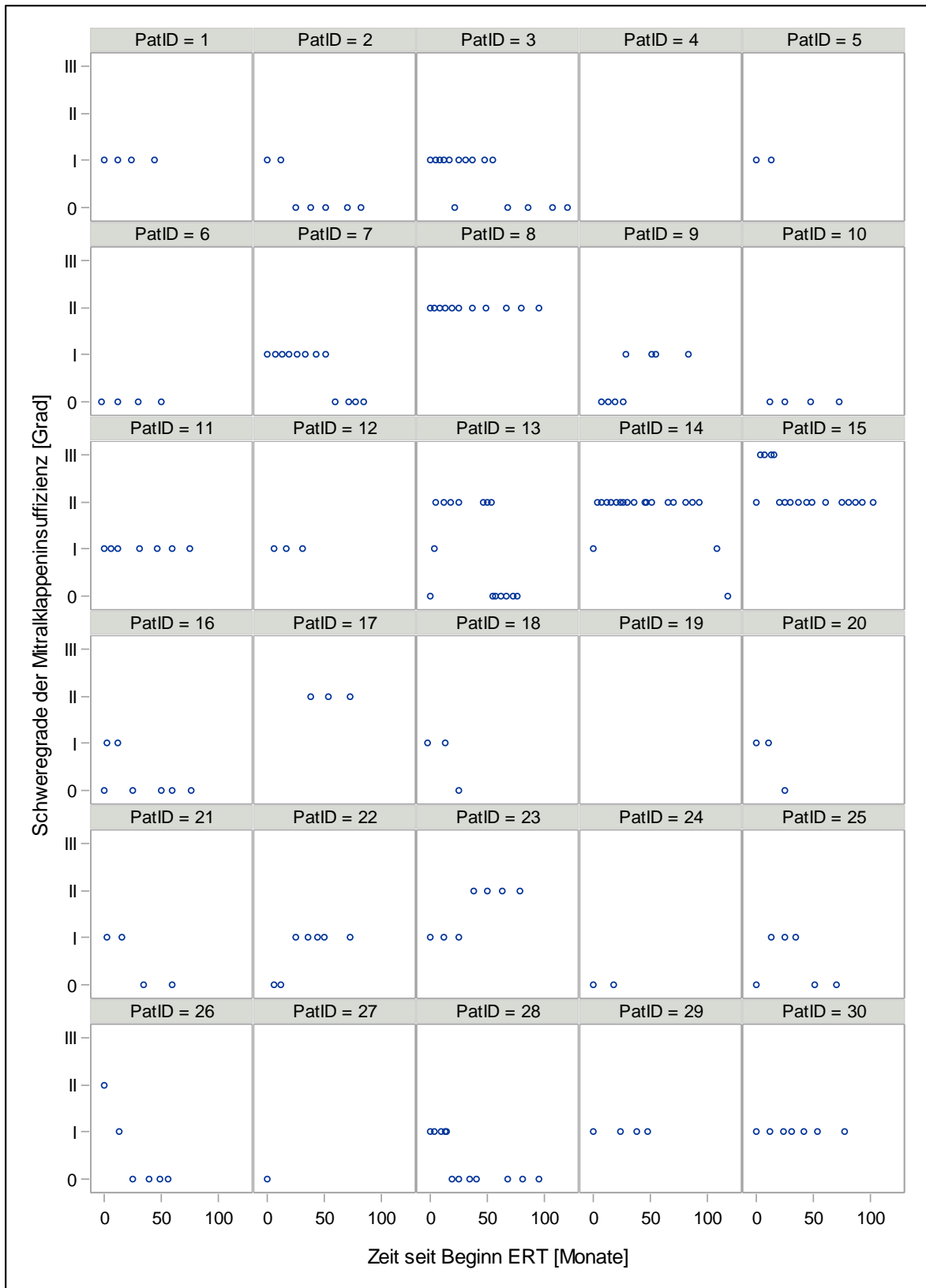


Abbildung 23: Patientenindividuelle Darstellung der Schweregrade der Mitralklappeninsuffizienz im Zeitverlauf nach Beginn der ERT

Die Verteilung innerhalb der patientenindividuellen Verläufe lässt keine allgemeine Aussage hinsichtlich der Entwicklung der Schweregrade der AI und MI für das Gesamtkollektiv der Patienten zu. Es ist allenfalls eine geringe Tendenz hin zu einem abnehmenden Schweregrad der AI und MI erkennbar. Die Kategorisierung der Patienten als Verbesserung, keine Veränderung, Verschlechterung der AI und MI ergab die in Tabelle 25 dargestellte Verteilung.

**Tabelle 25: Veränderungen der MI bzw. AI unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten**

	Verbesserung der MI bzw. AI	Keine Veränderung der MI bzw. AI	Ver- schlechterung der MI bzw. AI	Fehlende Daten/ Nicht auswertbar
AI (Patienten- anzahl) [n=30]	3 (=10%)	18 (=60%)	6 (=20%)	3 (=10%)
MI (Patienten- anzahl) [n=30]	9 (=30%)	15 (=50%)	3 (=10%)	3 (=10%)

Patient Nr. 19 wurde zu keinem Zeitpunkt in der hiesigen Kinderkardiologie des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin untersucht. Für den Patient Nr. 27 bzw. 4 liegt jeweils nur ein bzw. kein Wert für MI und AI vor.

Bei den Patienten Nr. 23 und 26 mit PNAK+ wurden insgesamt 13 echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Patient 23 zeigte im Verlauf eine Verschlechterung der MI und AI. Patient 26 hingegen zeigte im Verlauf keine Veränderung der AI, die MI verbessert sich sogar im Verlauf um einen Schweregrad.

### **3. Aortenstenose (AS) und Mitralstenose (MS)**

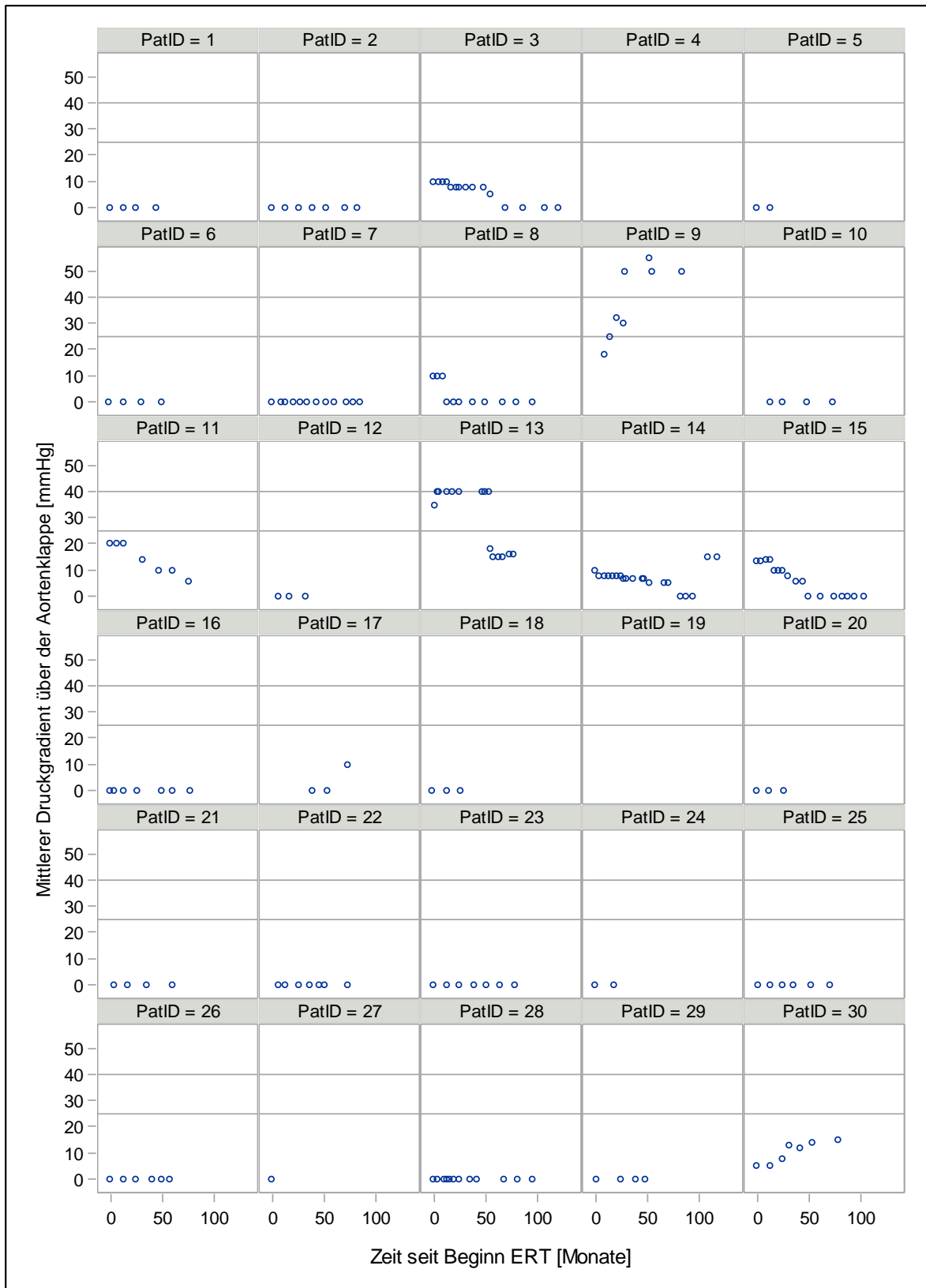
Insgesamt liegen für 28 Patienten 263 Werte für die AS und MS zwischen 1990 und 2014 vor. Dies entspricht im Durchschnitt 9,4 Werten pro Patient. Patienten Nr. 4 und 19 wurden zu keinem Zeitpunkt bzgl. AS und MS in der hiesigen Kinderkardiologie des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin untersucht.



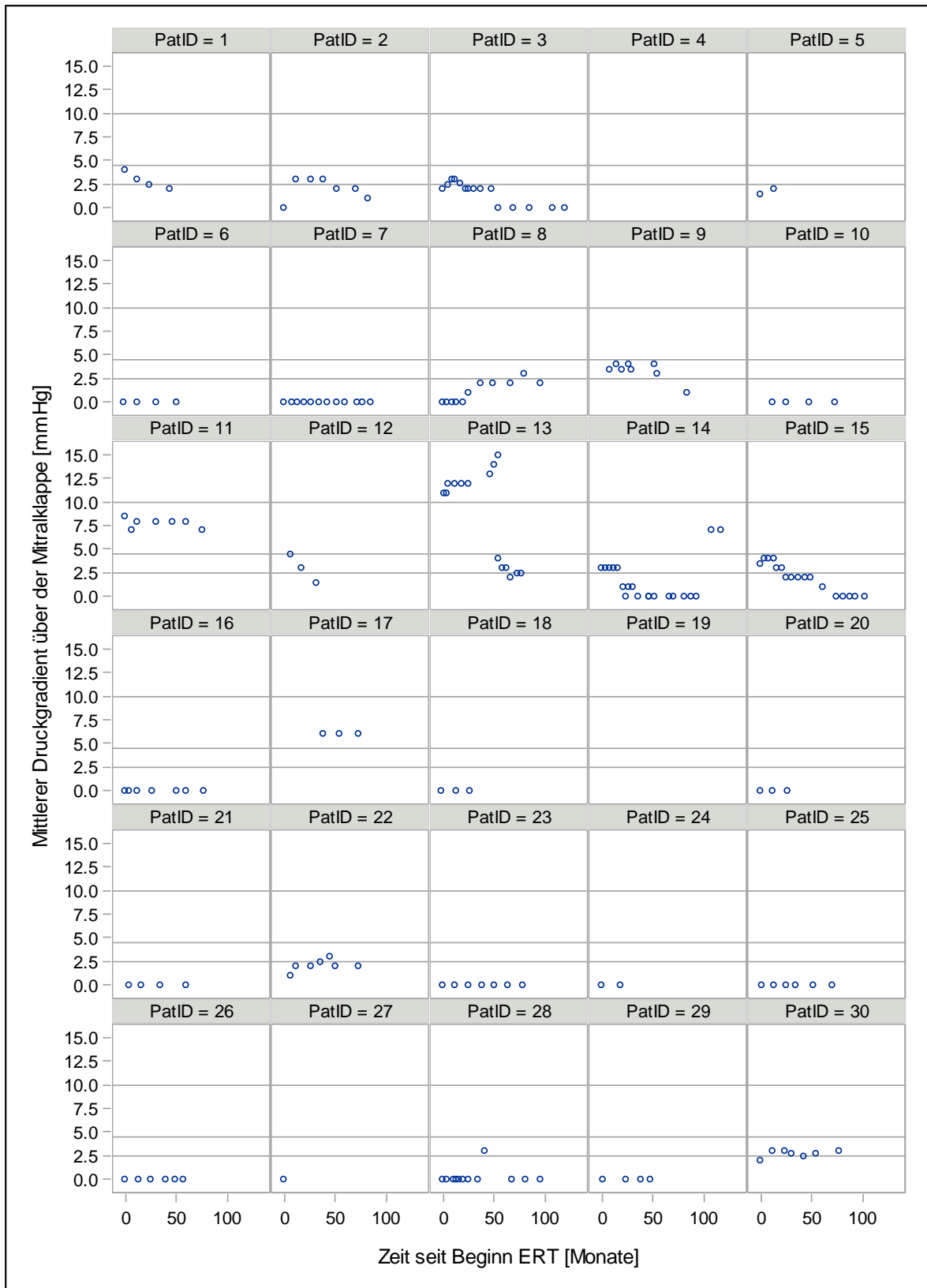
**Tabelle 26: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der mittleren Druckgradienten über der Aorten- bzw. Mitralklappe**

<b>Kardiologischer Parameter</b>	<b>Median</b>	<b>Minimaler Wert - Maximaler Wert</b>
Mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe [mmHg]	0	0 – 55
Mittlerer Druckgradient über der Mitralklappe [mmHg]	1	0 - 15

Abbildung 24 und Abbildung 25 zeigen eine patientenindividuelle Darstellung der mittleren Druckgradienten über der Aorten- bzw. Mitralklappe im Zeitverlauf nach Beginn der ERT.



**Abbildung 24: Patientenindividuelle Darstellung der mittleren Druckgradienten über der Aortenklappe im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneter Einteilung für die Schweregrade der Aortenstenose entsprechend dem mittleren Druckgradienten über der jeweiligen Klappe [mmHg]**



**Abbildung 25: Patientenindividuelle Darstellung der mittleren Druckgradienten über der Mitralklappe im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneter Einteilung für die Schweregrade der Mitralklappe entsprechend dem mittleren Druckgradienten über der jeweiligen Klappe [mmHg]**

Die Verteilung innerhalb der patientenindividuellen Verläufe lässt keine allgemeine Aussage hinsichtlich der Entwicklung der Schweregrade der Stenosen für das Gesamtkollektiv der Patienten zu. Die Kategorisierung der Patienten als Verbesserung, keine Veränderung, Verschlechterung der AS und MS ergab die in Tabelle 27 dargestellte Verteilung.

**Tabelle 27: Veränderungen der MS bzw. AS unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten**

	<b>Verbesserung der AS bzw. MS</b>	<b>Keine Veränderung der AS bzw. MS</b>	<b>Ver- schlechterung der AS bzw. MS</b>	<b>Fehlende Daten/ Nicht auswertbar</b>
AS (Patienten- anzahl) [n=30]	4 (=13%)	21 (=70%)	2 (=7%)	3 (=10%)
MS (Patienten- anzahl) [n=30]	5 (=17%) <sup>1</sup>	20 (=67%) <sup>1</sup>	2 (=7%) <sup>1</sup>	3 (=10%) <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Summe der Prozentzahlen liegt aufgrund von Rundungsdifferenzen bei 101%.

Für Patient Nr. 4 und 19 liegen keine und für Patient Nr. 27 nur ein Wert für Stenosen vor.

Für die Patienten Nr. 23 und 26 mit PNAK+ zeigten sich im Verlauf keine Veränderungen der Schweregrade der Stenosen.

#### **4.4.3 Respiratorische Beteiligung**

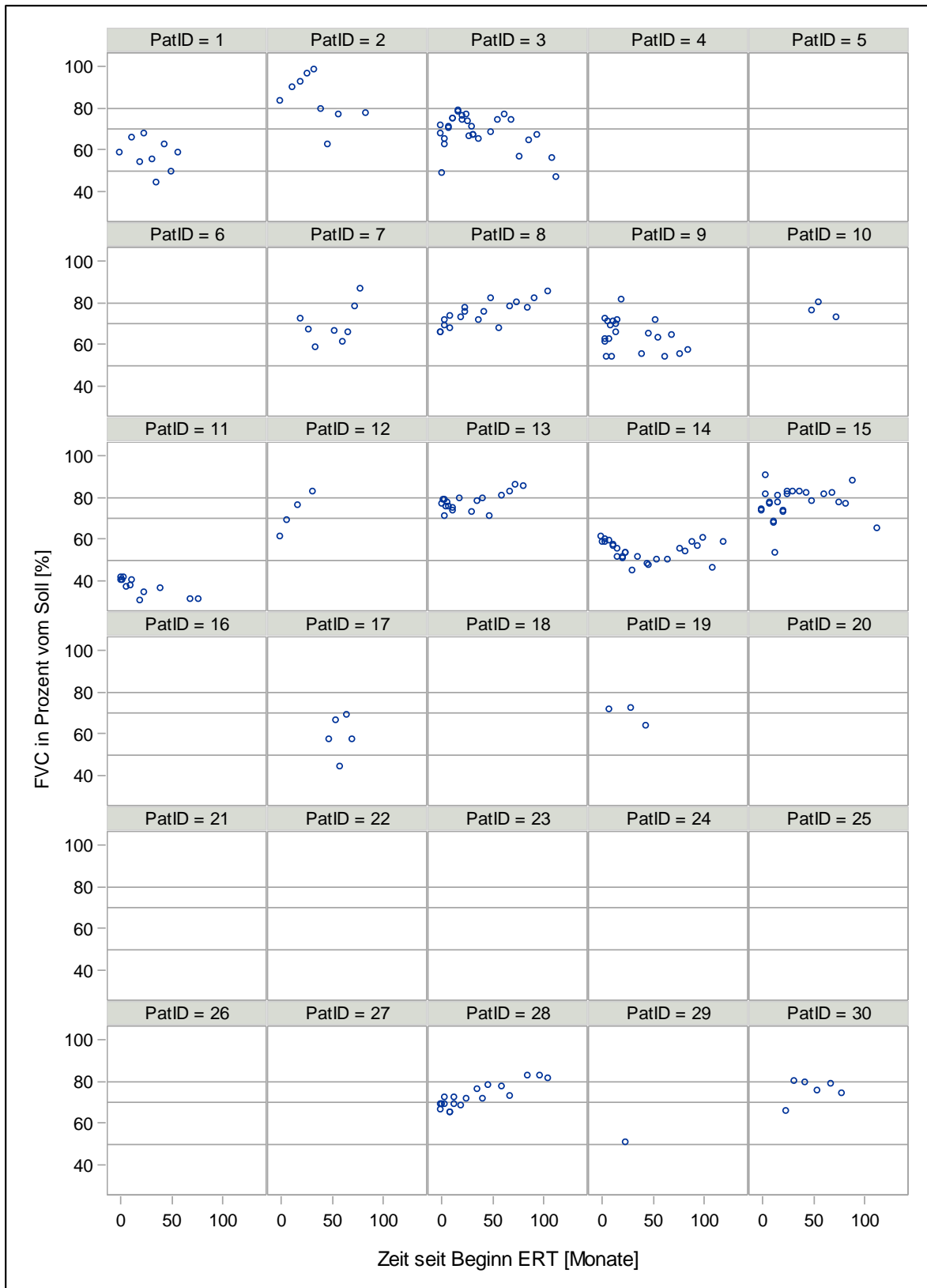
Insgesamt liegen für 18 Patienten 242 Werte für die FVC bzw. 239 für die FEV<sub>1</sub> jeweils in Prozent vom Soll für die Jahre 1993 bis 2014 vor. Dies entspricht im Durchschnitt 13,4 bzw. 13,3 Werten pro Patient. Zwölf Patienten wurde zu keinem Zeitpunkt in der hiesigen Kinderpneumologie für Kinder- und Jugendmedizin untersucht.

**Tabelle 28: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der FVC und FEV<sub>1</sub> jeweils in Prozent vom Soll**

<b>Respiratorischer Parameter</b>	<b>Median</b>	<b>Minimaler Wert - Maximaler Wert</b>
FVC in Prozent vom Soll [%]	69,52	24,1 – 98,4
FEV <sub>1</sub> in Prozent vom Soll [%]	66,1	26,8 – 96,6

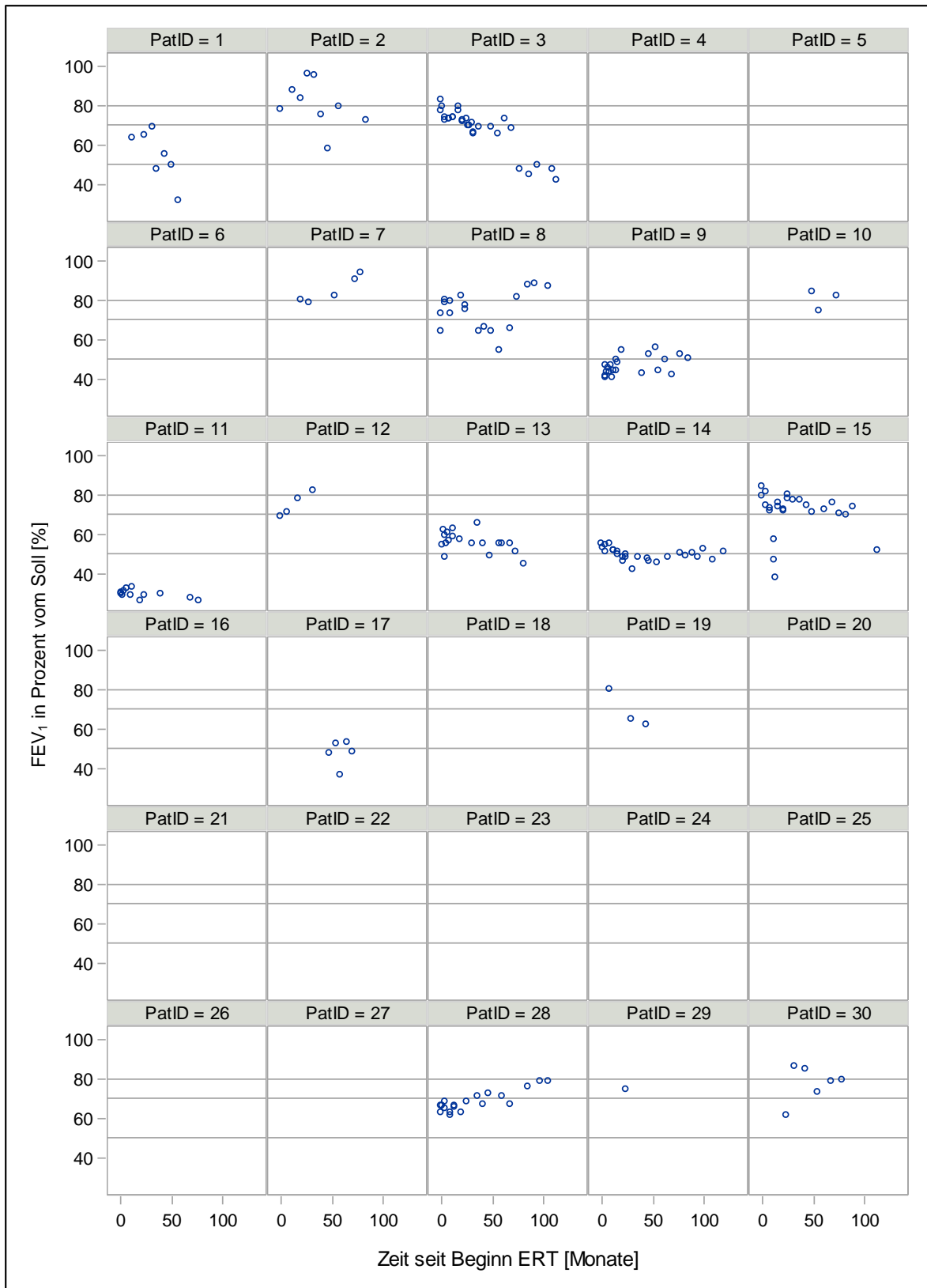
Wie aus Tabelle 28 ersichtlich liegt im Median eine moderate Einschränkung der beiden untersuchten respiratorischen Parameter der M. Hunter-Patienten vor.

Abbildung 26 und Abbildung 27 zeigen eine patientenindividuelle Darstellung der FVC bzw. der FEV<sub>1</sub> jeweils im Prozent vom Soll im Zeitverlauf nach Beginn der ERT.



**Abbildung 26: Patientenindividuelle Darstellung der FVC in Prozent vom Soll im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneter Einteilung für die Schweregrade der Einschränkung**

Für Patient Nr. 22 sind keine Werte abgebildet, da die Spirometrie oder Bodyplethysmographie bereits > 2 Jahre vor Beginn der ERT stattfand.



**Abbildung 27: Patientenindividuelle Darstellung der FEV<sub>1</sub> in Prozent vom Soll im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneter Einteilung für die Schweregrade der Einschränkung**

Für Patient Nr. 22 sind keine Werte abgebildet, da die Spirometrie oder Bodyplethysmographie bereits > 2 Jahre vor Beginn der ERT stattfand.

Die patientenindividuellen Verläufe erlauben keine allgemeine Aussage hinsichtlich der Entwicklung der respiratorischen Beteiligung für das Gesamtkollektiv der Patienten. Die Kategorisierung der Patienten als Verbesserung, keine Veränderung, Verschlechterung der respiratorischen Beteiligung ergab die in Tabelle 29 dargestellte Verteilung.

**Tabelle 29: Veränderungen der respiratorischen Einschränkungen bezogen auf FVC und FEV<sub>1</sub> (jeweils in Prozent vom Soll) unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten**

	Verbesserung der respiratorischen Einschränkung	Keine Veränderung der respiratorischen Einschränkung	Verschlechterung der respiratorischen Einschränkung	Fehlende Daten/ Nicht auswertbar
FVC (Patientenanzahl) [n=30]	6 (=20%)	7 (=23%)	3 (=10%)	14 (=47%)
FEV <sub>1</sub> (Patientenanzahl) [n=30]	5 (=17%) <sup>1</sup>	6 (=20%) <sup>1</sup>	5 (=17%) <sup>1</sup>	14 (=47%) <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Summe der Prozentzahlen liegt aufgrund von Rundungsdifferenzen bei 101%.

Für Patient Nr. 22 und 27 liegt jeweils nur ein Messwert für FVC und FEV<sub>1</sub> in Prozent vom Soll vor, so dass diese Patienten bzgl. einer Veränderung nicht auswertbar sind.

Die Patienten Nr. 23 und 26 mit PNAK+ waren aufgrund ihrer neuropathischen Beteiligung nicht dazu fähig eine Spirometrie oder Bodyplethysmographie durchzuführen, so dass nicht auf eine Korrelation der Lungenfunktion mit dem Auftreten der persistierenden neutralisierenden Antikörper geprüft werden kann.



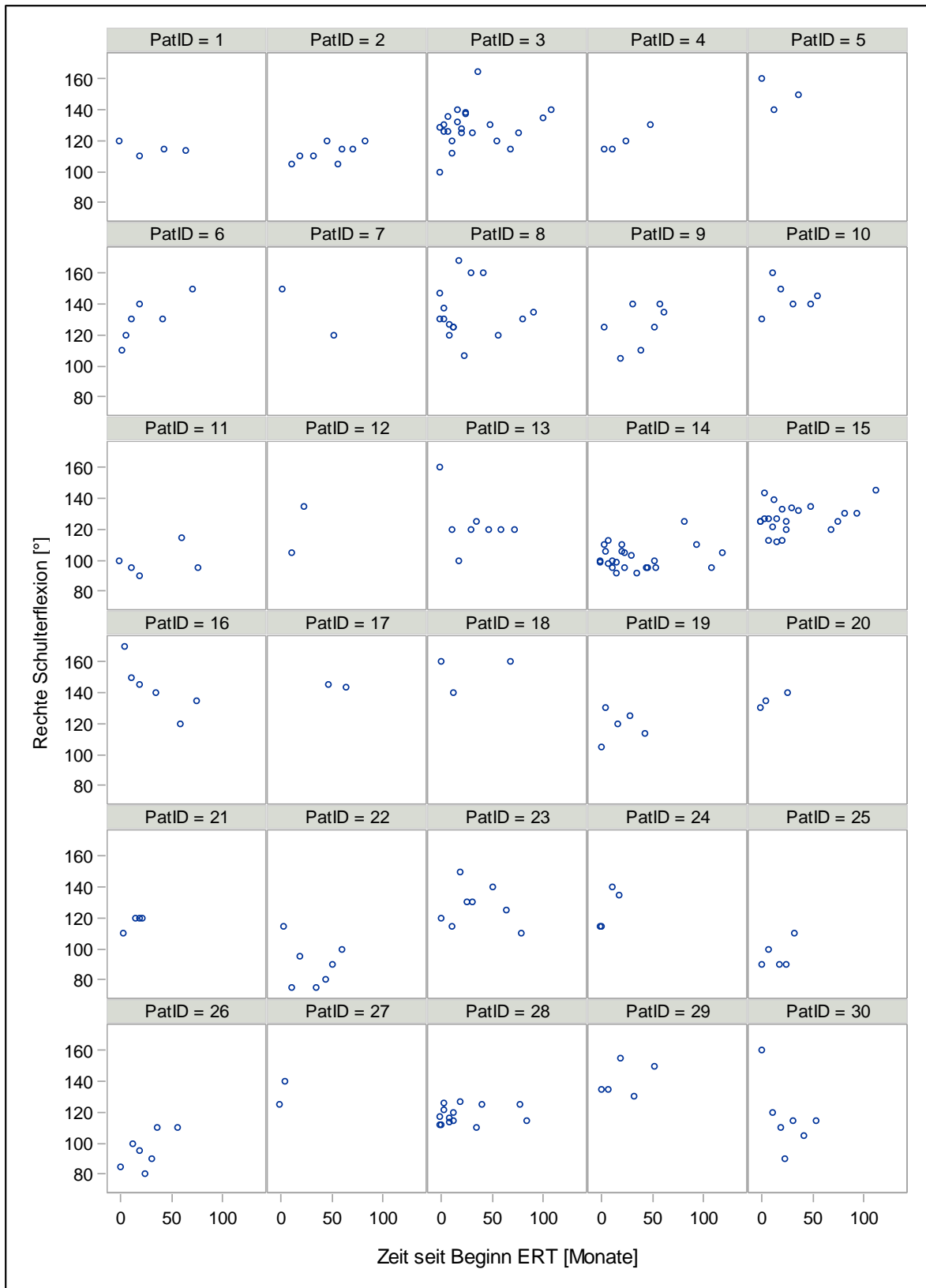
#### 4.4.4 Ergebnisse der Gelenkbeweglichkeit

Insgesamt liegen für 30 Patienten 243 Werte Flexion der rechten und linken Schulter für den Zeitraum 2003 bis 2013 vor. Dies entspricht im Durchschnitt 8,1 Werte pro Schulter und Patient.

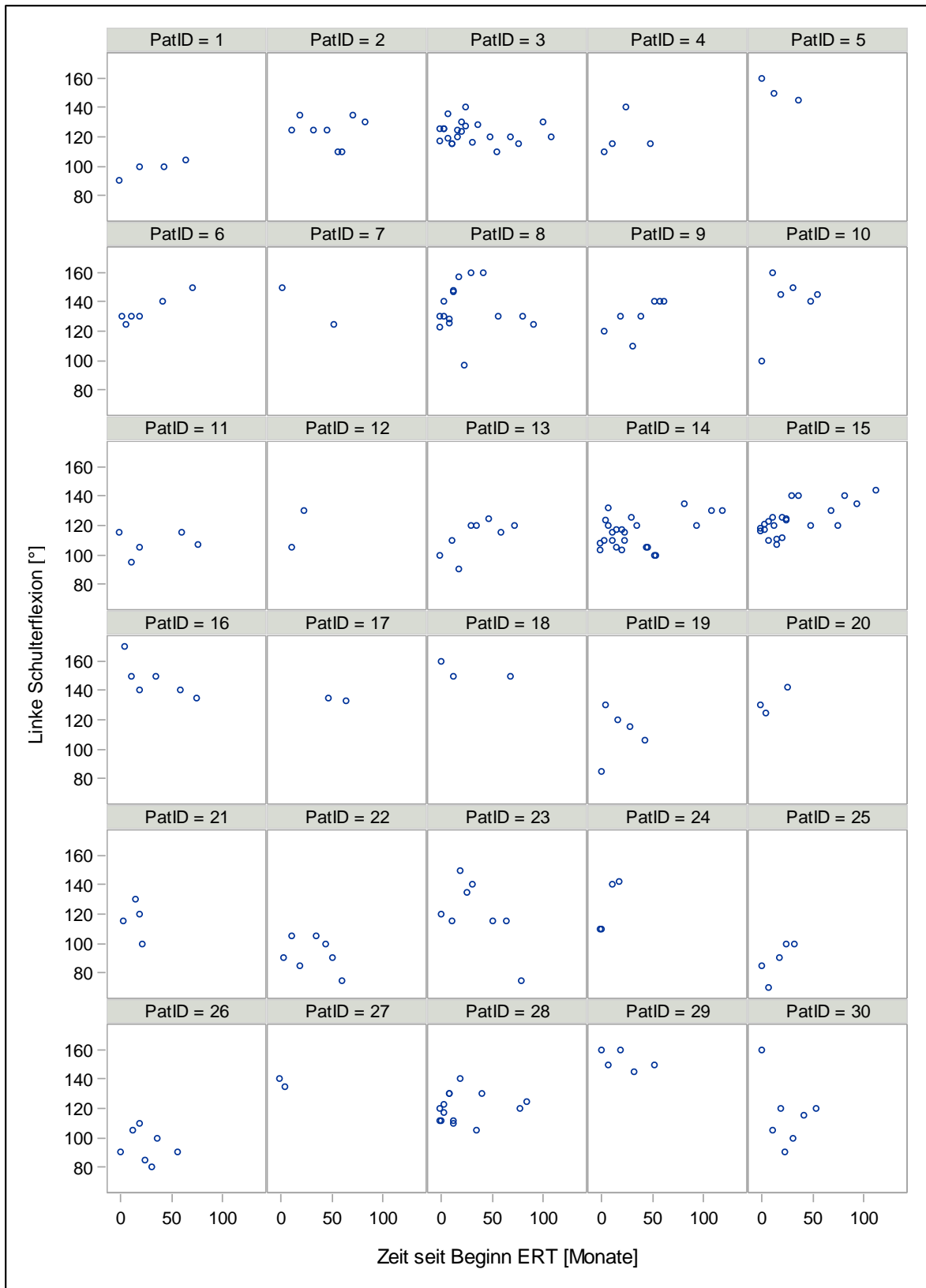
**Tabelle 30: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der rechten und linken Schulterflexion**

<b>Gelenkbeweglichkeitsmessung</b>	<b>Median</b>	<b>Minimaler Wert - Maximaler Wert</b>
Rechte Schulterflexion [°]	120	75 – 170
Linke Schulterflexion [°]	120	70 – 170

Abbildung 28 und Abbildung 29 zeigen eine patientenindividuelle Darstellung der rechten bzw. der linken Schulterflexion im Zeitverlauf nach Beginn der ERT.



**Abbildung 28: Patientenindividuelle Darstellung der rechten Schulterflexion im Zeitverlauf nach Beginn der ERT**



**Abbildung 29: Patientenindividuelle Darstellung der linken Schulterflexion im Zeitverlauf nach Beginn der ERT**

Die Mediane, sowie die gemessenen minimalen und maximalen Schulterflexionen sind rechts und links fast identisch (siehe Tabelle 30). In Abbildung 28 und Abbildung 29 ist jedoch ersichtlich, dass meist eine Schulter der Patienten eine bessere Gelenkbeweglichkeit aufweist.

In Tabelle 31 sind die Patienten bezüglich Verbesserung, keine Veränderung und Verschlechterung der rechten und linken Schulterflexion eingeteilt.

**Tabelle 31: Veränderungen der Schulterflexion unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten**

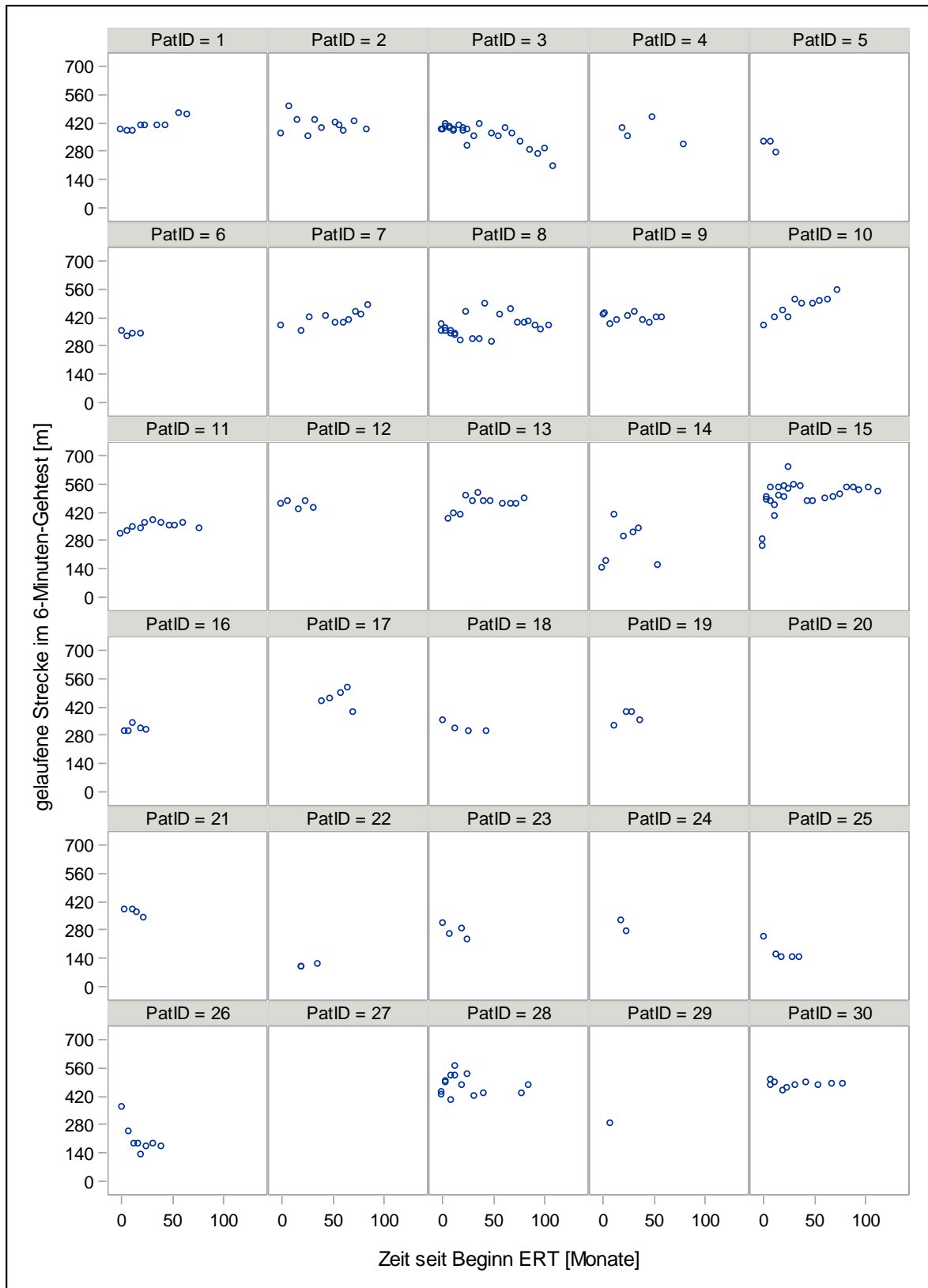
	Verbesserung der Schulterflexion	Keine Veränderung der Schulterflexion	Verschlechterung der Schulterflexion
Rechte Schulterflexion (Patientenanzahl) [n=30]	15 (=50%)	7 (=23%)	8 (=27%)
Linke Schulterflexion (Patientenanzahl) [n=30]	13 (=43%)	8 (=27%)	9 (=30%)

Bei den Patienten Nr. 23 und 26 mit PNAK+ wurden insgesamt 15 Mal wurden die Gelenkbeweglichkeiten untersucht. Patient Nr. 23 zeigte sowohl bei der rechten als auch bei der linken Schulterflexion eine Verschlechterung im Verlauf der ERT. Patient Nr. 26 zeigte rechts eine Verbesserung der Schulterflexion. Die Gelenkbeweglichkeit der linken Schulter zeigte jedoch im Verlauf keine Veränderung.

#### 4.4.5 Ergebnisse der Gehstrecke

Insgesamt wurden bei 28 Patienten 274 6MGT im Zeitraum von 2003 bis 2013 durchgeführt. Dies entspricht im Durchschnitt je 9,8 6MGT pro Patient. Bei acht Patienten wurde die Zeitvorgabe von sechs Minuten bei 29 6MGT nicht eingehalten und die Tests wurden nicht mit ausgewertet. Der Median der gelaufenen Strecke gültigen 6MGT betrug 397 m, die minimal gelaufene Strecke 103 m, die maximale 645 m. Es wurde zusätzlich erfasst, ob die Patienten beim Laufen der Strecke Unterstützung in Form einer Begleitung nötig hatten.

Abbildung 30 zeigt eine patientenindividuelle Darstellung der gelaufenen Strecke im 6MGT im Zeitverlauf nach Beginn der ERT.



**Abbildung 30: Patientenindividuelle Darstellung der gelaufenen Strecke im 6MGT im Zeitverlauf nach Beginn der ERT**

Patienten Nr. 20 und 27 waren zum Auswertungstermin 4 bzw. 3 Jahre, so dass ein 6MGT aufgrund des Alters nicht durchführbar war.

In Abbildung 30 ist keine Tendenz hin zu einer längeren oder abnehmenden gelaufenen Strecke im 6MGT im Verlauf ersichtlich.

Die Patienten Nr. 5, 6, 16, 18, 21, 22, 23, 25 und 29 mussten immer eine Begleitung für den 6MGT in Anspruch nehmen. Waren die Patienten durchgängig auf Begleitung angewiesen, so wurde dies nicht in der Auswertung berücksichtigt. Die Patienten Nr. 4, 10 und 26 benötigten nicht bei jedem 6MGT eine Begleitung und werden bei der folgenden Auswertung speziell erwähnt.

In Tabelle 32 sind die Patienten bezüglich Verbesserung, keine Veränderung und Verschlechterung der Gehstrecke eingeteilt.

**Tabelle 32: Veränderungen der Gehstrecke im 6MGT unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten Messwert des jeweiligen Patienten**

	<b>Verbesserung der Gehstrecke</b>	<b>Keine Veränderung der Gehstrecke</b>	<b>Verschlechterung der Gehstrecke</b>	<b>Fehlende Daten/ Nicht auswertbar</b>
Gehstrecke (Patientenanzahl) [n=30]	7 (=23%) <sup>1</sup>	10 (=33%)	10 (=33%) <sup>2</sup>	3 (=10%)

Die Summe der Prozentzahlen liegt aufgrund von Rundungsdifferenzen bei 99%.

<sup>1</sup> Patient Nr. 10 musste nur einmalig den 6MGT in Begleitung durchführen. Die folgenden zehn 6MGT konnte er ohne Begleitung absolvieren. Er zeigte auch ohne Begleitung im Zeitverlauf eine deutliche Steigerung der Gehstrecke.

<sup>2</sup> Patient Nr. 4 absolvierte dreimal den 6MGT mit Begleitung und anschließend einmalig ohne Begleitung. Der Patient zeigte nach Wegfall der Begleitung einen deutlichen Abfall der Gehstrecke über 137 m. Patient Nr. 26 absolvierte einmalig den 6MGT ohne Begleitung und anschließend siebenmal mit Begleitung. Der Patient zeigte nach Wegfall der Begleitung einen deutlichen Abfall der Gehstrecke über 123 m und verschlechterte sich im Zeitverlauf weiter deutlich.

Bei zwei Patienten wurde aufgrund ihres Alters zu keinem Zeitpunkt ein 6MGT durchgeführt. Patient Nr. 29 besitzt jeweils nur einen Wert die Gehstrecke, so dass dieser Patient bzgl. einer Veränderung nicht auswertbar ist.

Bei den Patienten Nr. 23 und 26 mit PNAK+ wurden insgesamt zwölfmal die Gehstrecke untersucht. Bei elf Untersuchungen der Gehstrecke mussten diese Patienten den 6MGT unter Begleitung absolvieren. Sowohl Patient Nr. 23 als auch Patient Nr. 26 zeigte eine Verschlechterung der Gehstrecke im 6MGT im Verlauf der ERT.

#### 4.4.6 Immunantwort auf die Enzyersatztherapie

Tabelle 33 zeigt eine patientenindividuelle Übersicht über die Ausprägung der neurologischen Beteiligung, dem Auftreten von infusionsbedingten Reaktionen und persistierenden neutralisierenden Antikörpern.

**Tabelle 33: Patientenindividuelle Übersicht über die Ausprägung der neurologischen Beteiligung, dem Auftreten von infusionsbedingten Reaktionen und persistierenden neutralisierenden Antikörpern**

Patient N°	Ausprägung der neurologischen Beteiligung	Auftreten infusionsbedingter Reaktionen	PNAK+
1	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
2	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
3	Neuropathisch	Nein	Nein
4	Neuropathisch	Nein	Nein
5	Neuropathisch	Ja	Nein
6	Neuropathisch	Ja	Nein
7	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
8	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
9	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
10	Neuropathisch	Nein	Nein
11	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
12	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
13	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
14	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
15	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
16	Neuropathisch	Nein	Nein
17	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
18	Neuropathisch	Ja	Nein
19	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
20	Neuropathisch	Ja	Nein
21	Neuropathisch	Ja	Nein
22	Neuropathisch	Nein	Nein
23	Neuropathisch	Nein	Ja
24	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
25	Neuropathisch	Ja	Nein
26	Neuropathisch	Nein	Ja

Patient N°	Ausprägung der neurologischen Beteiligung	Auftreten infusionsbedingter Reaktionen	PNAK+
27	Neuropathisch	Ja	Nein
28	Nicht neuropathisch	Nein	Nein
29	Neuropathisch	Ja	Nein
30	Nicht neuropathisch	Ja	Nein

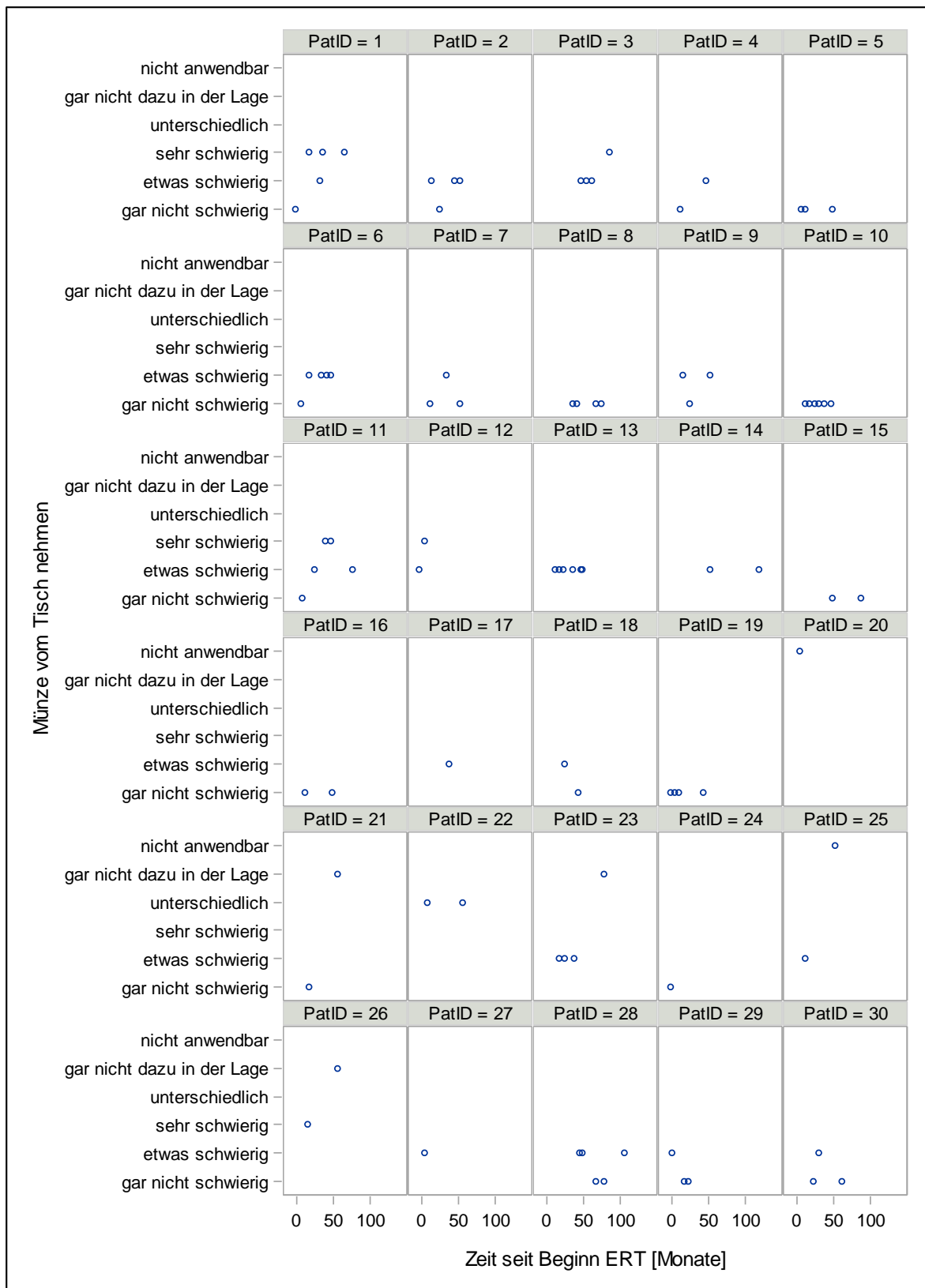
Nur Patient Nr. 23 und 26 galten als PNAK+. Beide Patienten sind neuropathisch betroffen und zeigten beide keine infusionsbedingten Reaktionen, so dass keine Beziehung zwischen dem Auftreten von persistierenden Antikörpern mit Neutralisationskapazität und dem Auftreten von infusionsbedingten Reaktionen und der neuropathischen Ausprägung von M. Hunter bei diesem Patientenkollektiv gefunden werden konnte.

#### 4.4.7 Validierter Fragebogen der Hunter Outcome Survey (HS-FOCUS)

Der Fragebogen HS-Focus wurde insgesamt 94 Mal von 2007 bis 2013 von 30 Patienten bzw. deren Eltern ausgefüllt. Dies entspricht im Durchschnitt 3,1 beantworteten Fragebögen pro Patient. Bei zehn unterschiedlichen Fragen fiel auf, dass von den Ausfüllenden zwischen zwei Kästchen ein Kreuz gesetzt wurde. In diesen Fällen wurde der jeweils schlechtere Wert gezählt. Da es sich um eine Funktionsabfrage handelte wurde bei der Auswertung keinen Unterschied gemacht, ob der Fragebogen von den Eltern oder dem Patient selbst ausgefüllt wurde.

Abbildung 31 und Abbildung 32 zeigen patientenindividuelle Darstellungen der Antworten auf zwei ausgewählte Fragen im Zeitverlauf nach Beginn der ERT.





**Abbildung 31: Patientenindividuelle Darstellung der Antworten auf die Frage: „Sind Sie/ Ist Ihr Kind in der Lage eine Münze mit Daumen und Zeigefinger von einem Tisch zu nehmen?“ im Zeitverlauf nach Beginn der ERT**

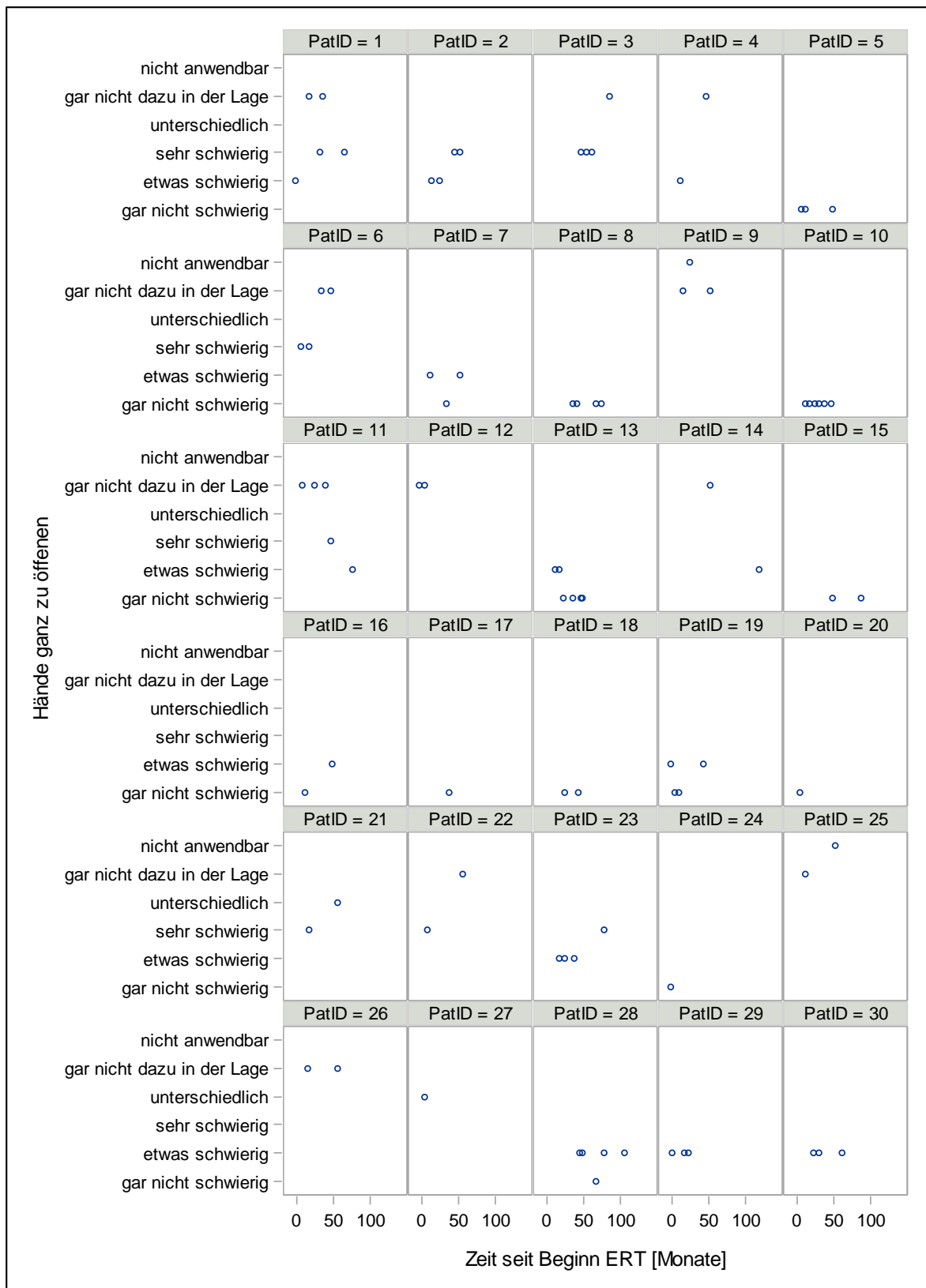


Abbildung 32: Patientenindividuelle Darstellung der Antworten auf die Frage: „Sind Sie/ Ist Ihr Kind in der Lage die Hände ganz zu öffnen?“ im Zeitverlauf nach Beginn der ERT

Die Patienten wurden eingeteilt, ob eine Verbesserung, keine Veränderung oder eine Verschlechterung der abgefragten Handfunktionen seit Beginn der ERT zu dem jeweilig zuletzt ausgefüllten Fragebogen eingetreten ist.

**Tabelle 34: Veränderungen der Handfunktion unter ERT von Beginn der ERT bezogen auf den letzten beantworteten Fragebogen HS-FOCUS des jeweiligen Patienten**

	Verbesserung der Handfunktion	Keine Veränderung Handfunktion	Verschlechterung der Handfunktion	Fehlende Daten/ Nicht auswertbar
Münze (Patientenanzahl) [n=30]	2 (=7%) <sup>1</sup>	14 (=47%) <sup>1</sup>	9 (=30%) <sup>1</sup>	5 (=17%) <sup>1</sup>
Hände öffnen (Patientenanzahl) [n=30]	3 (=10%)	13 (=43%)	8 (=27%)	6 (=20%)

<sup>1</sup> Die Summe der Prozentzahlen der liegt aufgrund von Rundungsdifferenzen bei 101%.

Bei den Patienten Nr. 23 und 26 mit PNAK+ beantworteten die Eltern insgesamt 6 Mal den HS-FOCUS. Sowohl bei Patient Nr. 23 als auch Patient Nr. 26 verschlechterte sich die Fähigkeit eine Münze vom Tisch aufzunehmen im Verlauf der ERT. Beide waren bei dem letzten Fragebogen gar nicht mehr dazu in der Lage. Patient Nr. 23 zeigte ebenso eine Verschlechterung der Fähigkeit die Hände ganz zu öffnen (2 = etwas schwierig auf 3 = sehr schwierig). Patient Nr. 26 war laut Angabe der Eltern auch zu keinem Zeitpunkt in der Lage die Hände ganz zu öffnen.

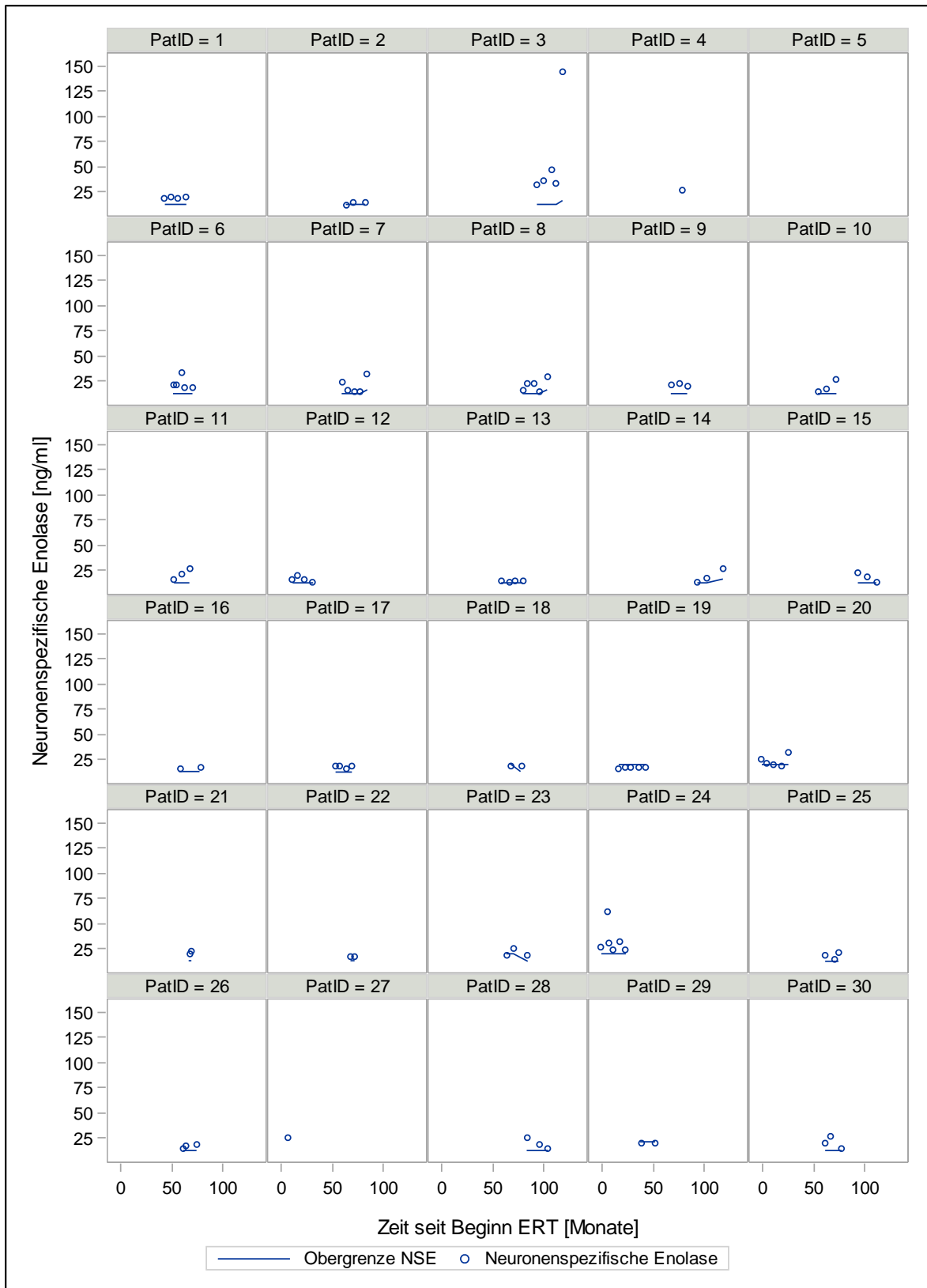
#### 4.5 Korrelation des Phänotyps der Morbus Hunter-Patienten mit den Ergebnissen der Neuronenspezifischen Enolase und S-100

Die NSE bzw. S-100 Bestimmungen wurden bei 29 Patienten im Zeitraum 2011 bis 2013 in 96 bzw. 97 Blutproben durchgeführt. Dies entspricht im Durchschnitt 3,3 Bestimmungen pro Patient.

**Tabelle 35: Tabellarische Darstellung der Mediane, der minimalen und maximalen Werte der NSE und S-100**

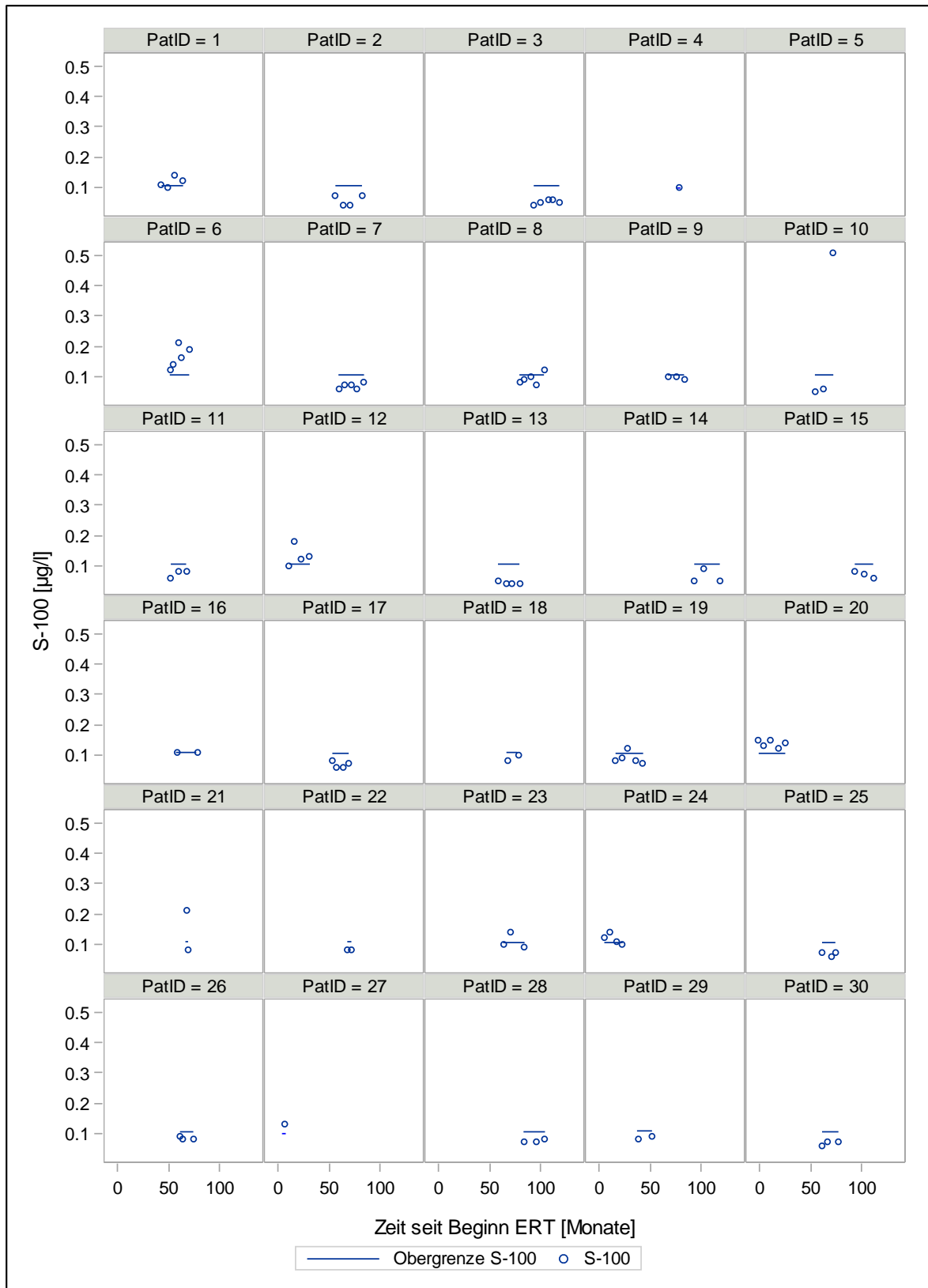
Biochemischer Parameter	Median	Minimaler Wert - Maximaler Wert
NSE [ng/ml]	19	11,6 – 145
S-100 [ $\mu\text{g/l}$ ]	0,08	0,04 – 0,51

Abbildung 33 und Abbildung 34 zeigen eine patientenindividuelle Darstellung der NSE und S-100 im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneten oberen Normwerten.



**Abbildung 33: Patientenindividuelle Darstellung der NSE im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneten altersabhängigen oberen Normwerten**

Bei Patient Nr. 4 und 27 ist aufgrund programmtechnischer Darstellungsweise bei nur einer Bestimmung der NSE im Verlauf kein Normwert einzeichnbar. Die NSE ist in beiden Fällen über dem Normwert.



**Abbildung 34: Patientenindividuelle Darstellung der S-100 im Zeitverlauf nach Beginn der ERT mit eingezeichneten altersabhängigen oberen Normwerten**

Bei Patient Nr. 4 ist aufgrund programmtechnischer Darstellungsweise bei nur einer Bestimmung der S-100 im Verlauf kein Normwert darstellbar. Die NSE ist in beiden Fällen unterhalb des Normwerts.

Tabelle 36 zeigt für jeden Patienten die Ausprägung der neurologischen Beteiligung und das Auftreten der NSE und S-100 oberhalb der Normwerte.

**Tabelle 36: Patientenindividuelle Übersicht über die Ausprägung der neurologischen Beteiligung und dem Auftreten der NSE und S-100 oberhalb der Normwerte**

Patient N°	Ausprägung der neurologischen Beteiligung	Auftreten NSE oberhalb des Normwertes	Auftreten S-100 oberhalb des Normwertes
1	Nicht neuropathisch	Ja	Ja
2	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
3	Neuropathisch	Ja	Nein
4	Neuropathisch	Ja	Nein
5	Neuropathisch	Keine Messungen	Keine Messungen
6	Neuropathisch	Ja	Ja
7	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
8	Nicht neuropathisch	Ja	Ja
9	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
10	Neuropathisch	Ja	Ja
11	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
12	Nicht neuropathisch	Ja	Ja
13	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
14	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
15	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
16	Neuropathisch	Ja	Ja
17	Nicht neuropathisch	Ja	Nein
18	Neuropathisch	Ja	Nein
19	Nicht neuropathisch	Nein	Ja
20	Neuropathisch	Ja	Ja
21	Neuropathisch	Ja	Ja
22	Neuropathisch	Ja	Nein
23	Neuropathisch	Ja	Ja
24	Nicht neuropathisch	Ja	Ja
25	Neuropathisch	Ja	Nein
26	Neuropathisch	Ja	Nein
27	Neuropathisch	Ja	Ja
28	Nicht neuropathisch	Ja	Nein

Patient N°	Ausprägung der neurologischen Beteiligung	Auftreten NSE oberhalb des Normwertes	Auftreten S-100 oberhalb des Normwertes
29	Neuropathisch	Nein	Nein
30	Nicht neuropathisch	Ja	Nein

Die Bestimmung der NSE lässt keine Rückschlüsse auf die neuropathische Beteiligung des M. Hunter-Patienten zu. Bei 27 von 29 Patienten lagen die Messwerte oberhalb der Normwerte während 15 von 30 Patienten klinisch als neuropathisch betroffen einzuordnen sind. Zwölf Patienten zeigten mindestens eine Blutprobe mit einer S-100 oberhalb des Normwertes. Fünf dieser Patienten waren nicht neuropathisch, sieben Patienten neuropathisch betroffen. Somit lässt die Bestimmung der S-100 ebenfalls keine Rückschlüsse auf die neuropathische Beteiligung des Patienten zu. Beide Tests sind demnach nicht ausreichend spezifisch für die Diagnose eines neuropathischen M. Hunter.



## 5 Diskussion

### 5.1 Studienprotokoll

#### 5.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Studie setzt sich ausschließlich aus männlichen Patienten zusammen, was durch die Vererbung von M. Hunter erklärbar ist. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte durch die behandelnden Ärzte. Wegen der chronischen Erkrankung und die regelmäßig nötigen Verlaufskontrollen besteht zwischen Ärzten und M. Hunter-Patienten meist ein langjähriges Vertrauensverhältnis. Die Eltern der Patienten und auch die Patienten selbst – soweit die kognitiven Fähigkeiten dies zulassen – sind meist gewillt jede Maßnahme zu unterstützen, die zu einer potentiellen Verbesserung der Therapie dieser progredienten Erkrankung führen kann. Trotzdem ist die Aufklärung von Kindern, die in dieser Studie aufgrund des medianen Alters von 13 Jahren häufig nötig war, nicht unproblematisch. Die Entwicklung und kognitiven Fähigkeiten sind bereits bei gesunden Kindern sehr heterogen ausgeprägt. Bei M. Hunter-Kindern kommt die potentielle neuropathische Beteiligung und somit eine geistige Retardierung als Problem hinzu (1). Die Aufklärung musste somit bei jedem Kind an dessen geistige Fähigkeiten angepasst werden. Eine altersgerechte Aufklärung der Kinder wurde durch unterschiedliche teilweise bebilderte Patienteninformationen und Einwilligungserklärung gewährleistet (siehe Anhang 3-7). Die durch den Arzt durchgeführten Aufklärungsgespräche fanden in Gegenwart der Minderjährigen und ihrer gesetzlichen Vertreter statt. Patienten deren kognitive Fähigkeiten ein Verstehen der Krankheit und somit auch dieser Studie nicht zuließ, wurden durch ihre Eltern vertreten. Für keinen Patienten kam es durch diese Studie zu einer zusätzlichen Belastung. Insgesamt konnten 30 M. Hunter-Patienten für die Studie gewonnen werden. Nur zwei Patienten lehnten die Teilnahme an der Studie ab. Die beiden Brüder kamen sehr unregelmäßig zu ihren Verlaufskontrollen in die Villa Metabolica.

50% (n=15) der insgesamt 30 rekrutierten Patienten sind neuropathisch betroffene M. Hunter-Patienten. In der Literatur wird beschrieben, dass die neuropathische Form des M. Hunter etwa dreimal so häufig wie die nicht neuropathische Form ist, es sind jedoch keine akkuraten Daten verfügbar (2-4). Das frühere Versterben der neuropathisch betroffenen Patienten könnte eine mögliche Begründung hierfür

sein (81). Außerdem könnte eine geringere Motivation für reguläre Verlaufskontrollen, die aus Sicht der Eltern – besonders bei neuropathisch betroffenen Patienten - keine Besserung bringen, eine Rolle spielen. Dies könnte auch eine Begründung für nicht regulär wahrgenommene Termine in der Villa Metabolica sein, die zur mangelnden Vollständigkeit der Daten führte. Aus Gesprächen mit den Behandlern wird deutlich, dass viele Eltern keine Besserung, sondern eher eine zunehmende Verschlechterung ihrer Kinder beobachten. Als Folge daraus sinkt die Motivation an den meist einen Tag beanspruchenden Verlaufskontrollen regelmäßig teilzunehmen. In den meisten Fällen kommt eine lange und für einige Patienten und deren Eltern mit großem Aufwand verbundene Anreise erschwerend hinzu.

Kein Patient schied vorzeitig aus der Studie aus, so dass alle 30 Patienten in die Auswertung eingingen.

## **5.2 Bestimmung der Iduronat-2-sulfatase (IDS)-Aktivität im Serum von Morbus Hunter-Patienten**

Die Bestimmung der IDS-Aktivität im Serum wurde pro Blutprobe zweifach und nicht wie üblich dreifach durchgeführt, da zusätzlich immer ein Mischserum in Doppelproben mit angesetzt wurde und nicht ausreichend Material für eine häufigere Bestimmung zur Verfügung stand. Außerdem musste gewährleistet sein, dass im Falle eines Nichtgelingens der Messung eine komplette Wiederholung möglich ist. Es wurde somit eine Unsicherheit für die Richtigkeit der Ergebnisse in Kauf genommen.

Vom Hersteller ist eine Anleitung zur Messung der IDS-Aktivität im Serum bei jeder Lieferung von 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -Iduronat-2-sulfat beigelegt. Sie weist kleine Unterschiede zur verwendeten Methode auf. Die Anleitung schreibt vor, dass 10  $\mu$ l 0,2% Humanalbumin-Lösung und nicht reines Aqua ad iniectabilia als Blindprobe einzusetzen ist (191). Die Humanalbumin-Lösung soll das Serum der Proben nachahmen. Im Unterschied dazu wurde im Biochemischen Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin die Verwendung von Aqua ad iniectabilia als Blindprobe validiert und daher wurde weiterhin Aqua ad iniectabilia für die Blindprobe verwendet (79;173). Ein weiterer Teil der Vorschrift besagt, dass im dritten Schritt beim Stoppen der Reaktion nach erfolgter Inkubation für 24 Stunden und Zentrifugation, die Reaktion durch Zugabe von 200  $\mu$ l Stopp-Puffer in jedes Reagiergefäß beendet werden soll (191). Da das verwendete Hitachi F-2000

Fluorescence Spectrophotometer eine größere Menge an Einzugsvolumen benötigt, musste jeweils 1 ml Stopp-Puffer zum Beenden der Reaktion verwendet werden. Auch dieses Vorgehen war bereits in der Validierung getestet worden (173). Der nächste zu erwähnende Unterschied lag in der Lagerung des Substrats und der LEBT. In der Anleitung wird eine Lagerung dieser beiden Reagenzien bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verlangt (191). Die beiden Reagenzien wurden jedoch bereits bei der Validierung von Meister bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, da keine anderen Möglichkeiten zur Verfügung standen und zeigten keine Unterschiede in der Einsetzbarkeit. Es wurde jedoch im Verlauf darauf geachtet, dass durch die Aliquotierung kein mehrfaches Auftauen und wieder einfrieren stattfindet, was die Haltbarkeit des Substrates und der LEBT beeinflussen könnte (173). Nach 2002 wurde die Herstellung des Pi/Ci-Puffers in der Anleitung geändert (191;192). Der finale Phosphatgehalt ist vierfach niedriger als in den vorangegangenen Laboranleitungen. Die Zusammensetzung lautet nun wie folgt: 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat / 0,1 M Citrat-Puffer (pH 4,5) + 0,02% Na-azid. Auch die Zugabe von Pi/Ci-Puffer wurde von 40  $\mu\text{l}$  auf 20  $\mu\text{l}$  reduziert. Die Konzentrationen wurden geändert, da Phosphate schwache Inhibitoren von  $\alpha$ -Iduronidase sind (191).  $\alpha$ -Iduronidase, hat die Aufgabe  $\alpha$ -Iduronat von 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -Iduronat durch Hydrolyse abzuspalten. Sollte eine Hemmung von  $\alpha$ -Iduronidase durch zu hohe Phosphatkonzentrationen in der Probe vorliegen, würden falsch niedrige IDS-Aktivitäten gemessen werden.  $\alpha$ -Iduronidase wird jedoch im Überschuss zugegeben, damit dieser zweite Inkubationsschritt nicht der reaktionslimitierende Faktor ist, so dass ein gewisser Spielraum vorliegt. Die Messung wurde im Biochemischen Labor nicht an die neue Anleitung angepasst, da die Validierung mit der vorangegangenen Anleitung und dem höher konzentrierten Pi/Ci-Puffer und der größeren Zugabemenge durchgeführt wurde (173). Die Anleitung des Herstellers beinhaltet auch den Hinweis, dass der Assay von jedem durchführenden Labor validiert werden muss. Dieser Aufforderung wurde Rechnung getragen (173).

Das größte Fehlerpotential liegt in der Bleiausfällung, die nach Zugabe des Pi/Ci-Puffers und des Stopp-Puffers entsteht. Sie ist nach der Zentrifugation am Boden der Eppendorf Caps als leichte Trübung zu sehen. Vor Messung der IDS-Aktivität wurde der Überstand über der Trübung mittels einer Pipette in ein neues Eppendorf Cap überführt. Sollte hier keine vollständige Entfernung der Trübung gelingen sein, so könnte dies eine starke Reduzierung der Fluoreszenz von 4-MU und

somit eine große Unterschätzung der IDS-Aktivität zur Folge haben (191). Dieser Fehler liegt wahrscheinlich bei einigen nicht auswertbaren Proben vor.

Die Blutproben zur IDS-Aktivitätsbestimmung wurden den Patienten durch das Ärzte- und Pflegeteam der Villa Metabolica entnommen. Wenn die Enzymaktivitätsbestimmung nicht unmittelbar erfolgte, wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und kurz vor der Analyse im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Dieses Vorgehen wurde aus Effizienzgründen gewählt und üblicherweise jeweils mindestens drei Blutproben zusammen analysiert. Die Temperaturstabilität der IDS in tiefgefrorenem Serum war bereits früher nachgewiesen worden. Eine Langzeitlagerung des Serums ist für ein Jahr im gefrorenen Zustand ohne Enzymaktivitätsverluste möglich (173).

### **5.2.1 Neutralisationskapazität im Mischserum**

Die Bestimmung der Neutralisationskapazität im Mischserum erfolgte aus den oben dargestellten Gründen als Zweifachbestimmung. Als positiv für neutralisierende Antikörper wurde eine Verminderung um  $\geq 40\%$  der rechnerisch zu erwartenden Aktivität bzw. einer Neutralisationskapazität  $\geq 40\%$  im Mischserum angesehen. Diese Einteilung stammt von Muenzer et al. für den von Shire ausgeführten Inhibitions-Assay (103). Die Einteilung der Proben in positiv oder negativ für neutralisierende Antikörper erfolgte unproblematisch. Die gemessenen IDS-Enzymaktivitäten im Mischserum mit den geringsten Werten, die als negativ für neutralisierende Antikörper gesehen wurden, betragen 66% und 81%.

In der Auswertung wurde ein wesentlicher Fokus auf die Patienten gelegt, für die in  $\geq 4$  Messungen neutralisierende Antikörper nachgewiesen worden waren und auch gemäß den Bestimmungen von Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin G und E von Shire Pharmaceuticals, zu den Patienten mit PNAK+ gehörten. Die übereinstimmenden Ergebnisse zu den persistierenden neutralisierenden Antikörpern im Mischserum und des Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin-Bestimmungen belegen die Eignung IDS-Aktivitätsbestimmung im Mischserum zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen Elaprase<sup>®</sup>. Die Ergebnisse dieser beiden Assays zeigen außerdem eine fast komplette Übereinstimmung bezüglich der intermittierend oder isoliert auftretenden neutralisierenden Antikörpern. Insgesamt konnten die Ergebnisse von 29 der 30 Patienten verglichen werden. Patient Nr. 1 zeigte bei der Messung der Neutralisationskapazität im Mischserum einmalig isoliert neutra-

lisierende Eigenschaften, es gab dazu keine Bestätigung durch die Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin-Bestimmungen von Shire Pharmaceuticals. Für Patient Nr. 27 lagen zum Auswertzeitpunkt dieser Studie noch keine Ergebnisse der Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin-Bestimmungen vor. Auch bei Patient Nr. 29 und 30 stimmen die Ergebnisse der beiden Methoden überein, wenn man die Zeitpunkte des Antikörper-Nachweises berücksichtigt. Für die Einteilung der Patienten als PNAK+ gab es hinsichtlich der Ergebnisse der Mischseren und der Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin-Bestimmungen von Shire Pharmaceuticals keine Abweichungen und nur Patient Nr. 1 wurde als falsch positiv für isoliert auftretende neutralisierende Antikörper gewertet. Diese fast komplette Übereinstimmung unterstützt die Aussagekraft der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsbestimmung im Mischserum.

Die Bildung neutralisierender Antikörper unter ERT Therapie wurden in der Phase II/III-Studie und in der offenen Anschlussstudie von Muenzer et al. mittels CSA, RIP-Assay und einen Enzyminhibitions-Assay untersucht. Bei 22 von 94 Patienten (23%) traten zu irgendeinem Zeitpunkt neutralisierende Antikörper auf. Auch Barbier et al. beschreiben bei 13 von 63 Patienten (21%) mit einer ähnlichen Häufigkeit neutralisierenden Antikörper (148). Die ähnlichen Prozentsätze sind u.a. durch eine Überschneidung der Patientenkollektive bedingt (148). Vergleicht man diese Häufigkeiten mit den Ergebnissen der Bestimmung der Neutralisationskapazität im Mischserum, bei der 5 von 30 Patienten (17%) zu irgendeinem Zeitpunkt eine reduzierte IDS-Aktivität zeigten, so stimmen die Größenordnungen überein. Die geringen Fallzahlen beeinträchtigen die Aussagekraft doch ist davon auszugehen, dass etwa ein Fünftel der M. Hunter-Patienten zu irgendeinem Zeitpunkt neutralisierende Antikörper gegen Elaprase<sup>®</sup> entwickeln. Die Rate der Persistenz scheint niedriger zu sein. Barbier et al. beschreiben bei 8 von 63 Patienten (13%) persistierende neutralisierende Antikörper (148). Der Test im Mischserum zeigte persistierende neutralisierende Antikörper bei 2 von 30 Patienten (7%). Die Häufigkeiten sind aufgrund der kleinen Fallzahlen nur bedingt valide. Es kann jedoch von einer Toleranzentwicklung ausgegangen werden. Auch Rosenberg et al. beschrieben bei M. Gaucher-Patienten einer Toleranzentwicklung mit verringerter Produktion von neutralisierenden Antikörpern (156). Bei einer Interferon-Therapie oder einer Therapie mit Faktor VIII können ebenfalls neutralisierende Antikörper auftreten, die auch einer Toleranzentwicklung - teilweise durch immunsuppressive Behand-

lung induziert – unterliegen (193;194). Für eine genauere Beurteilung der Häufigkeiten der auftretenden neutralisierenden Antikörper und der Toleranzentwicklung bei M. Hunter ist eine weitere Studie mit größeren Fallzahlen nötig, die jedoch aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und der somit noch seltener auftretenden neutralisierenden Antikörpern schwer realisierbar ist.

Alle Blutproben zur Messung der IDS-Aktivität im Mischserum wurden mindestens 24 Stunden nach der letzten ERT-Gabe abgenommen. Bei einer Idursulfase-Halbwertszeit von 44-160 Minuten sollte keine Idursulfase der ERT mehr erfasst worden sein (190). Eine Optimierung der Messmethode würde ein standardisiertes Zeitintervall zur Abnahme der Blutprobe nach ERT-Gabe beinhalten. Dies wurde in der Durchführung auch angestrebt, jedoch war dies in der Praxis durch überschneidende Termine nicht realisierbar. Ebenfalls interessant wäre die Messung der IDS-Aktivität im Mischserum im Verlauf gewesen, insbesondere bei den PNAK+ Patienten. Dies würde jedoch für den Patienten eine große Belastung bedeuten, da bei Infusionsbeginn und dann im etwa stündlichen Abstand bis etwa 6 Stunden nach Beendigung der ERT Blutproben abgenommen werden müssten. Diese zusätzlichen Belastungen sollte den M. Hunter-Patienten nicht zugemutet werden. Über den Verlauf könnte man potentiell eine direkte Verbindung der ERT und den auftretenden neutralisierenden Antikörpern, die zu einer eventuell noch stärkeren Aktivitätsreduktion im Mischserum während oder kurz nach der ERT führen, erkennen. Der Verlauf der Antikörperbildung während und im direkten Anschluss an die ERT wurde bei M. Fabry-Patienten von Linthorst et al. mittels eines Assays mit Sepharose-Kügelchen mit Protein A gezeigt (163). Es zeigte sich bei der Inkubation des Plasmas mit Sepharose-Kügelchen mit Protein A eine starke Reduzierung der Enzymaktivität, so dass Linthorst et al. davon ausgehen, dass Immunglobulin G eine Rolle bei der Enzymbindung spielt und somit zu einer reduzierten Aktivität führt (163). Ein Versuch mit Sepharose-Kügelchen mit Protein A ist außerdem zur weiteren Klärung der Subklasse der neutralisierenden Antikörper bei M. Hunter sinnvoll. Es scheint jedoch eine Verbindung zwischen dem Vorliegen von neutralisierenden Antikörpern und Anti-Elaprased<sup>®</sup>-Immunglobulin G zu geben wie in Tabelle 21 in 4.3 gezeigt. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass – wie bereits von Linthorst et al. für Morbus Fabry vermutet - IgG auch bei M. Hunter eine Rolle bei den reduzierten Enzymaktivitäten im Mischserum spielt (163).

Die beiden Patienten, die als positiv für persistierende neutralisierende Antikörper eingestuft wurden, sind beide neuropathisch betroffen und die Genveränderungen sind bekannt. Die Deletion des einen Patienten gehört zu den großen, die Missense Mutation zu den kleinen Genveränderungen. Barbier et al. untersuchten ebenfalls den Genotyp der Patienten mit neutralisierenden Antikörpern und es zeigte sich, dass Patienten mit Nonsense- oder Frameshift-Mutationen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, Antikörper zu entwickeln. Sie erklärten die Zusammenhänge von Nonsense- oder Frameshift-Mutation und der Antikörperbildung mit der Unfähigkeit dieser Patienten eine Restmenge von antigen-intaktem IDS herzustellen. Während Patienten mit Missense-Mutationen zwar auch ein katalytisch mangelhaftes, aber antigen-intaktes Enzym produzieren und dadurch weniger anfällig für Antikörperbildung gegen Elaprase<sup>®</sup> erscheinen (148). Ein Zusammenhang wie Barbier et al. ihn zwischen den Mutationen und der Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern fanden, konnte bei den beiden Patienten, die im Mischserum als PNAK+ eingestuft werden, nicht gefunden werden, da zwei unterschiedliche Mutationen vorliegen. Die kleine Genveränderung führt wahrscheinlich zu einem katalytisch mangelhaftem, aber antigen-intaktem Enzym während der Patient mit der Deletion kein Enzym produziert und doch entwickelten beide Patienten persistierende neutralisierende Antikörper.

Eine konstante Überwachung der Patienten bezüglich neutralisierender Antikörper ist weiterhin von Interesse und sollte in weiteren Studien untersucht werden, um weitere Kenntnisse zu gewinnen und eine individuell verbesserte Betreuung und Therapie zu gewährleisten (167). Ein zukünftiges Ziel könnte die Entwicklung eines Therapieprotokolls zur Induktion einer Immuntoleranz bei Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern sein. Allgemein ist jedoch eine Zusatzbelastung von M. Hunter-Patienten so weit wie möglich zu vermeiden und dies nicht nur weil die meisten Betroffenen Kinder sind, sondern weil nach den §§ 40 und 41 des Arzneimittelgesetzes das Gebot der Minimalbelastung der Patienten als Voraussetzung für klinische Prüfungen gilt. Die Krankheit an sich ist außerdem für die Patienten selbst und die Familien meist ohne weitere Komplikationen eine große physische und psychische Belastung, da sie mit einer progredienten und terminalen Krankheit zu kämpfen haben, die ihren Alltag an sich stark einschränkt (1;2;5;81;133).

## 5.2.2 Validierung der Neutralisationskapazitätsbestimmung und der Einfluss der Verdünnungslösung

### Validierung der Bestimmung der Neutralisationskapazität

#### Verdünnungsreihen mit Serum von Patient Nr. 26 und 23 und Messungen der IDS-Aktivität im Mischserum

Zur Validierung der Messung der IDS-Aktivität im Mischserum bzw. der Neutralisationskapazität wurden 50 µl verdünntes Patientenserum pro Messung benötigt. Es wurden jeweils insgesamt 100 µl verdünntes Patientenserum hergestellt, um den potentiellen Fehler beim Pipettieren zu minimieren. Sowohl für Patient Nr. 26 als auch bei Patient Nr. 23 zeigen sich abfallende Enzymaktivitäten bei geringerem Anteil des Patientensersums (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Die Antikörper der beiden Patienten behindern das intakte Enzym des Gesunden und sind dementsprechend neutralisierender Natur. Je mehr Antikörper mit Neutralisationskapazität sich im Serum der Patienten befinden, umso stärker fällt die IDS-Enzymaktivität ab. Einen ähnlichen Versuch bei Morbus Fabry Patienten mit neutralisierenden Antikörpern wurde von Linthorst et al. durchgeführt (163). Linthorst et al. inkubierten ebenfalls unterschiedliche Mengen an Patientenserum mit dem ERT Präparat Agalsidase alfa (Replagal<sup>®</sup>) oder Agalsidase beta (Fabrazyme<sup>®</sup>) - und bestimmten die Enzymaktivität. Die Kurvenverläufe der Enzymaktivitäten der Agalsidase alfa und beta in Abhängigkeit vom Volumenanteil des Patientensersums in der Probe sind ähnlich. Linthorst et al. vermuteten, dass die neutralisierenden Antikörper bei Patienten mit ERT zur Bildung von Enzym-Antikörper-Komplexen führen kann, die wiederum von Leukozyten aufgenommen werden und somit nicht mehr zur Therapie der Endothelzellen der verschiedenen Organsysteme zur Verfügung stehen (163). Auch für Morbus Gaucher gibt es vergleichbare Ergebnisse bei der Inkubation unterschiedlicher Volumina von Patientenserum mit neutralisierenden Antikörpern und Alglucerase (Ceredase<sup>®</sup>) (159). Auch bei diesen Untersuchungen bilden die gemessenen Enzymaktivitäten abfallende Kurven (159). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die neutralisierenden Antikörper der beiden untersuchten M. Gaucher-Patienten auch deren eigenes noch produziertes, fehlerhaftes Enzym inhibiert. Die Inhibition fiel jedoch deutlich schwächer aus als bei den Versuchen mit der rekombinanten Ceredase<sup>®</sup>. Die Arbeitsgruppe vermutete daraufhin, dass mehrere Epitope des Enzyms mit den neutralisierenden



Antikörpern interagieren (159). Sollte dies auch bei M. Hunter der Fall sein, so ist jedes Serum mit neutralisierenden Antikörpern vermutlich aus unterschiedlichen Antikörpern zusammengesetzt, die wiederum mit den verschiedensten Epitopen des Enzyms der ERT interagieren und nicht alle neutralisierende Eigenschaften besitzen. Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung folgt die Hemmung vermutlich keiner eindeutigen Kinetik. Auch wenn keine eindeutige Kinetik erkennbar ist, so zeigen die Untersuchungsergebnisse der beiden Verdünnungsreihen von Patient Nr. 23 und 26, dass je mehr neutralisierende Antikörper im Serum des Patienten vorhanden sind, desto stärker erfolgt die Hemmung des Enzyms im Serum des Gesunden (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10 in 4.2.2). In der Publikation von Ponce et al. wird von einem Therapieversuch mit Cyclophosphamid zur Immunsuppression bzw. Alglucerase-Gewöhnung berichtet, die aber keine Reduzierung der NAK-Titer brachte. Eine vorübergehende Beendigung der Therapie führte hingegen zur Verminderung der NAK-Titer (159). Gawryl und Hoyer untersuchten die neutralisierenden Antikörper gegen Faktor VIII bei Hämophilie-Patienten (195). Bei der Inkubation von gepooltem Normalplasma mit verdünntem Antikörper-haltigem Plasma zeigten sich zwei unterschiedliche Inaktivierungsmuster. Eine Erklärung könnten zwei verschiedene Typen von Antikörpern sein. Bei den Typ I Antikörpern folgt die Inaktivierung einer linearen Beziehung. Typ II Antikörper hingegen haben eine nichtlineare (komplexe) Beziehung zwischen Restaktivität und Antikörperkonzentration und die resultierenden Aktivitätskurven ähneln den IDS-Aktivitätskurven von Patient 23 und 26 (195-197). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den neutralisierenden Antikörpern von Patient Nr. 23 und 26 um Typ II Antikörper mit komplexer Beziehung zwischen Restaktivität und Antikörperkonzentration handelt. Zudem steht der Befund in Übereinstimmung mit der Annahme von Ponce et al. nach der das Serum der NAK+ Patienten unterschiedliche Antikörper beinhaltet, welche mit verschiedenen Epitopen des Enzyms der ERT interagiert (159;195). Auch Gawryl und Hoyer sprachen bei Typ II Antikörpern von einer heterogenen Zusammensetzung, die mit mehreren Epitopen reagieren. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass die Epitope an denen die Typ II Antikörper binden weiter vom katalytischen Zentrum entfernt liegen als die der Typ I Antikörper. Sie vermuteten ebenso, dass sterische Effekte bei der Hemmung eine Rolle spielen könnten und dass die Immunkomplexe noch eine Restaktivität aufweisen können (195). Trifft dies auch auf M. Hunter Antikörper zu, so müsste man von Typ II Antikörpern ausge-

hen, deren heterogene Zusammensetzung das substituierte Enzym nur partiell hemmt.

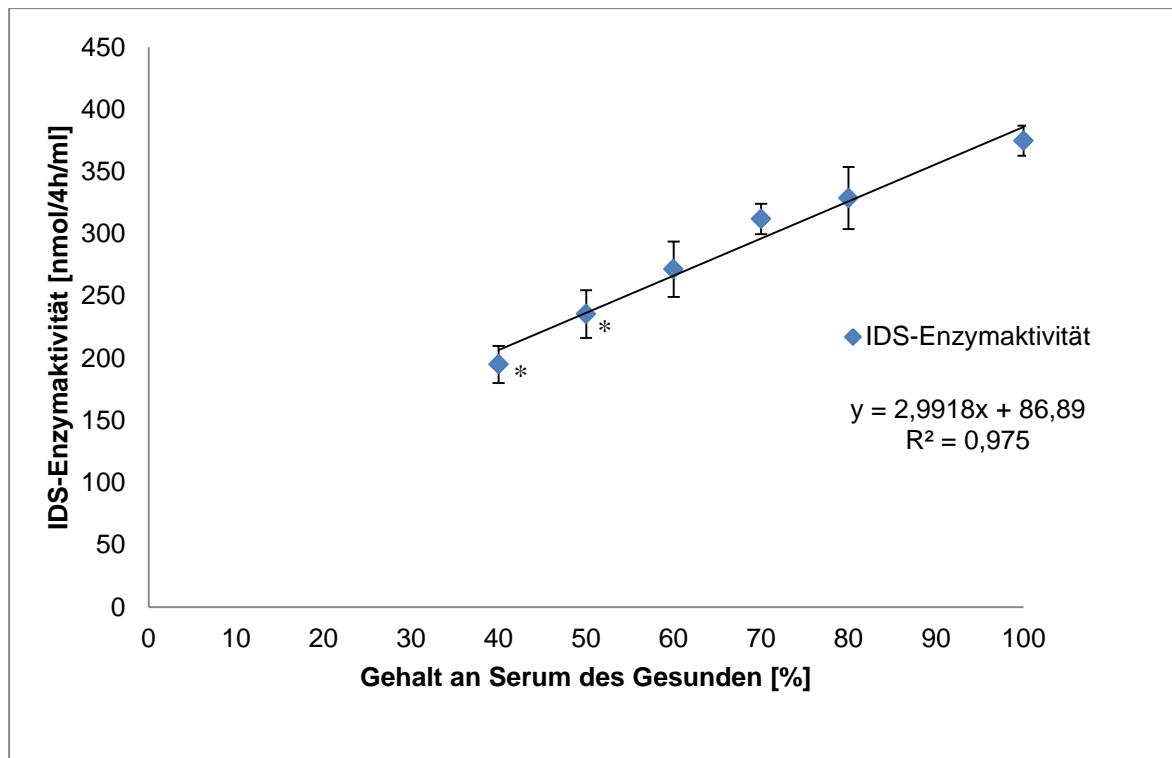
Bei Patienten mit neutralisierenden Antikörpern könnte es sinnvoll sein zu klären, wieviel  $\mu\text{l}$  Patientenserum für eine 50% Hemmung einer bestimmten Menge an Idursulfase nötig sind (159). Dies würde eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Patienten mit neutralisierenden Antikörpern untereinander schaffen, da die IDS-Aktivität des Gesunden ebenfalls Schwankungen unterliegt. Es würde jedoch auch bedeuten, den Patienten bei jedem Besuch mehr Blut abzunehmen, um eine ausreichende Blutmenge für die anschließenden Tests zu gewährleisten.

### **Einfluss der Verdünnungslösung auf die IDS-Aktivität**

#### 1. Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität von Serum eines gesunden Menschen und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung

Für die Neutralisationskapazitätsbestimmung wurde Aqua ad iniectabilia als Verdünnungsmittel verwendet, deshalb wurde im Anschluss überprüft inwieweit dieses Verdünnungsmittel Einfluss auf die Aktivität von IDS besitzt. Die Ergebnisse der Untersuchung bestätigen, dass je mehr Serum des Gesunden und demnach auch je mehr IDS in den Proben enthalten war, desto mehr stieg die gemessene Aktivität an. Die in Abbildung 11 gezeigte Parabelform der IDS-Aktivität in Abhängigkeit von der Serumkonzentration wurde auch bei der Validierung des Assays im hiesigen Biochemischen Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin gefunden (173).

In Abbildung 35 ist die Regressionsgerade für 40% bis 100% Gehalt an Serum des Gesunden dargestellt. Linearität konnte  $\geq 40\%$  Gehalts an Serum des Gesunden festgestellt werden. Die Regressionsgerade kann mit der Geradengleichung  $y = 2,9918x + 86,89$  beschrieben werden. Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  beträgt 0,975.



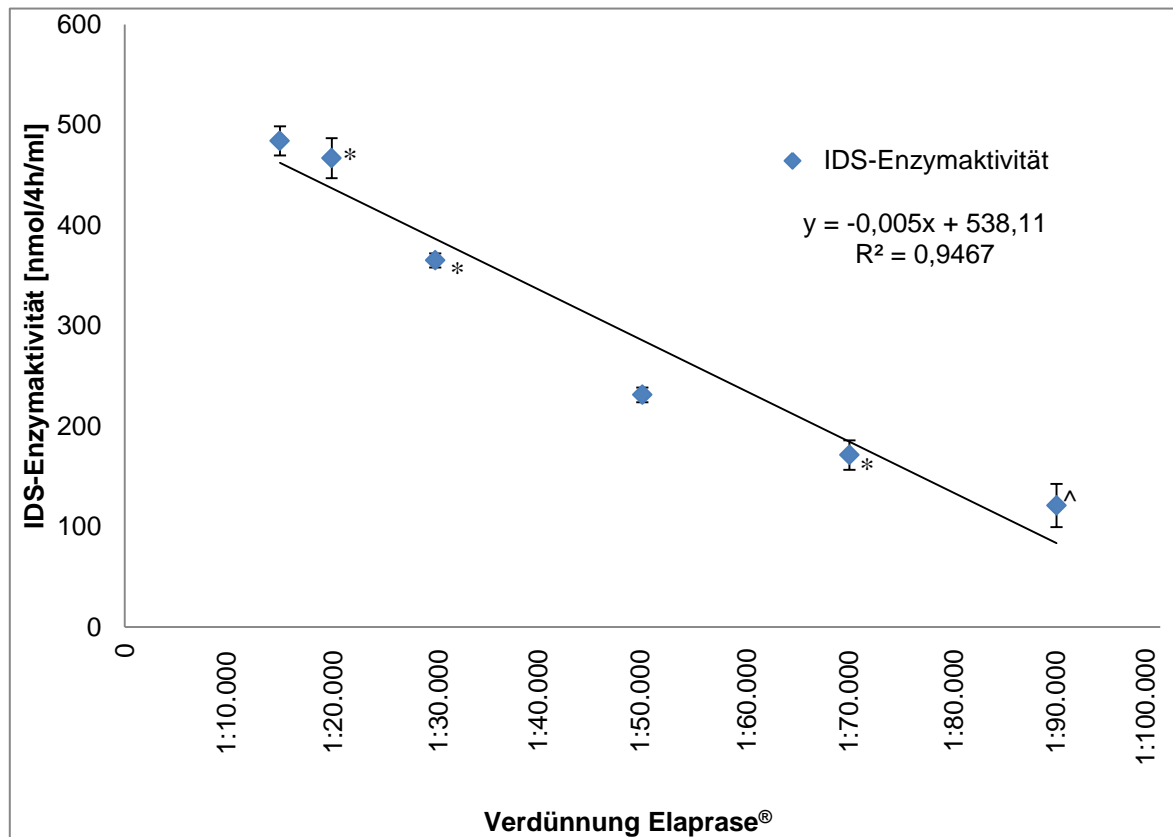
**Abbildung 35: Lineare Regressionsgerade der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung und 40% bis 100% Serum eines Gesunden (\*n=3)**

Innerhalb des Konzentrationsbereichs 40-100% hat Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung keinen Einfluss auf die Aktivität von IDS. Unterhalb von 195 nmol/4h/ml besteht kein linearer Zusammenhang. Die untere Nachweisgrenze (Lower limit of quantification (LLOQ)) liegt etwa bei 130 nmol/4h/ml (hier bei 35% Anteil an Serum des Gesunden). Dieser Wert zeigt auch sehr hohe Standardabweichungen. Überträgt man diese Ergebnisse auf die Messung der Neutralisationskapazität im Mischserum würde dies bedeuten, dass die im Serum des Gesunden gemessene IDS-Aktivität dahin gehend zu prüfen ist, ob genügend Enzymaktivität vorhanden ist, dass eine 1:1 Verdünnung immer noch valide Ergebnisse liefert. Um zu vermeiden, dass Patienten deren IDS-Bestimmungen im Mischserum innerhalb des Grenzbereiches lagen als PNAK+ galten, wurde analog Barbier et al. festgelegt, dass an drei oder mehr aufeinanderfolgenden Blutuntersuchungen neutralisierende Antikörper gefunden werden müssen (148). Bei allen als NAK+ eingestuften Blutproben lagen die IDS-Aktivitäten im Mischserum unterhalb von 48 nmol/4h/ml (siehe Tabelle 15). Die Absolutwerte der Blutproben, die als NAK+ eingestuft wurden, sind daher wahrscheinlich nicht als valide einzustufen, aber es liegt eindeutig eine Hemmung der IDS vor. Drei Sollwerte bei den IDS-Aktivitätsmessungen im Mischserum mit reduzierter Aktivität von Patient Nr.

23 und 26 lagen zwischen 121 nmol/4h/ml und 130 nmol/4h/ml und somit im Grenzbereich der LLOQ, jedoch war dies für die Einteilung der Patienten als PNAK+ nicht relevant.

## 2. Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität mit Elaprase<sup>®</sup> und Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung

Zur Validierung der Enzymaktivitätsmessungen bei höheren Nennaktivitäten wurde der Effekt der Verdünnungslösung nicht im Serum, sondern mit dem ERT Präparat Elaprase<sup>®</sup> untersucht. Die genaue Nennaktivität der eingesetzten Idursulfase ist aufgrund eines nicht vergleichbaren Assays zur Bestimmung der IDS-Enzymaktivität bei Shire Pharmaceuticals unbekannt. Abbildung 12 zeigt, dass bei höheren Verdünnungen geringere Enzymaktivitäten gemessen wurden. Die Kurve beinhaltet einen starken Anstieg der Enzymaktivität bei einer Verdünnung von 1:12.500 und 602 nmol/4h/ml. Bei sehr hohen Konzentrationen von Elaprase<sup>®</sup> wurden außerdem große Standardabweichungen festgestellt. Das spricht für eine Ungenauigkeit der Testung bei sehr hohen Enzymaktivitäten, so dass auch bei Werten ab 600 nmol/4h/ml keine valide Quantifizierung möglich ist und hier vermutlich die obere Nachweisgrenze (Upper limit of quantification (ULOQ)) liegt. Bei der Bestimmung der Neutralisationskapazität im Mischserum wurde kein Wert in diesen Bereichen gemessen (siehe Anhang 14 Tabelle 38). Die in Abbildung 36 dargestellte Regressionsgerade enthält die Werte unterhalb von 602 nmol/4h/ml mit den Verdünnungen 1:15.000 bis 1:90:000 und konnte mit der Geradengleichung  $y = -0,005x + 538,11$  beschrieben werden. Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  beträgt 0,9467.



**Abbildung 36:** Lineare Regressionsgrade der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung der Elaprase®-Verdünnungen 1:15.000 bis 1:90.000 mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung (\*n=3, ^n=2)

Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches hat Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung keinen Einfluss auf die Aktivität von IDS und es kann bei gemessenen Enzymaktivitäten unterhalb von 600 nmol/4h/ml bis hin zu 130 nmol/4h/ml (=LLOQ) von validen Ergebnissen ausgegangen werden. Bei den IDS-Aktivitätsmessungen im Mischserum mit reduzierter Aktivität entsprach der geringste Sollwert der zu messenden Aktivität 121 nmol/4h/ml bei einer 1:1 Verdünnung des Serum des Gesunden mit dem Patientenserum (siehe Tabelle 15). Dies liegt im Grenzbereich der LLOQ, jedoch wurde kein Patient aufgrund von einem einzelnen Ergebnis als PNAK+ eingestuft.

### 3. Verdünnungsreihe und Messung der IDS-Aktivität mit Elaprase® und Dulbecco Puffer als Verdünnungslösung

In einem weiteren Versuch wurde Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung für Elaprase® mit Dulbecco Puffer ausgetauscht, um zu sehen, ob mit einer physiologischen Verdünnungslösung über einen größeren Konzentrationsbereich eine li-

neare Beziehung für die IDS-Aktivität vorliegt und in wieweit der pH-Wert eine Rolle bei der IDS-Aktivitätsmessung spielt. Dulbecco Puffer ist eine ausgewogene Salzlösung, die für die Handhabung und das Kultivieren von Säugetierzellen verwendet wird. Der Phosphatpuffer hält den pH-Wert im physiologischen Bereich (198). Bei gleichen Verdünnungen lagen die gemessenen Enzymaktivitäten weit unter denjenigen mit Aqua ad iniectionabilia als Verdünnungslösung. Das pH-Optimum der IDS liegt zwischen 4,8 und 5,2, so dass eine Pufferlösung wie Dulbecco Puffer ein ungünstiges Medium zur Messung der IDS-Enzymaktivität ist. Jenseits des pH-Optimums verringert sich die Enzymaktivität und kann vermutlich ab einem bestimmten pH-Wert auch komplett erliegen (79). Allerdings bestätigen die Ergebnisse dieser Untersuchung die Sensitivität und Spezifität der gewählten Methode.

#### 4. Messung der IDS-Aktivität von Elaprase<sup>®</sup> 1:10.000 Verdünnung und vier verschiedenen Verdünnungslösungen

In einem abschließenden Versuch wurde eine konstante 1:10.000 Verdünnung von Elaprase<sup>®</sup> mit verschiedenen Verdünnungslösungen und Mischungsverhältnissen hergestellt und die IDS-Enzymaktivität gemessen. Dabei wurde bestätigt, dass Dulbecco Puffer aufgrund seiner Pufferkapazität und der Ionenkonzentration einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität von IDS hat. Auch isotone Kochsalzlösung als Verdünnungslösung reduzierte die IDS-Aktivitäten. Es kommt durch die in der Lösung vorhandenen Ionen wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung des Enzyms, welche eine reduzierte Aktivität zur Folge hat. Der Zusatz von Humanalbumin scheint jedoch einen positiven Einfluss auf die Enzymaktivität von IDS zu haben. Humanalbumin wurde zugefügt, weil in der aktualisierten Herstelleranleitung zur Messung der IDS-Aktivität im Serum der Zusatz von 0,2% Humanalbumin-Lösung und nicht reines Aqua ad iniectionabilia als Blindprobe empfohlen wird (191). Bei extremer Verdünnung von Elaprase<sup>®</sup> lagen keine physiologischen Bedingungen im Medium vor. Der Zusatz von Humanalbumin zu der isotonen Natriumchloridlösung sollte die Bedingungen im Serum nachahmen. Ein deutlicher Anstieg der gemessenen IDS-Enzymaktivität konnte jedoch nur erreicht werden, wenn die beiden Verdünnungsschritte und Messung mit der Mischung aus isotoner Natriumchloridlösung/Humanalbumin durchgeführt wurden. Das Ergebnis lag mehr als doppelt so hoch als das der ausschließlich mit Aqua ad iniectionabilia her-

gestellten Probe. Vermutlich stabilisiert der Zusatz von Humanalbumin das Enzym IDS und verhindert eine Adsorption des Enzyms an die Reaktionsgefäße und die Pipettenoberflächen (199;200). Die Herstelleranleitung empfiehlt, dass die 1:5 Verdünnung im Inkubationsschritt 1 der Aktivitätsmessung von IDS ausschließlich mit Aqua herzustellen ist (191). Da die Validierung im hiesigen Biochemischen Labor ohne Humanalbumin-Zusatz und ausschließlich mit Aqua ad iniectabilia durchgeführt worden war, wurde Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung für die Untersuchungen beibehalten (173). Zudem befindet sich die gemessene Enzymaktivität mit Aqua ad iniectabilia als Verdünnungslösung im linearen Bereich der Regressionsgeraden und ergibt somit valide Ergebnisse zur IDS-Enzymaktivität (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 36). Shire Pharmaceuticals verwendet zur Bestimmung der Nennaktivität der eingesetzten Idursulfase einen nicht vergleichbaren Assay mit verschiedenen Reaktionskomponenten und Reaktionsbedingungen. Für einen gültigen Vergleich müssten die gleichen Reaktionsbedingungen verwendet werden (201).

### **5.3 Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin G und E bei Morbus Hunter-Patienten**

Es ist festzustellen, dass Patienten, die eine reduzierte IDS-Aktivität im Mischserum zeigen, auch immer positiv auf Anti-Elaprase<sup>®</sup>-IgG getestet wurden und diese sogar persistierend aufwiesen. Es scheint somit eine Kausalität zwischen einer reduzierten IDS-Aktivität im Mischserum und dem Nachweis von Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin G zu geben. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass – wie bereits von Linthorst et al. vermutet – Anti-Elaprase<sup>®</sup>-IgG auch bei M. Hunter eine Rolle bei den reduzierten Enzymaktivitäten im Mischserum spielt (163).

Der Antikörperstatus und die Beziehung zwischen dem Auftreten von Anti-Elaprase<sup>®</sup>-IgG und neutralisierenden Antikörpern ist in Tabelle 21 in 4.3 gezeigt. Vergleicht man die Daten mit den Resultaten der 63 untersuchten Patienten von Barbier et al., so sind die Ergebnisse sehr ähnlich. Barbier et al. fanden in ihrer Studie bei 32 Patienten (51%) in mindestens einer Blutabnahme Anti-Elaprase<sup>®</sup>-IgG. 23 Patienten (37%) entwickelten diese persistierend. 13 Patienten (21%) wurden positiv auf neutralisierende Antikörper getestet und acht Patienten (13%) zeigten persistierende neutralisierende Antikörper (148). Die Unterschiede der Prozentzahlen zu den eigenen Ergebnissen können auf das kleine Patientenkollektiv zurückgeführt werden. Eine Ähnlichkeit ist jedoch deutlich erkennbar.

Die gebildeten Anti-Elapraser<sup>®</sup>-IgG haben zu einem hohen Anteil neutralisierende Eigenschaften. Zudem scheint eine heterogene Zusammensetzung der neutralisierenden Antikörpern vorzuliegen, die jeweils mit den unterschiedlichsten Epitopen der rekombinanten IDS reagieren und Anti-Elapraser<sup>®</sup>-IgG beinhalten (159;195).

Bezieht man die Zeitpunkte der Bestimmungen mit ein, so stimmt die Einteilung der Patienten aufgrund der Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitäten im Mischserum mit denen der Anti-Elapraser<sup>®</sup>-Immunglobulin G-Bestimmung bezüglich der persistierenden neutralisierenden Antikörper überein (vgl. 4.3). Bei Patienten mit nicht persistierenden neutralisierenden Antikörpern (PatID 3, 29) kann von einer Toleranzentwicklung ausgegangen werden, die wahrscheinlich wie bei M. Gaucher-Patienten mit einer verringerter Produktion von neutralisierenden Antikörpern einhergeht (156).

#### **5.4 Korrelation der biochemischen und klinischen Parameter mit den Antikörperbestimmungen**

Bei der Auswertung der biochemischen und klinischen Parameter wurden die jeweils erste und letzte Untersuchung des Patienten verglichen, da die erhobenen Daten sehr heterogen in ihrer Dichte und der Länge des Beobachtungszeitraums waren. Der Startpunkt der ERT war bei allen Patienten sehr verschieden und somit variierte auch die Länge des Beobachtungszeitraums. Die Dichte der erhobenen Daten schwankt ebenfalls von Patient zu Patient, da nicht jeder Patient bzw. dessen Eltern halbjährlich die Verlaufskontrollen wahrnahm. Die Gründe hierfür können mangelnde Verbesserung und das frühere Versterben der neuropathisch betroffenen Patienten sein (81). Die Auswertung und Beurteilung gestaltete sich somit schwierig.

##### **5.4.1 Glykosaminoglykan-Ausscheidung (DMB-Test)**

Bei den teilnehmenden M. Hunter-Patienten sinkt die GAG-Ausscheidung im Urin je länger sie die ERT erhielten. Diese Entwicklung war übereinstimmend mit den Zulassungsstudien und der offenen Anschlussstudie (103;140;147). 53% der Patienten zeigten sogar eine Abnahme, in der Phase II/III der klinischen Studie hatten 26 von 64 Patienten (41%) nach 53 Wochen ERT normalisierte GAG-Ausscheidungen im Urin.



Die Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern gegen Elaprase<sup>®</sup> hatten nur bei 2 der 18 Untersuchungen GAG-Ausscheidungen in Urin unterhalb des Normwertes. Ein Einfluss der persistierenden NAK auf die GAG-Ausscheidung kann allerdings daraus nicht abgeleitet werden. Barbier et al. beschreiben, dass die Entwicklung von Antikörpern einen Einfluss auf die GAG-Ausscheidung im Urin hat, den sie jedoch nicht als klinisch relevant ansehen. Bei allen Patienten reduzierte sich die GAG-Ausscheidung, jedoch zeigten sowohl die AK+ als auch die NAK+ Patienten höhere GAG-Ausscheidungen als die jeweils Antikörper-negativen Patientengruppen. Sie gingen von inhärenten Unterschieden der Patienten aus, die sich bei diesem Parameter auswirken. Barbier et al. beschrieben jedoch nicht die Untergruppe der PNAK+ Patienten und beschränkten sich in Ihrer Auswertung nur auf nicht neuropathisch betroffene Patienten, so dass keine direkte Vergleichbarkeit der Studien vorhanden ist (148). Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um mehr Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern, z.B. in HOS, zu identifizieren und hinsichtlich des Einflusses dieser Antikörper auf die Entwicklung der GAG-Ausscheidung im Urin zu untersuchen.

#### **5.4.2 Kardiologische Beteiligung**

Die kardiologische Beteiligung ist bei M. Hunter-Patienten progressiv und beginnt bereits in einem frühen Stadium. Etwa zwei Drittel der Patienten zeigten in einer Untersuchung von Kampmann et al. kardiologische Symptome (116). Die Überwachung der kardiologischen Parameter ist bei M. Hunter-Patienten unerlässlich, da es eine der wenigen Untersuchungen ist, bei der die neuropathische Beteiligung der Patienten eine untergeordnete Rolle spielt, da nur eine geringe Mithilfe der Patienten bei der Untersuchung nötig ist. Jedoch sind Patienten mit neuropathischer Beteiligung oft unruhig, so dass eine Mehrfacherhebung und eine Verwendung der Mittelwerte meist nicht möglich waren. Die Echokardiographie weist zusätzlich eine hohe Interobserver-Variabilität bei gleicher Intraobserver-Variabilität auf. Mithilfe der Strategie, dass die Untersuchungen von einem erfahrenen Kinderkardiologen durchgeführt wurden, umging man diese Methodenschwäche (2;179). Kritisch muss außerdem betrachtet werden, dass bei dieser Untersuchung der Mainzer M. Hunter-Patienten nicht über einen gleichen Zeitraum die gleiche Anzahl an Patienten beobachtet wurde. So wurden die Ergebnisse der jeweils ers-

ten und letzten Untersuchung des Patienten verglichen, da auch die erhobenen Daten sehr heterogen in ihrer Dichte waren. Um eine valide Aussage über den Effekt der ERT und den Einfluss der neutralisierenden Antikörper auf den Effekt treffen zu können, müsste eine konstante Patientenzahl und eine größeren Zahl an PNAK+ Patienten über einen definierten Zeitraum beobachtet und in regelmäßigen Zeitabständen untersucht werden.

### **1. Relative Wanddicke des linken Ventrikels (RWT) und auf die Körperlänge indizierte linksventrikuläre Muskelmasse (LVM\_H)**

Zur besseren Vergleichbarkeit der Patienten wurde mit der LVM\_H gearbeitet, dabei wird die linksventrikuläre Muskelmasse auf die Körperlänge indiziert. Die Häufigkeit der Kardiomyopathie kann dabei als falsch zu hoch angenommen werden, da die M. Hunter-Patienten aufgrund der Gelenkkontrakturen Schwierigkeiten haben sich gerade aufzustellen und die Feststellung der Körpergröße problematisch ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass häufig eine zu kleine gemessene Körperlänge verwendet wurde, die wiederum eine zu hohe LVM\_H als Folge hat (116;140;202). Zusätzlich muss ein positiver Effekt der ERT auf die Gelenkkontrakturen bedacht werden. Für den Effekt auf die LVM\_H würde dies bedeuten, dass sich zusätzlich zum Rückgang der LVM\_H aufgrund der ERT, die LVM\_H auch aufgrund der besseren Beweglichkeit der Wirbelsäule, resultierend in einer größeren Körperlänge, zurückgeht (116;140;202).

Bei 30% der Patienten zeigte sich eine Verbesserung der LVM\_H unter ERT, bei 40% zeigte sich keine Veränderung. Nur 10% verschlechterten sich bzgl. der LVM\_H. In zwei früheren Studien wurde die Abnahme der LVM\_H bei M. Hunter-Patienten unter ERT berichtet (143;202). Es kann demnach von einem positiven Einfluss der ERT auf die LVM\_H ausgegangen werden. Beide Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern zeigten ebenfalls eine Verbesserung oder keine Veränderung der LVM\_H unter ERT. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Ergebnisse der RWT. 33% der Patienten zeigen einen Rückgang, 50% keine Veränderung der RWT unter ERT. Eine Abnahme der RWT unter ERT wurde auch 2011 von Sulisty Winarto beschrieben (202). Es kann demnach ausgegangen werden, dass die ERT einen positiven Einfluss auf die Geometrie des linken Ventrikels hat. Beide Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern zeigten ebenfalls eine Verbesserung oder keine Veränderung der RWT unter ERT.

Aufgrund der kleinen Patientenzahl mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern lässt sich keine Aussage machen, ob diese einen Einfluss auf die LVM\_H oder RWT haben. Weitere Untersuchungen sind nötig, um mehr Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern, z.B. in HOS, zu identifizieren und hinsichtlich des Einflusses dieser Antikörper auf die Entwicklung der LVM\_H und RWT zu untersuchen.

## **2. Aortenklappeninsuffizienz (AI) und Mitralklappeninsuffizienz (MI)**

Für andere Mukopolysaccharidosen wurde berichtet, dass die ERT eine Stabilisierung der AI und MI bewirkt ohne eine bereits entstandene Klappeninsuffizienz zu verbessern (181;203). Ein direkter Vergleich von bisher veröffentlichten Studien ist jedoch schwierig, da die Unterteilung der Schweregrade der Insuffizienzen sich in den Studien unterscheidet. Auch die Einteilung der Schweregrade ist nicht immer beschrieben. In der hier vorliegenden Studie wurden die Schweregrade der Insuffizienzen nach Zoghbi et al. kategorisiert (180).

Im Mainzer Kollektiv der M. Hunter-Patienten konnten die stabilisierenden Effekte der ERT bestätigt werden. Ein Großteil der Patienten (60% bzw. 50%) zeigten keine Veränderung der AI bzw. MI unter ERT. Bei 10% bzw. 30% der Patienten verbesserten sich die AI bzw. MI unter ERT. Bei 20% bzw. 10% der Patienten hingegen verschlechterten sich die AI bzw. MI unter ERT. Die Veränderungen der Insuffizienzen unter einem echokardiographisch diagnostizierten Grad gingen nicht mit ein, da dieser dem Interpretationsspielraum des Untersuchers entspricht.

Der PNAK+ Patient Nr. 23 zeigte im Verlauf eine Verschlechterung beider Klappeninsuffizienzen. Bei diesem Patient scheinen die persistierenden neutralisierenden Antikörper den stabilisierenden Effekt der ERT aufzuheben. Patient Nr. 26 zeigte jedoch keine Veränderung der AI und die MI verbesserte sich sogar im Verlauf der ERT um einen Schweregrad. Aufgrund der kleinen Patientenzahl und der unterschiedlichen Entwicklung der beiden Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern lässt sich keine Aussage machen, ob diese einen Einfluss auf die Entwicklung der AI bzw. MI hat. Weitere Untersuchungen sind nötig, um mehr Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern zu identifizieren und hinsichtlich des Einflusses dieser Antikörper auf die Entwicklung der AI und MI zu untersuchen.

### **3. Aortenstenose (AS) und Mitralstenose (MS)**

Bis heute gibt es kaum Berichte, die den Einfluss der ERT auf Aorten- und Mitralstenose bei Patienten mit Mukopolysaccharidosen betrachten. Kampmann et al. berichteten von Aorten- und Mitralstenosen ohne auf den klinischen Effekt der ERT einzugehen (116). Für M. Maroteaux-Lamy wurde erst kürzlich gezeigt, dass nach einer durchschnittlichen ERT-Therapiedauer von 5,6 Jahren keine Änderung der Aorten- und Mitralinsuffizienz oder der Aorten- und Mitralstenose festgestellt wurde (181). Auch bezüglich der Stenosen ist ein direkter Vergleich von bisher veröffentlichten Studien schwierig, da die Kategorisierung der Schweregrade der Stenose sich in den Studien unterscheidet. In der hier vorliegenden Studie wurden die Schweregrade der Aortenstenose nach Kampmann et al., die der Mitralstenose nach Bonow et al. kategorisiert (181;182).

Bereits die Mediane im Mainzer Kollektiv der M. Hunter-Patienten, die in Tabelle 26 dargestellt sind, zeigen keine oder geringe mittlere Druckgradienten über der Aorten- bzw. Mitralklappe, jedoch weist der maximal gemessene Druckgradient sowohl über der Aorten- als auch der Mitralklappe auf Stenosen hin. Die in dieser Studie untersuchten M. Hunter-Patienten weisen ebenfalls mit ihren Ergebnissen auf zumindest eine weitgehende Stabilisierung im Hinblick auf die Aorten- bzw. Mitralstenose hin. Der größte Teil der Patienten (70% bzw. 67%) zeigte keine Veränderung der AS bzw. MS unter ERT. Bei einem geringen Teil verbesserte sich und bei einem noch geringeren Teil verschlechterte sich die AS bzw. MS unter ERT.

Beide Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern zeigten unter ERT keine Veränderung der Stenosen. Aufgrund der kleinen Patientenzahl mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern lässt sich keine Aussage machen, ob diese einen Einfluss auf die Entwicklung der AS bzw. MS haben. Weitere Untersuchungen sind nötig, um mehr Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern zu identifizieren und hinsichtlich des Einflusses dieser Antikörper auf die Entwicklung der AS und MS zu untersuchen.

#### **5.4.3 Respiratorische Beteiligung**

In früheren Studien wurde gezeigt, dass Elaprase<sup>®</sup> zwar keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die FVC in Prozent vom Soll hat, jedoch die absolute FVC sig-

nifikant verbessert (103;140). Auch Okuyama et al. beschrieben bei neun M. Hunter-Patienten eine klinisch bedeutsame, aber nicht signifikante Verbesserung der Vitalkapazität nach zwölf Monaten ERT (143). Der Einfluss von ERT auf  $FEV_1$  ist bisher noch nicht untersucht, so dass kein Vergleich gezogen werden kann. In der vorliegenden Untersuchung zeigten 20% der Patienten eine Verbesserung, 23% keine Veränderung und 10% eine Verschlechterung der FVC in Prozent vom Soll. Ähnliche Werte ergaben sich bei der Auswertung zu  $FEV_1$  in Prozent vom Soll. Aufgrund des Alters, fehlender Mitarbeit oder einer gravierenden neuropathischen Beteiligung waren 14 Patienten (47%) der Patienten gar nicht dazu in der Lage eine Spirometrie oder Bodyplethysmographie durchzuführen, da beide Messmethoden eine Mitarbeit des Patienten erfordern. Wurde eine Messung mit reduzierter Mitarbeit des Patienten durchgeführt, so sind bei dieser Messung schlechtere Lungenkapazitäten bestimmt worden als dies bei vollständiger Mitarbeit der Fall gewesen wären. Ob die Unterstützung des untersuchten Patienten ausreichend für eine aussagekräftige Messung war, entschied der jeweilig durchführende Mitarbeiter. Auch das Alter ist ein nicht zu vernachlässigender Aspekt, da viele M. Hunter-Patienten noch nicht das Erwachsenenalter erreicht hatten. Das mediane Alter der Patienten betrug zum Auswertungstermin 13 Jahre (siehe 4.1.1). Kinder und Jugendliche für eine Lungenfunktionsmessung und allgemein zu einem regelmäßigen Arztbesuch zu motivieren, kann sich als sehr schwierig erweisen und wirkt sich in jedem Fall auf die Mitarbeit bei den durchzuführenden Messungen aus. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Studienkollektive lässt keine Vergleiche der Ergebnisse zu. Kritisch muss betrachtet werden, dass bei dieser Untersuchung der Mainzer M. Hunter-Patienten nicht über einen gleichen Zeitraum die gleiche Anzahl an Patienten beobachtet wurde. So wurde die jeweils erste und letzte Untersuchung des Patienten verglichen, da auch die erhobenen Daten sehr heterogen in ihrer Dichte waren. Die Gründe hierfür sind in 5.4 genannt.

Beide PNAK+ Patienten Nr. 23 und 26 konnten die respiratorischen Tests nicht durchführen und es kann somit keine Aussage getroffen werden, ob persistierende neutralisierende Antikörper einen Einfluss auf die respiratorische Beteiligung der M. Hunter-Patienten haben. Barbier et al. untersuchten den Einfluss von Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Antikörpern bei M. Hunter-Patienten ohne neuropathische Beteiligung und fand keinen Einfluss der Antikörper auf die FVC in Prozent vom Soll (148). Da sich diese Untersuchung jedoch nur auf nicht neuropathisch betroffenen Patienten

beschränkt, kann man diese Aussage ebenfalls nicht auf das ganze Kollektiv an M. Hunter-Patienten ausweiten. Weitere Untersuchungen sind nötig, um mehr Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern zu identifizieren, die eine Spirometrie oder Bodyplethysmographie durchführen können, und hinsichtlich des Einflusses dieser Antikörper auf die Entwicklung der respiratorischen Beteiligung zu untersuchen.

#### **5.4.4 Ergebnisse der Gelenkbeweglichkeit**

Ursächlich für die komplexen Veränderungen im muskuloskelettalen System werden die Akkumulation der GAG in Knorpel, Knochen und Bindegewebe, die sich auch in verdickten Gelenkkapseln bemerkbar machen, sowie entzündliche und apoptotische Prozesse gesehen (1;89). Eine Verminderung der Akkumulation von GAG durch ERT kann somit in einer Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit resultieren. Laut Morini et al. gehört die Schulter – und deren Limitation der Flexion – zu den meist betroffenen Gelenken und besitzt somit eine gute Aussagekraft für diese Untersuchung (93). Die meisten Patienten hatten eine Schulter mit größerer Flexion, was vermutlich an der Händigkeit der Patienten und der damit verbundenen häufigeren Bewegung und indirektem Training im Alltag liegt. Mehrere Autoren betonen die Bedeutung von Bewegungsübungen und Physiotherapie für die Gelenkbeweglichkeit, auch wenn es bis jetzt noch keinen Nachweis über den Nutzen der Physiotherapie für die Gelenkbeweglichkeit der M. Hunter-Patienten gibt (89;93). Die regelmäßige Durchführung von physiotherapeutischen Bewegungen erschwert die Vergleichbarkeit der Studien untereinander, da es sehr wahrscheinlich ist, dass diese die Gelenkbeweglichkeit erhöhen. Zusätzlich muss in Betracht gezogen werden, dass auch hier eine gewisse Mitarbeit des Patienten nötig war. War diese nicht vorhanden und erhöhte der Patient die Muskelspannung, so wurden zu geringe ROM-Werte gemessen. In den meisten Fällen wurde die Messung der ROM dann allerdings abgebrochen. Auch bei dieser Untersuchung spielt das Alter des Patienten eine Rolle. Es ist zusätzlich kritisch anzumerken, dass bei dieser Untersuchung der Mainzer M. Hunter-Patienten nicht über einen gleichen Zeitraum die gleiche Anzahl an Patienten beobachtet wurde.

In der vorliegenden Untersuchung zeigten 50% der Patienten eine Verbesserung, 23% keine Veränderung und 27% eine Verschlechterung der rechten Schulterflexion unter ERT. Ähnliche Werte ergaben sich bei der Auswertung der linken

Schulterflexion. Somit profitiert ein Großteil der untersuchten Patienten von der ERT. Die Ergebnisse sind übereinstimmend mit denen anderer Studien in denen eine Verbesserung der Schulterflexion unter ERT beschrieben wurde (103;143). Der PNAK+ Patient Nr. 23 zeigte Verschlechterungen sowohl der linken als auch rechten Schulterflexion. Patient Nr. 26, ebenfalls mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern, zeigte rechts eine Verbesserung und links keine Veränderung der Schulterflexion im Verlauf. Aufgrund der kleinen Patientenzahl und der unterschiedlichen Entwicklung der beiden Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern lässt sich keine Aussage machen, ob diese einen Einfluss auf die Entwicklung der Gelenkbeweglichkeit der Schulter hat. Die Fragestellung müsste in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

#### **5.4.5 Ergebnisse der Gehstrecke**

Die ERT führt zur Verbesserung der Gehstrecke im 6MGT (103;140;143;147). Eine klinisch bedeutsame Verbesserung der gelaufenen Gehstrecke im 6MGT wurde für die vorliegende Studie erst ab einer Verlängerung um mehr als 35 Meter definiert und für jeden Patienten einzeln ausgewertet. Somit sind die bisher veröffentlichten Studien nicht direkt vergleichbar mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie. Es zeigten 23% der Patienten eine Verbesserung, 33% keine Veränderung und 33% eine Verschlechterung der Gehstrecke im 6MGT unter ERT. Ein Großteil der Patienten zeigte somit mindestens eine Stabilisierung der Gehstrecke.

Beide PNAK+ Patienten mussten fast alle Gehtests unter Begleitung absolvieren und zeigten beide eine Verschlechterung im Verlauf der ERT. Aufgrund der kleinen Patientenzahl mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern lässt sich keine Aussage machen, ob diese einen Einfluss auf die Entwicklung der Gehstrecke hat. Barbier et al. untersuchte ebenfalls den Einfluss von Antikörpern gegen Elaprase<sup>®</sup> auf die Gehstrecke im 6MGT. Die Arbeitsgruppe beschrieb, dass persistierende neutralisierende Antikörper keinen signifikanten Einfluss auf die gelaufene Gehstrecke haben. Die genaue Auswertung und Werte der gelaufenen Gehstrecke wurden jedoch nicht dargestellt (148). Die unterschiedlichen Ergebnisse kommen wahrscheinlich aufgrund der geringen Patientenzahlen zustande. Erwähnenswert ist zusätzlich die neuropathische Beteiligung beider Patienten, die in vielen Fällen auf die auch hier benötigte Mitarbeit einen Einfluss hat. Auch die Ge-

lenkkontrakturen, die mit dem Alter zunehmen, die körperliche Bewegung im Alltag, die Physiotherapie und die Lungenfunktion sind weitere zu berücksichtigende Faktoren für die Gehstrecke (89). Aufgrund der vielen Einflussfaktoren ist die Aussagekraft der Gehstrecke sehr eingeschränkt.

#### **5.4.6 Immunantwort auf die Enzyersatztherapie**

Barbier et al. fanden einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von infusionsbedingten Reaktionen und der Entwicklung von Antikörpern. Sowohl bei Patienten mit neutralisierenden als auch mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern zeigte sich aufgrund der kleinen Patientenzahl nur eine Tendenz, dass neutralisierende Antikörper das Risiko zum Auftritt einer infusionsbedingten Reaktion deutlich erhöhen (148). Auch Ponce et al. berichteten ebenfalls, dass die Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern bei zwei M. Gaucher-Patienten mit der Entwicklung von allergischen Reaktionen korreliert. Sie vermuteten, dass diese Reaktion Antikörper vermittelt ist (159). Bei den M. Hunter-Patienten dieser Studie sind bei beiden PNAK+ Patienten keine infusionsbedingte Reaktionen dokumentiert. Um zu klären, ob das Risiko zum Auftreten von infusionsbedingten Reaktion mit der Entwicklung von persistierenden neutralisierenden Antikörpern korreliert, müssen mehr Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern, z.B. in HOS, identifiziert und ausgewertet werden.

#### **5.4.7 Validierter Fragebogen der Hunter Outcome Survey (HS-FOCUS)**

Da nur eine geringe Zahl von Fragebögen beantwortet wurde, gestaltete sich die Auswertung und Beurteilung als schwierig. Dies ist auch darin nachvollziehbar, dass bei fünf bzw. sechs Patienten keine Auswertung der Fragebögen möglich war. Die Motivation zum Ausfüllen dieser Fragebögen während einer regulären Verlaufskontrolle war eher gering. Dies lag zum einen an den vielen Untersuchungen, die der Patient an dem Tag zu absolvieren hatte und zum anderen an der zunehmenden Verschlechterung der betroffenen Patienten. Ob der Fragebogen beantwortet oder nicht beantwortet wurde entschied der Patient bzw. dessen Eltern. Alle neuropathischen oder zu jungen Patienten waren außerdem nicht in der Lage einen Fragebogen selbst zu beantworten. Außerdem ist der HS-FOCUS ein relativ langer Fragebogen. Es kann zu einer gewissen Ermüdung bei der Beantwortung der Fragen kommen. Dies kann insbesondere bei Kindern der Fall sein.



Ein kürzer Fragebogen wäre eventuell effizienter und aussagekräftiger (188). Eine gekürzte Version ist mittlerweile validiert und steht zur Verfügung (204).

Gemäß Fragebogen zeigten nur 7% bzw. 10% der Patienten eine Verbesserung, 47% bzw. 43% keine Veränderung und 30% bzw. 27% eine Verschlechterung der beiden abgefragten Handfunktionen unter ERT. Es zeigt sich somit eine Tendenz, dass die Greif- und Fassfunktionen der Hände unter ERT eher stagnieren oder sogar abnehmen. Muenzer et al. berichten von einer verbesserten Lebensqualität für die „Beweglichkeit“ bei 24 bis 36 Monaten ERT. Die Lebensqualität wurde hier mittels des Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) gemessen (103). Der CHAQ Fragebogen ist ein validiertes Instrument zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit von acht Bereichen der körperlichen Funktion und basiert auf 30 Fragen. Die Kategorie „Erreichen“ (engl. Reach) fokussiert nicht nur auf die Greif- bzw. Fassfunktion der Hände, sondern auch auf die Beweglichkeit des Schultergelenks und die Beweglichkeit des Halses (205). Die Vergleichbarkeit dieser beiden Fragebögen ist jedoch nicht gegeben, da der CHAQ viele weitere Funktionen außer der Handfunktion in der Kategorie „Erreichen“ mit einbezieht. Beide PNAK+ Patienten verschlechterten sich im Verlauf in der Fähigkeit eine Münze vom Tisch aufzuheben. Beide waren bei dem letzten Fragebogen gar nicht mehr dazu in der Lage. Es zeigt sich somit eine Tendenz, dass diese diffizile Feinfunktion der Hand sich bei Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern verschlechtert. Auch die Fähigkeit die Hände ganz zu öffnen scheint beeinträchtigt. In Bezug auf die Funktion der Hände spielen jedoch viele weitere Aspekte eine Rolle. Unter anderem der Funktionsstatus der Hände vor Start der ERT, da sie bei den Patienten zusätzlich zu Kontrakturen meist verkürzt und klein sind. Auch ein vorliegendes Karpaltunnelsyndrom beeinträchtigt die Funktion der Hände (1;85;90-93). Eine validere Auswertung wäre möglich gewesen, wenn die gleiche Anzahl an Patienten über einen gleichen Zeitraum beobachtet worden wären und bei jedem Patient ein Fragebogen zum Baselinezeitpunkt zur Verfügung gestanden hätte.

### **5.5 Korrelation des Phänotyps der Morbus Hunter-Patienten mit den Ergebnissen der Neuronenspezifischen Enolase und S-100**

Die Neuronenspezifische Enolase (NSE) und S-100 werden in der neurologischen Diagnostik als Marker einer Hirnschädigung eingesetzt und sind somit potentielle Marker für eine neuropathische Beteiligung bei M. Hunter-Patienten

(171;172;206). Erhöhte NSE-Konzentrationen zeigen sich bei Epilepsie. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen erhöhten NSE-Konzentrationen und dem Auftreten eines Hydrozephalus, der auch bei M. Hunter-Patienten vorkommt, gefunden werden (2;207;208). Erhöhte S-100 Konzentrationen wurden bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Krankheit, Multipler Sklerose und dem Down-Syndrom gefunden (209). Nur zwei M. Hunter-Patienten des untersuchten Kollektivs hatten keine NSE-Konzentrationen oberhalb des Normwertes, obwohl 15 Patienten nicht neuropathisch betroffen sind. Auch die Analyse der S-100 ergab bei zwölf Patienten mindestens eine S-100 Konzentration oberhalb des Normwertes. Fünf dieser Patienten waren nicht neuropathisch, sieben Patienten neuropathisch betroffen. Somit lassen die S-100 Konzentrationen ebenfalls keine Rückschlüsse auf die neuropathische Beteiligung des Patienten zu. Die Ergebnisse weisen aber auf eine Hirnschädigung der Patienten hin, die sich nicht immer als neuropathische Beteiligung der Patienten zeigt. Verantwortlich für die Hirnschädigung scheinen GAG Ablagerungen im Gehirn der M. Hunter-Patienten zu sein (84). Patienten mit moderater und schwerer neuropathischer Beteiligung weisen alle deutlich erhöhte GAG-Ablagerungen im Gehirn auf (84). Es scheint jedoch auch bei M. Hunter-Patienten ohne neuropathische Beteiligung zu Schädigungen zu kommen, die nicht zu einer Retardierung führen, jedoch in erhöhten Werten der S-100 und NSE sichtbar werden. Beide biochemischen Parameter alleine sind somit keine validen Marker zur Vorhersage für eine neuropathische Beteiligung für M. Hunter-Patienten. Auch bildgebende Methoden, wie das MRT des Gehirns zur Evaluierung der neuropathischen Beteiligung korrelieren nicht immer mit dem kognitiven Status des Patienten. In der Studie von Vedolin et al. wurden Hirnatrophie und Hydrozephalus häufiger bei Patienten mit neuropathischer Beteiligung als ohne neuropathische Beteiligung nachgewiesen (210). Wünschenswert wäre eine weitere Untersuchung mit Korrelation der Ergebnisse von S-100 und den Ergebnissen des MRT des Gehirns der Patienten, da diese beiden Untersuchungen die größten Potentiale zur Vorhersage der neuropathischen Beteiligung aufwiesen. Wichtig wäre in diesem Zusammenhang die Bestimmung der S-100 und eine MRT Untersuchung so früh wie möglich, spätestens jedoch zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und dann in regelmäßigen Abständen, so dass auch der Vorhersagezeitpunkt der neuropathischen Beteiligung mittels S-100 und MRT bestimmt werden kann.

## 5.6 Schlussfolgerung

Sowohl in dieser Studie als auch bei Barbier et al. ist das Auftreten von persistierenden neutralisierenden Antikörpern nur auf eine kleine Gruppe der M. Hunter-Patienten beschränkt (148). Aufgrund dessen zeigten sich nur Tendenzen inwieweit die persistierenden neutralisierenden Antikörper Einfluss auf die langfristige Effektivität der ERT haben. Tabelle 37 zeigt eine Übersicht der Veränderungen der klinischen und biochemischen Parameter der beiden PNAK+ Patienten Nr. 23 und 26 im Verlauf der ERT.

**Tabelle 37: Übersicht der Veränderungen der klinischen und biochemischen Parameter der beiden PNAK+ Patienten im Verlauf der ERT**

	Patient Nr. 23	Patient Nr. 26
GAG-Ausscheidung im Urin	↑	↓↑
RWT	↓↑	↑
LVM_H	↑	↓↑
AI	↓	↓↑
MI	↓	↑
AS	↓↑	↓↑
MS	↓↑	↓↑
FVC in Prozent vom Soll	Keine Testung <sup>1</sup>	Keine Testung <sup>1</sup>
FEV <sub>1</sub> in Prozent vom Soll	Keine Testung <sup>1</sup>	Keine Testung <sup>1</sup>
Rechte Schulterflexion	↓	↑
Linke Schulterflexion	↓	↓↑
6MGT	↓	↓
Münze vom Tisch nehmen	↓	↓
Hände ganz zu öffnen	↓	↓↑

↑: Verbesserung, ↓: Verschlechterung, ↓↑: keine Veränderung

<sup>1</sup> Die Patienten konnten aufgrund ihrer neuropathischen Beteiligung keine Lungenfunktionsmessung durchführen.

Aus Tabelle 37 ist ersichtlich, dass sich die beiden PNAK+ Patienten interindividuell in ihrer Entwicklung unterscheiden. Dies erschwert die Beurteilung des Einflusses der persistierenden neutralisierenden Antikörper, da M. Hunter bereits ohnehin ein breites klinisches Spektrum mit individuellen Ausprägungen und Progressi-

on der Symptome aufweist (1-4;6). Es lässt sich aufgrund der kleinen Patientenzahl kaum sagen, ob ein Effekt der Antikörper zu sehen ist. Es ist jedoch deutlich, dass Patient Nr. 23 sich schlechter entwickelt als Patient Nr. 26 und bei den meisten Parametern sich im Verlauf verschlechtert. Fraglich ist jedoch ob dies aufgrund der entwickelten Antikörper geschieht oder aufgrund der Erkrankung an sich. Es ist essentiell, dass in einem größeren Patientenkollektiv mehr Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern identifiziert werden und der Einfluss der Antikörper untersucht wird. In diesem Zusammenhang darf jedoch die neuropathische Beteiligung kein Ausschlusskriterium zur Teilnahme an der Studie sein wie dies bei Muenzer et al. und bei Barbier et al. der Fall war (103;140;148).

## 5.7 Ausblick

Die Enzyme der ERT können die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren, so dass die ZNS-Manifestation der lysosomalen Speicherkrankheiten unbeeinflusst bleibt. Eine Möglichkeit diese Barriere zu überwinden, stellt die intrathekale Injektion der Enzyme dar (6). Bei einem Patienten mit MPS I konnten bereits erste positive Ergebnisse erzielt werden (211). Die Ergebnisse der zurzeit laufenden klinischen Studien zur intrathekalen Therapie als Behandlungsmethode für MPS-Patienten mit neuropathischer Beeinträchtigung werden zeigen, ob eine Verbesserung oder eine Stabilisierung der mentalen Defizite erzielt werden kann (6). Hierbei sind das Risiko einer Infektion im ZNS und eine stärkere Immunreaktion als bei einer intravenösen Verabreichung der ERT in die Nutzen-Risiko-Bewertung einzubeziehen (6). Weitere Möglichkeiten zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bilden die Verwendung von Nanopartikeln und die Hochregulation der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, wie sie physiologisch in der Neonatalperiode vorhanden ist (82;212-214). Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Gentherapie für die Behandlung von M. Hunter, die bisher nur in präklinischen Tierversuchen getestet wurde und ermutigende Ergebnisse hervorgebracht hat (2;122). Auch ein Neugeborenen Screening für eine möglichst frühe Diagnose und Therapieeinleitung wird unter Experten diskutiert. Eine Methode zur Messung der IDS-Aktivität in einem getrockneten Blutstropfen auf Filterpapier ist bereits entwickelt (2;215;216).

## 6 Zusammenfassung

Morbus Hunter gehört zu der Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten. Sie ist eine seltene, progrediente, x-chromosomal vererbte Stoffwechselkrankheit, die durch ein Defizit an Iduronat-2-sulfatase hervorgerufen wird. Als Folge daraus erfolgt kein Abbau von Heparan- und Dermatan-sulfat und die Glykosaminoglykane reichern sich in den Lysosomen der Zelle an. M. Hunter ist eine Multisystemerkrankung und weist ein breites klinisches Spektrum mit interindividuell unterschiedlichem Krankheitsbeginn, Ausprägungen und Progression der Symptome auf. Seit 2007 besteht die Therapieoption einer Enzyersatztherapie mit Elaprase<sup>®</sup>. Einige Patienten entwickeln Antikörper gegen das substituierte Enzym, welche partiell neutralisierende Eigenschaften besitzen.

Ziel dieser Untersuchung war es zu klären, ob die Neutralisationskapazität der gebildeten Antikörper mittels einer Bestimmung im Mischserum festgestellt werden kann und ob persistierende Antikörper mit Neutralisationskapazität zu einer Einschränkung der Wirksamkeit der Enzyersatztherapie führt. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob sich mittels Messung der NSE und S-100 Rückschlüsse auf eine neuropathische Beteiligung ziehen lassen, da bis jetzt noch keine klinische oder biochemische Messmethode existiert, die für M. Hunter-Patienten eine verlässliche Vorhersage für eine neuropathische Beteiligung bietet.

30 Patienten wurden in die retrospektive/prospektive Kohortenstudie eingeschlossen. Bei der Bestimmung der IDS-Aktivität im Mischserum mit einem gesunden Menschen zeigten fünf der Patienten (17%) in zwölf Mischseren eine um  $\geq 40\%$  reduzierte Aktivität. Zwei dieser fünf Patienten wurden mit dieser Methode als positiv für persistierende neutralisierende Antikörper identifiziert. Dies entspricht 7% der 30 untersuchten Patienten. Zum gleichen Ergebnis bezüglich der persistierenden neutralisierenden Antikörper führten die Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin-Bestimmungen unter Berücksichtigung des Bestimmungszeitpunkts, die bei Shire Pharmaceuticals durchgeführt wurden. Die Validität der IDS-Aktivitätsbestimmung im Mischserum wurde damit bestätigt. Die vergleichsweise einfache Bestimmung kann in jedem Labor, welches lysosomale Enzymaktivitäten bestimmt, durchgeführt werden.

Die Untersuchungsergebnisse lassen den Schluss zu, dass die gebildeten Antikörper auch intraindividuell unterschiedlich sind. Zudem interagieren sie mit den

verschiedensten Epitopen des Enzyms der ERT und besitzen nicht alle neutralisierende Eigenschaften. Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung folgt die Hemmung der Enzymaktivität vermutlich keiner eindeutigen Kinetik. Anti-Elaprase<sup>®</sup>-Immunglobulin G spielt für die Neutralisationskapazität jedoch eine wichtige Rolle.

Die beiden Patienten, die als positiv für persistierende neutralisierende Antikörper eingestuft wurden, sind beide neuropathisch betroffen. Ein Patient weist eine interstitielle Deletion einschließlich des benachbarten Locus DXS962 auf, bei dem anderen Patient liegt eine Missense Mutation vor. Die Deletion wird zu den großen, die Missense Mutation den kleinen Genveränderungen zugeordnet, so dass eine kausale Beziehung zwischen dem Auftreten der persistierenden neutralisierenden Antikörper und der zugrunde liegenden Mutation unwahrscheinlich ist.

Die Auswertung und Beurteilung der Einschränkung der Wirksamkeit der Therapie hervorgerufen durch die Antikörper mit Neutralisationskapazität gestaltete sich kompliziert. Im Ergebnis zeigte sich, dass sich die beiden Patienten mit den persistierenden neutralisierenden Antikörpern in der Entwicklung der klinischen Parameter interindividuell stark unterschieden. Um einen Zusammenhang zwischen klinischem Verlauf und Antikörperbildung gegen die ERT zu finden, müssen in einem größeren Patientenkollektiv mehr Patienten mit persistierenden neutralisierenden Antikörpern identifiziert werden und der Einfluss der Antikörper untersucht werden. In diesem Zusammenhang darf jedoch die neuropathische Beteiligung kein Ausschlusskriterium zur Teilnahme an der Studie sein.

Die Untersuchung der NSE und S-100 bei 29 Patienten ergab, dass weder die Konzentration der NSE noch der S-100 Rückschlüsse auf die neuropathische Beteiligung des Patienten zulässt. Sinnvoll wäre eine weitere Untersuchung mit Korrelation der Ergebnisse von S-100 und den Ergebnissen des MRT des Gehirns der Patienten, da diese beiden Untersuchungen die größten Potentiale zur Vorhersage der neuropathischen Beteiligung aufwiesen.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed. McGraw-Hill; 2001. p. 3421-52.
- (2) Martin R, Beck M, Eng C, Giugliani R, Harmatz P, Munoz V, et al. Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Pediatrics* 2008 Feb;121(2):e377-e386.
- (3) Scarpa M. Mucopolysaccharidosis Type II. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong C, Smith RJH, et al., editors. *GeneReviews*. Seattle: University of Washington, Seattle; 1993-2014; 2011.
- (4) Young ID, Harper PS, Newcombe RG, Archer IM. A clinical and genetic study of Hunter's syndrome. 2. Differences between the mild and severe forms. *J Med Genet* 1982 Dec;19(6):408-11.
- (5) Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De ML, Guffon N, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr* 2008 Mar;167(3):267-77.
- (6) Kircher SG, Bajbouj M, Eich E, Beck M. Mukopolysaccharidosen - Ein Leitfaden für Ärzte und Eltern. 3 ed. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2012.
- (7) Beebe R, Formel P. Gargoylism: sex-linked transmission in nine males. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1954;66:199-207.
- (8) Hunter C. A Rare Disease in Two Brothers. *Proc R Soc Med* 1917;10(Sect Study Dis Child):104-16.
- (9) Hurler G. Über einen Typ multipler Abartungen, vorwiegend am Skelettsystem. *Zeitschrift für Kinderheilkunde* 1920;24(5-6):220-34.
- (10) Lorincz AE. The mucopolysaccharidoses: advances in understanding and treatment. *Pediatr Ann* 1978 Feb;7(2):104-22.
- (11) Brante G. Gargoylism; a mucopolysaccharidosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1952;4(1):43-6.
- (12) Dorfman A, Lorincz AE. Occurrence of urinary acid mucopolysaccharides in the Hurler Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1957 Jun 15;43(6):443-6.

- (13) Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF. The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: faulty degradation of mucopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A 1968 Jun;60(2):699-706.
- (14) Bach G, Eisenberg F, Jr., Cantz M, Neufeld EF. The defect in the Hunter syndrome: deficiency of sulfiduronate sulfatase. Proc Natl Acad Sci U S A 1973 Jul;70(7):2134-8.
- (15) Cantz M, Chrambach A, Bach G, Neufeld EF. The Hunter corrective factor. Purification and preliminary characterization. J Biol Chem 1972 Sep 10;247(17):5456-62.
- (16) Wilson PJ, Morris CP, Anson DS, Occhiodoro T, Bielicki J, Clements PR, et al. Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Nov;87(21):8531-5.
- (17) Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP. Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene. Genomics 1993 Sep;17(3):773-5.
- (18) Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Clarke J, Martin R, Muenzer J. Initial report from the Hunter Outcome Survey. Genet Med 2008 Jul;10(7):508-16.
- (19) Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. J Inherit Metab Dis 2005;28(6):1011-7.
- (20) Schaap T, Bach G. Incidence of mucopolysaccharidoses in Israel: is Hunter disease a "Jewish disease"? Hum Genet 1980;56(2):221-3.
- (21) Young ID, Harper PS. Incidence of Hunter's syndrome. Hum Genet 1982;60(4):391-2.
- (22) Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. Hum Genet 1997 Dec;101(3):355-8.
- (23) Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA 1999 Jan;20;281(3):249-54.
- (24) Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van WS, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. Hum Genet 1999 Jul;105(1-2):151-6.
- (25) Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. Am J Med Genet A 2003 Dec 15;123A(3):310-3.



- (26) Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* 2000 Jan;105(1):e10.
- (27) Lin HY, Lin SP, Chuang CK, Niu DM, Chen MR, Tsai FJ, et al. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. *Am J Med Genet A* 2009 May;149A(5):960-4.
- (28) Malm G, Lund AM, Mansson JE, Heiberg A. Mucopolysaccharidoses in the Scandinavian countries: incidence and prevalence. *Acta Paediatr* 2008 Nov;97(11):1577-81.
- (29) Ben-Simon-Schiff E, Zlotogora J, Abeliovich D, Zeigler M, Bach G. Hunter syndrome among Jews in Israel. *Biomed Pharmacother* 1994;48(8-9):381-4.
- (30) Zlotogora J, Schaap T, Zeigler M, Bach G. Hunter syndrome among Ashkenazi Jews in Israel; evidence for prenatal selection favoring the Hunter allele. *Hum Genet* 1985;71(4):329-32.
- (31) Zlotogora J, Schaap T, Zeigler M, Bach G. Hunter syndrome in Jews in Israel: further evidence for prenatal selection favoring the Hunter allele. *Hum Genet* 1991 Mar;86(5):531-3.
- (32) Diamond JM. Human genetics. Jewish lysosomes. *Nature* 1994 Mar 24;368(6469):291-2.
- (33) Flomen RH, Green EP, Green PM, Bentley DR, Giannelli F. Determination of the organisation of coding sequences within the iduronate sulphate sulphatase (IDS) gene. *Hum Mol Genet* 1993 Jan;2(1):5-10.
- (34) Froissart R, Da S, I, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. *Acta Paediatr Suppl* 2007 Apr;96(455):71-7.
- (35) Bondeson ML, Malmgren H, Dahl N, Carlberg BM, Pettersson U. Presence of an IDS-related locus (IDS2) in Xq28 complicates the mutational analysis of Hunter syndrome. *Eur J Hum Genet* 1995;3(4):219-27.
- (36) Timms KM, Lu F, Shen Y, Pierson CA, Muzny DM, Gu Y, et al. 130 kb of DNA sequence reveals two new genes and a regional duplication distal to the human iduronate-2-sulfate sulfatase locus. *Genome Res* 1995 Aug;5(1):71-8.
- (37) Timms KM, Bondeson ML, nsari-Lari MA, Lagerstedt K, Muzny DM, Dugan-Rocha SP, et al. Molecular and phenotypic variation in patients with severe Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1997 Mar;6(3):479-86.

- (38) Brusius-Facchin AC, Schwartz IV, Zimmer C, Ribeiro MG, Acosta AX, Horovitz D, et al. Mucopolysaccharidosis type II: Identification of 30 novel mutations among Latin American patients. *Mol Genet Metab* 2014 Feb;111(2):133-8.
- (39) Li P, Bellows AB, Thompson JN. Molecular basis of iduronate-2-sulphatase gene mutations in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *J Med Genet* 1999 Jan;36(1):21-7.
- (40) Lissens W, Seneca S, Liebaers I. Molecular analysis in 23 Hunter disease families. *J Inher Metab Dis* 1997 Jul;20(3):453-6.
- (41) Kim CH, Hwang HZ, Song SM, Paik KH, Kwon EK, Moon KB, et al. Mutational spectrum of the iduronate 2 sulfatase gene in 25 unrelated Korean Hunter syndrome patients: identification of 13 novel mutations. *Hum Mutat* 2003 Apr;21(4):449-50.
- (42) Vafiadaki E, Cooper A, Heptinstall LE, Hatton CE, Thornley M, Wraith JE. Mutation analysis in 57 unrelated patients with MPS II (Hunter's disease). *Arch Dis Child* 1998 Sep;79(3):237-41.
- (43) Wilson PJ, Suthers GK, Callen DF, Baker E, Nelson PV, Cooper A, et al. Frequent deletions at Xq28 indicate genetic heterogeneity in Hunter syndrome. *Hum Genet* 1991 Mar;86(5):505-8.
- (44) Froissart R, Blond JL, Maire I, Guibaud P, Hopwood JJ, Mathieu M, et al. Hunter syndrome: gene deletions and rearrangements. *Hum Mutat* 1993;2(2):138-40.
- (45) Froissart R, Maire I, Millat G, Cudry S, Birot AM, Bonnet V, et al. Identification of iduronate sulfatase gene alterations in 70 unrelated Hunter patients. *Clin Genet* 1998 May;53(5):362-8.
- (46) Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, Wilson PJ, Steglich C, Beck M, et al. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum Mutat* 1993;2(6):435-42.
- (47) Pollard LM, Jones JR, Wood TC. Molecular characterization of 355 mucopolysaccharidosis patients reveals 104 novel mutations. *J Inher Metab Dis* 2013 Mar;36(2):179-87.
- (48) Sohn YB, Ki CS, Kim CH, Ko AR, Yook YJ, Lee SJ, et al. Identification of 11 novel mutations in 49 Korean patients with mucopolysaccharidosis type II. *Clin Genet* 2012 Feb;81(2):185-90.

- (49) Lin SP, Chang JH, Lee-Chen GJ, Lin DS, Lin HY, Chuang CK. Detection of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) in Taiwanese: biochemical and linkage studies of the iduronate-2-sulfatase gene defects in MPS II patients and carriers. *Clin Chim Acta* 2006 Jul 15;369(1):29-34.
- (50) Rathmann M, Bunge S, Beck M, Kresse H, Tylki-Szymanska A, Gal A. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): mutation "hot spots" in the iduronate-2-sulfatase gene. *Am J Hum Genet* 1996 Dec;59(6):1202-9.
- (51) Bondeson ML, Dahl N, Malmgren H, Kleijer WJ, Tonnesen T, Carlberg BM, et al. Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1995 Apr;4(4):615-21.
- (52) Lagerstedt K, Karsten SL, Carlberg BM, Kleijer WJ, Tonnesen T, Pettersson U, et al. Double-strand breaks may initiate the inversion mutation causing the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1997 Apr;6(4):627-33.
- (53) Froissart R, Moreira dS, I, Guffon N, Bozon D, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II--genotype/phenotype aspects. *Acta Paediatr Suppl* 2002;91(439):82-7.
- (54) Muenzer J, Beck M, Eng CM, Escolar ML, Giugliani R, Guffon NH, et al. Multidisciplinary management of Hunter syndrome. *Pediatrics* 2009 Dec;124(6):e1228-e1239.
- (55) Gort L, Chabas A, Coll MJ. Hunter disease in the Spanish population: molecular analysis in 31 families. *J Inher Metab Dis* 1998 Aug;21(6):655-61.
- (56) Brusius-Facchin AC, De Souza CF, Schwartz IV, Riegel M, Melaragno MI, Correia P, et al. Severe phenotype in MPS II patients associated with a large deletion including contiguous genes. *Am J Med Genet A* 2012 May;158A(5):1055-9.
- (57) Lee OJ, Kim SJ, Sohn YB, Park HD, Lee SY, Kim CH, et al. A study of the relationship between clinical phenotypes and plasma iduronate-2-sulfatase enzyme activities in Hunter syndrome patients. *Korean J Pediatr* 2012 Mar;55(3):88-92.
- (58) Moreira dS, I, Froissart R, Marques dos SH, Caseiro C, Maire I, Bozon D. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II in Portugal: identification of four novel mutations. *Clin Genet* 2001 Oct;60(4):316-8.
- (59) Birot AM, Delobel B, Gronnier P, Bonnet V, Maire I, Bozon D. A 5-megabase familial deletion removes the IDS and FMR-1 genes in a male Hunter patient. *Hum Mutat* 1996;7(3):266-8.

- (60) de Camargo Pinto LL, Maluf SW, Leistner-Segal S, Zimmer da SC, Brusius-Facchin A, Burin MG, et al. Are MPS II heterozygotes actually asymptomatic? A study based on clinical and biochemical data, X-inactivation analysis and imaging evaluations. *Am J Med Genet A* 2011 Jan;155A(1):50-7.
- (61) Schwartz IV, Pinto LL, Breda G, Lima L, Ribeiro MG, Mota JG, et al. Clinical and biochemical studies in mucopolysaccharidosis type II carriers. *J Inher Metab Dis* 2009 Dec;32(6):732-8.
- (62) Mossman J, Blunt S, Stephens R, Jones EE, Pembrey M. Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene. *Arch Dis Child* 1983 Nov;58(11):911-5.
- (63) Winchester B, Young E, Geddes S, Genet S, Hurst J, Middleton-Price H, et al. Female twin with Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning. *Am J Med Genet* 1992 Dec 1;44(6):834-8.
- (64) Sukegawa K, Matsuzaki T, Fukuda S, Masuno M, Fukao T, Kokuryu M, et al. Brother/sister siblings affected with Hunter disease: evidence for skewed X chromosome inactivation. *Clin Genet* 1998 Feb;53(2):96-101.
- (65) Cudry S, Tigaud I, Froissart R, Bonnet V, Maire I, Bozon D. MPS II in females: molecular basis of two different cases. *J Med Genet* 2000 Oct;37(10):E29.
- (66) Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S, Bodamer OA. Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatr Neurol* 2005 Apr;32(4):270-2.
- (67) Sohn YB, Kim SJ, Park SW, Park HD, Ki CS, Kim CH, et al. A mother and daughter with the p.R443X mutation of mucopolysaccharidosis type II: Genotype and phenotype analysis. *Am J Med Genet A* 2010 Dec;152A(12):3129-32.
- (68) Kloska A, Jakobkiewicz-Banecka J, Tyłki-Szymanska A, Czartoryska B, Wegrzyn G. Female Hunter syndrome caused by a single mutation and familial XCI skewing: implications for other X-linked disorders. *Clin Genet* 2011 Nov;80(5):459-65.
- (69) Pina-Aguilar RE, Zaragoza-Arevalo GR, Rau I, Gal A, cantara-Ortigoza MA, Lopez-Martinez MS, et al. Mucopolysaccharidosis type II in a female carrying a heterozygous stop mutation of the iduronate-2-sulfatase gene and showing a skewed X chromosome inactivation. *Eur J Med Genet* 2013 Mar;56(3):159-62.

- (70) Jurecka A, Krumina Z, Zuber Z, Rozdzyńska-Swiatkowska A, Kloska A, Czartoryska B, et al. Mucopolysaccharidosis type II in females and response to enzyme replacement therapy. *Am J Med Genet A* 2012 Feb;158A(2):450-4.
- (71) Schwartz IV, Ribeiro MG, Mota JG, Toralles MB, Correia P, Horovitz D, et al. A clinical study of 77 patients with mucopolysaccharidosis type II. *Acta Paediatr Suppl* 2007 Apr;96(455):63-70.
- (72) Mendelsohn NJ, Harmatz P, Bodamer O, Burton BK, Giugliani R, Jones SA, et al. Importance of surgical history in diagnosing mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): data from the Hunter Outcome Survey. *Genet Med* 2010 Dec;12(12):816-22.
- (73) Cho YS, Kim JH, Kim TW, Chung SC, Chang SA, Jin DK. Otologic manifestations of Hunter syndrome and their relationship with speech development. *Audiol Neurootol* 2008;13(3):206-12.
- (74) Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr* 2004 May;144(5 Suppl):S27-S34.
- (75) Berry HK, Spinanger J. A paper spot test useful in study of Hurler's syndrome. *J Lab Clin Med* 1960 Jan;55:136-8.:136-8.
- (76) Labor & Diagnostik der Villa Metabolica. 2006 ;URL: <http://www.villa-metabolica.de/html/de/labordiagnostik.php> [cited 2014 Aug 11]
- (77) de Jong JG, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis BJ. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem* 1989 Jul;35(7):1472-7.
- (78) Jaffé M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt, und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* 1886;10:391-400.
- (79) Voznyi YV, Keulemans JL, van Diggelen OP. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease). *J Inher Metab Dis* 2001 Nov;24(6):675-80.
- (80) Scarpa M, Almassy Z, Beck M, Bodamer O, Bruce IA, De ML, et al. Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease. *Orphanet J Rare Dis* 2011 Nov 7;6:72. doi: 10.1186/1750-1172-6-72.:72-6.

- (81) Jones SA, Almassy Z, Beck M, Burt K, Clarke JT, Giugliani R, et al. Mortality and cause of death in mucopolysaccharidosis type II-a historical review based on data from the Hunter Outcome Survey (HOS). *J Inherit Metab Dis* 2009 Aug;32(4):534-43.
- (82) Beck M. Mucopolysaccharidosis Type II (Hunter Syndrome): clinical picture and treatment. *Curr Pharm Biotechnol* 2011 Jun;12(6):861-6.
- (83) Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 2009 Apr;1793(4):684-96.
- (84) Constantopoulos G, Dekaban AS. Neurochemistry of the mucopolysaccharidoses: brain lipids and lysosomal enzymes in patients with four types of mucopolysaccharidosis and in normal controls. *J Neurochem* 1978 May;30(5):965-73.
- (85) Young ID, Harper PS. Mild form of Hunter's syndrome: clinical delineation based on 31 cases. *Arch Dis Child* 1982 Nov;57(11):828-36.
- (86) Young ID, Harper PS. The natural history of the severe form of Hunter's syndrome: a study based on 52 cases. *Dev Med Child Neurol* 1983 Aug;25(4):481-9.
- (87) Keilmann A, Bendel F, Läßig AK, Nospes S. Quantifizierungen der Veränderungen des Larynx und des Hypopharynx bei Patienten mit Mukopolysaccharidosen. 30. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Phoniatrie und Pädaudiologie e. V. 20.-22.09.2013.Bochum. 2013 September 5 ;URL: <http://www.egms.de/static/en/meetings/dgpp2013/13dgpp73.shtml#ref1> [cited 2014 Mar 17]
- (88) Rozdzynska A, Tyłki-Szymanska A, Jurecka A, Cieslik J. Growth pattern and growth prediction of body height in children with mucopolysaccharidosis type II. *Acta Paediatr* 2011 Mar;100(3):456-60.
- (89) Link B, de Camargo Pinto LL, Giugliani R, Wraith JE, Guffon N, Eich E, et al. Orthopedic manifestations in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) enrolled in the Hunter Outcome Survey. *Orthop Rev (Pavia)* 2010 Sep 23;2(2):e16.
- (90) Miner ME, Schimke RN. Carpal tunnel syndrome in pediatric mucopolysaccharidoses. Report of four cases. *J Neurosurg* 1975 Jul;43(1):102-3.
- (91) Wraith JE, Alani SM. Carpal tunnel syndrome in the mucopolysaccharidoses and related disorders. *Arch Dis Child* 1990 Sep;65(9):962-3.

- (92) Haddad FS, Jones DH, Vellodi A, Kane N, Pitt MC. Carpal tunnel syndrome in the mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *J Bone Joint Surg Br* 1997 Jul;79(4):576-82.
- (93) Morini SR, Steiner CE, Gerson LB. Mucopolysaccharidosis type II: skeletal-muscle system involvement. *J Pediatr Orthop B* 2010 Jul;19(4):313-7.
- (94) Ferrari S, Ponzin D, Ashworth JL, Fahnehjelm KT, Summers CG, Harmatz PR, et al. Diagnosis and management of ophthalmological features in patients with mucopolysaccharidosis. *Br J Ophthalmol* 2011 May;95(5):613-9.
- (95) Ashworth JL, Biswas S, Wraith E, Lloyd IC. Mucopolysaccharidoses and the eye. *Surv Ophthalmol* 2006 Jan;51(1):1-17.
- (96) Ganesh A, Bruwer Z, Al-Thihli K. An update on ocular involvement in mucopolysaccharidoses. *Curr Opin Ophthalmol* 2013 Sep;24(5):379-88.
- (97) Schöpfer K, Miebach E, Beck M, Pitz S. [Lysosomal storage diseases - update and new therapeutic options]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2011 Feb;228(2):144-60.
- (98) Collins ML, Traboulsi EI, Maumenee IH. Optic nerve head swelling and optic atrophy in the systemic mucopolysaccharidoses. *Ophthalmology* 1990 Nov;97(11):1445-9.
- (99) Simmons MA, Bruce IA, Penney S, Wraith E, Rothera MP. Otorhinolaryngological manifestations of the mucopolysaccharidoses. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005 May;69(5):589-95.
- (100) Keilmann A, Nakarat T, Bruce IA, Molter D, Malm G. Hearing loss in patients with mucopolysaccharidosis II: data from HOS - the Hunter Outcome Survey. *J Inherit Metab Dis* 2012 Mar;35(2):343-53.
- (101) Peck JE. Hearing loss in Hunter's syndrome--mucopolysaccharidosis II. *Ear Hear* 1984 Jul;5(4):243-6.
- (102) Downs AT, Crisp T, Ferretti G. Hunter's syndrome and oral manifestations: a review. *Pediatr Dent* 1995 Mar;17(2):98-100.
- (103) Muenzer J, Beck M, Eng CM, Giugliani R, Harmatz P, Martin R, et al. Long-term, open-labeled extension study of idursulfase in the treatment of Hunter syndrome. *Genet Med* 2011 Feb;13(2):95-101.
- (104) Kamin W. Diagnosis and management of respiratory involvement in Hunter syndrome. *Acta Paediatr Suppl* 2008 Apr;97(457):57-60.

- (105) Shih SL, Lee YJ, Lin SP, Sheu CY, Blickman JG. Airway changes in children with mucopolysaccharidoses. *Acta Radiol* 2002 Jan;43(1):40-3.
- (106) Muhlebach MS, Wooten W, Muenzer J. Respiratory manifestations in mucopolysaccharidoses. *Paediatr Respir Rev* 2011 Jun;12(2):133-8.
- (107) Berger KI, Fagondes SC, Giugliani R, Hardy KA, Lee KS, McArdle C, et al. Respiratory and sleep disorders in mucopolysaccharidosis. *J Inherit Metab Dis* 2013 Mar;36(2):201-10.
- (108) Wooten WI, III, Muenzer J, Vaughn BV, Muhlebach MS. Relationship of sleep to pulmonary function in mucopolysaccharidosis II. *J Pediatr* 2013 Jun;162(6):1210-5.
- (109) Morehead JM, Parsons DS. Tracheobronchomalacia in Hunter's syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1993 Apr;26(3):255-61.
- (110) Thappa DM, Singh A, Jaisankar TJ, Rao R, Ratnakar C. Pebbling of the skin: a marker of Hunter's syndrome. *Pediatr Dermatol* 1998 Sep;15(5):370-3.
- (111) Demitsu T, Kakurai M, Okubo Y, Shibayama C, Kikuchi Y, Mori Y, et al. Skin eruption as the presenting sign of Hunter syndrome IIB. *Clin Exp Dermatol* 1999 May;24(3):179-82.
- (112) Lonergan CL, Payne AR, Wilson WG, Patterson JW, English JC, III. What syndrome is this? Hunter Syndrome. *Pediatr Dermatol* 2004 Nov;21(6):679-81.
- (113) Al Sawaf S, Mayatepek E, Hoffmann B. Neurological findings in Hunter disease: pathology and possible therapeutic effects reviewed. *J Inherit Metab Dis* 2008 Aug;31(4):473-80.
- (114) Rigante D, Ferrara P, Ricci R, Antuzzi D, Segni G. Bladder obstruction in Hunter's syndrome. *Scand J Urol Nephrol* 1999 Jun;33(3):200-1.
- (115) Koyama K, Moda Y, Sone A, Tanaka H, Hino Y. Neurogenic bladder in Hunter's syndrome. *J Med Genet* 1994 Mar;31(3):257-8.
- (116) Kampmann C, Beck M, Morin I, Loehr JP. Prevalence and characterization of cardiac involvement in Hunter syndrome. *J Pediatr* 2011 Aug;159(2):327-31.
- (117) Braunlin EA, Harmatz PR, Scarpa M, Furlanetto B, Kampmann C, Loehr JP, et al. Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis* 2011 Dec;34(6):1183-97.



- (118) Hishitani T, Wakita S, Isoda T, Katori T, Ishizawa A, Okada R. Sudden death in Hunter syndrome caused by complete atrioventricular block. *J Pediatr* 2000 Feb;136(2):268-9.
- (119) Dean MF, Stevens RL, Muir H, Benson PF, Button LR, Anderson RL, et al. Enzyme replacement therapy by fibroblast transplantation: long-term biochemical study in three cases of Hunter's syndrome. *J Clin Invest* 1979 Jan;63(1):138-46.
- (120) Knudson AG, Jr., Di FN, Curtis JE. Effect of leukocyte transfusion in a child with type II mucopolysaccharidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971 Aug;68(8):1738-41.
- (121) Yatziv S, Statter M, Abeliuk P, Meshulam M, Russel A. A therapeutic trial of fresh plasma infusions over a period of 22 months in two siblings with Hunter's syndrome. *Isr J Med Sci* 1975 Aug;11(8):802-8.
- (122) Cardone M, Polito VA, Pepe S, Mann L, D'Azzo A, Auricchio A, et al. Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery. *Hum Mol Genet* 2006 Apr 1;15(7):1225-36.
- (123) Friso A, Tomanin R, Zanetti A, Mennuni C, Calvaruso F, La MN, et al. Gene therapy of Hunter syndrome: evaluation of the efficiency of muscle electro gene transfer for the production and release of recombinant iduronate-2-sulfatase (IDS). *Biochim Biophys Acta* 2008 Oct;1782(10):574-80.
- (124) Stroncek DF, Hubel A, Shankar RA, Burger SR, Pan D, McCullough J, et al. Retroviral transduction and expansion of peripheral blood lymphocytes for the treatment of mucopolysaccharidosis type II, Hunter's syndrome. *Transfusion* 1999 Apr;39(4):343-50.
- (125) Guffon N, Bertrand Y, Forest I, Fouilhoux A, Froissart R. Bone marrow transplantation in children with Hunter syndrome: outcome after 7 to 17 years. *J Pediatr* 2009 May;154(5):733-7.
- (126) Mullen CA, Thompson JN, Richard LA, Chan KW. Unrelated umbilical cord blood transplantation in infancy for mucopolysaccharidosis type IIB (Hunter syndrome) complicated by autoimmune hemolytic anemia. *Bone Marrow Transplant* 2000 May;25(10):1093-7.
- (127) Peters C, Krivit W. Hematopoietic cell transplantation for mucopolysaccharidosis IIB (Hunter syndrome). *Bone Marrow Transplant* 2000 May;25(10):1097-9.
- (128) Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *J Inher Metab Dis* 1999 Jun;22(5):638-48.

- (129) McKinnis EJ, Sulzbacher S, Rutledge JC, Sanders J, Scott CR. Bone marrow transplantation in Hunter syndrome. *J Pediatr* 1996 Jul;129(1):145-8.
- (130) Prasad VK, Kurtzberg J. Transplant outcomes in mucopolysaccharidoses. *Semin Hematol* 2010 Jan;47(1):59-69.
- (131) de Ru MH, Boelens JJ, Das AM, Jones SA, van der Lee JH, Mahlaoui N, et al. Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. *Orphanet J Rare Dis* 2011 Aug 10;6:55. doi: 10.1186/1750-1172-6-55.:55-6.
- (132) Wynn RF, Wraith JE, Mercer J, O'Meara A, Tylee K, Thornley M, et al. Improved metabolic correction in patients with lysosomal storage disease treated with hematopoietic stem cell transplant compared with enzyme replacement therapy. *J Pediatr* 2009 Apr;154(4):609-11.
- (133) Kuratsubo I, Suzuki Y, Orii KO, Kato T, Orii T, Kondo N. Psychological status of patients with mucopolysaccharidosis type II and their parents. *Pediatr Int* 2009 Feb;51(1):41-7.
- (134) Bhattacharya K, Gibson SC, Pathi VL. Mitral valve replacement for mitral stenosis secondary to Hunter's syndrome. *Ann Thorac Surg* 2005 Nov;80(5):1911-2.
- (135) Antoniou T, Kirvassilis G, Tsourelis L, Ieromonachos C, Zarkalis D, Alivizatos P. Mitral valve replacement and Hunter syndrome: case report. *Heart Surg Forum* 2009 Jan;12(1):E54-E56.
- (136) Joly H, Dauphin C, Motreff P, De RC, Lusson JR. [Double aortic and mitral valve replacement in an 18 year old patient with Hunter's disease]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004 May;97(5):561-3.
- (137) Orliaguet O, Pepin JL, Veale D, Kelkel E, Pinel N, Levy P. Hunter's syndrome and associated sleep apnoea cured by CPAP and surgery. *Eur Respir J* 1999 May;13(5):1195-7.
- (138) Davitt SM, Hatrick A, Sabharwal T, Pearce A, Gleeson M, Adam A. Tracheobronchial stent insertions in the management of major airway obstruction in a patient with Hunter syndrome (type-II mucopolysaccharidosis). *Eur Radiol* 2002 Feb;12(2):458-62.
- (139) Fachinformation Elaprase. 2013 September ;URL: <http://www.fachinfo.de> [cited 2014 Feb 24]

- (140) Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, et al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med* 2006 Aug;8(8):465-73.
- (141) Giugliani R, Hwu WL, Tytki-Szymanska A, Whiteman DA, Pano A. A multicenter, open-label study evaluating safety and clinical outcomes in children (1.4-7.5 years) with Hunter syndrome receiving idursulfase enzyme replacement therapy. *Genet Med* 2013 Nov 7;10.
- (142) Schulze-Frenking G, Jones SA, Roberts J, Beck M, Wraith JE. Effects of enzyme replacement therapy on growth in patients with mucopolysaccharidosis type II. *J Inher Metab Dis* 2011 Feb;34(1):203-8.
- (143) Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, et al. Japan Elaprase Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab* 2010 Jan;99(1):18-25.
- (144) Jurecka A, Zuberuber Z, Opoka-Winiarska V, Wegrzyn G, Tytki-Szymanska A. Effect of rapid cessation of enzyme replacement therapy: a report of 5 cases and a review of the literature. *Mol Genet Metab* 2012 Nov;107(3):508-12.
- (145) Jurecka A, Malinova V, Tytki-Szymanska A. Effect of rapid cessation of enzyme replacement therapy: a report of 5 more cases. *Mol Genet Metab* 2014 Feb;111(2):212-3.
- (146) Muenzer J, Bodamer O, Burton B, Clarke L, Frenking GS, Giugliani R, et al. The role of enzyme replacement therapy in severe Hunter syndrome- an expert panel consensus. *Eur J Pediatr* 2012 Jan;171(1):181-8.
- (147) Muenzer J, Gucevas-Calikoglu M, McCandless SE, Schuetz TJ, Kimura A. A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Mol Genet Metab* 2007 Mar;90(3):329-37.
- (148) Barbier AJ, Bielefeld B, Whiteman DA, Natarajan M, Pano A, Amato DA. The relationship between anti-idursulfase antibody status and safety and efficacy outcomes in attenuated mucopolysaccharidosis II patients aged 5 years and older treated with intravenous idursulfase. *Mol Genet Metab* 2013 Nov;110(3):303-10.
- (149) Sellos-Moura M, Barzegar S, Pan L, Shi P, Oommen S, Durant J, et al. Development of a panel of highly sensitive, equivalent assays for detection of antibody responses to velaglucerase alfa or imiglucerase enzyme replacement therapy in patients with Gaucher disease. *J Immunol Methods* 2011 Oct 28;373(1-2):45-53.

- (150) Gupta S, Indelicato SR, Jethwa V, Kawabata T, Kelley M, Mire-Sluis AR, et al. Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. *J Immunol Methods* 2007 Apr 10;321(1-2):1-18.
- (151) Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A--replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 2001 Jul 5;345(1):9-16.
- (152) Harmatz P, Ketteridge D, Giugliani R, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, et al. Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Pediatrics* 2005 Jun;115(6):e681-e689.
- (153) Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. *J Pediatr* 2006 Apr;148(4):533-9.
- (154) Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, et al. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* 2001 Jan 18;344(3):182-8.
- (155) Schiffmann R, Ries M, Timmons M, Flaherty JT, Brady RO. Long-term therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. *Nephrol Dial Transplant* 2006 Feb;21(2):345-54.
- (156) Rosenberg M, Kingma W, Fitzpatrick MA, Richards SM. Immunosurveillance of alglucerase enzyme therapy for Gaucher patients: induction of humoral tolerance in seroconverted patients after repeat administration. *Blood* 1999 Mar 15;93(6):2081-8.
- (157) Wilcox WR, Banikazemi M, Guffon N, Waldek S, Lee P, Linthorst GE, et al. Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Am J Hum Genet* 2004 Jul;75(1):65-74.
- (158) Wraith JE, Clarke LA, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *J Pediatr* 2004 May;144(5):581-8.

- (159) Ponce E, Moskovitz J, Grabowski G. Enzyme therapy in Gaucher disease type 1: effect of neutralizing antibodies to acid beta-glucosidase. *Blood* 1997 Jul 1;90(1):43-8.
- (160) Vedder AC, Linthorst GE, Houge G, Groener JE, Ormel EE, Bouma BJ, et al. Treatment of Fabry disease: outcome of a comparative trial with agalsidase alfa or beta at a dose of 0.2 mg/kg. *PLoS One* 2007 Jul 11;2(7):e598.
- (161) Vedder AC, Breunig F, Donker-Koopman WE, Mills K, Young E, Winchester B, et al. Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: effects on antibody formation and GL-3. *Mol Genet Metab* 2008 Jul;94(3):319-25.
- (162) Benichou B, Goyal S, Sung C, Norfleet AM, O'Brien F. A retrospective analysis of the potential impact of IgG antibodies to agalsidase beta on efficacy during enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Mol Genet Metab* 2009 Jan;96(1):4-12.
- (163) Linthorst GE, Hollak CE, Donker-Koopman WE, Strijland A, Aerts JM. Enzyme therapy for Fabry disease: neutralizing antibodies toward agalsidase alpha and beta. *Kidney Int* 2004 Oct;66(4):1589-95.
- (164) Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, Majure JM, Case LE, Veerling DL, et al. Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial. *Genet Med* 2001 Mar;3(2):132-8.
- (165) Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, et al. Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology* 2007 Jan 9;68(2):99-109.
- (166) Hunley TE, Corzo D, Dudek M, Kishnani P, Amalfitano A, Chen YT, et al. Nephrotic syndrome complicating alpha-glucosidase replacement therapy for Pompe disease. *Pediatrics* 2004 Oct;114(4):e532-e535.
- (167) Wang J, Lozier J, Johnson G, Kirshner S, Verthelyi D, Pariser A, et al. Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment. *Nat Biotechnol* 2008 Aug;26(8):901-8.
- (168) Goodeve A. The incidence of inhibitor development according to specific mutations--and treatment? *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003 Jun;14 Suppl 1:S17-21.:S17-S21.
- (169) Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006 Dec;12 Suppl 6:15-22.:15-22.

- (170) de Vries JM, van der Beek NA, Kroos MA, Ozkan L, van Doorn PA, Richards SM, et al. High antibody titer in an adult with Pompe disease affects treatment with alglucosidase alfa. *Mol Genet Metab* 2010 Dec;101(4):338-45.
- (171) Schaarschmidt H, Prange HW, Reiber H. Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. *Stroke* 1994 Mar;25(3):558-65.
- (172) Romner B, Ingebrigtsen T, Kongstad P, Borgesen SE. Traumatic brain damage: serum S-100 protein measurements related to neuroradiological findings. *J Neurotrauma* 2000 Aug;17(8):641-7.
- (173) Meister JP. Enzymanalytische Erfassung der Überträgerinnen des Morbus Hunter Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2010.
- (174) Parkinson-Lawrence E, Turner C, Hopwood J, Brooks D. Analysis of normal and mutant iduronate-2-sulphatase conformation. *Biochem J* 2005 Mar 1;386(Pt 2):395-400.
- (175) Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989 Sep;2(5):358-67.
- (176) Devereux RB. Detection of left ventricular hypertrophy by M-mode echocardiography. Anatomic validation, standardization, and comparison to other methods. *Hypertension* 1987 Feb;9(2 Pt 2):II19-II26.
- (177) de Simone G. Left ventricular geometry and hypotension in end-stage renal disease: a mechanical perspective. *J Am Soc Nephrol* 2003 Oct;14(10):2421-7.
- (178) Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de SG, Pickering TG, Saba PS, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1992 Jun;19(7):1550-8.
- (179) Kampmann C. Kardiale Manifestation des Morbus Anderson-Fabry bei hemi- und heterozygoten Patienten und Einfluss der Enzyersatzbehandlung auf die assoziierte Kardiomyopathie Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2001.

- (180) Zoghbi WA, Enriquez-Sarano M, Foster E, Grayburn PA, Kraft CD, Levine RA, et al. Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2003 Jul;16(7):777-802.
- (181) Kampmann C, Lampe C, Whybra-Trumpler C, Wiethoff CM, Mengel E, Arash L, et al. Mucopolysaccharidosis VI: cardiac involvement and the impact of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis* 2013 Sep 24.
- (182) Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de LA, Jr., Faxon DP, Freed MD, et al. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing Committee to Revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease) developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2006 Aug 1;48(3):e1-148.
- (183) Zapletal A, Samanek M, Paul T. Lung Function in Children and Adolescents: Methods, Reference Values. Basel: S Karger Pub; 1987.
- (184) Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993 Mar;16:5-40.
- (185) Norkin CC, White D.J. Measurement of Joint Motion: A Guide to Goniometry. 3rd ed. Philadelphia, PA: F.A. Davis Co.; 2003.
- (186) ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Jul 1;166(1):111-7.
- (187) Puhan MA, Mador MJ, Held U, Goldstein R, Guyatt GH, Schunemann HJ. Interpretation of treatment changes in 6-minute walk distance in patients with COPD. *Eur Respir J* 2008 Sep;32(3):637-43.
- (188) Wiklund I, Raluy-Callado M, Stull DE, Jangelind Y, Whiteman DA, Chen WH. The Hunter syndrome-functional outcomes for clinical understanding scale (HS-FOCUS) questionnaire: evaluation of measurement properties. *Qual Life Res* 2013 May;22(4):875-84.
- (189) Raluy-Callado M, Chen WH, Whiteman DA, Fang J, Wiklund I. The impact of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) on health-related quality of life. *Orphanet J Rare Dis* 2013 Jul 10;8(1):101.

- (190) UpToDate, Inc. 2014 ;URL: [http://www.uptodate.com/contents/idursulfase-drug-information?source=search\\_result&search=idursulfase&selectedTitle=1%7E4#F3151939](http://www.uptodate.com/contents/idursulfase-drug-information?source=search_result&search=idursulfase&selectedTitle=1%7E4#F3151939) [cited 2014 Apr 9]
- (191) van Diggelen OP. Laboratory protocol enzyme analysis for Hunter disease (MPS II). 2011 Jul.
- (192) van Diggelen OP. Laboratory protocol enzyme analysis for Hunter disease (MPS II). 2002 Jan.
- (193) Herndon RM, Rudick RA, Munschauer FE, III, Mass MK, Salazar AM, Coats ME, et al. Eight-year immunogenicity and safety of interferon beta-1a-Avonex treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005 Aug;11(4):409-19.
- (194) Reipert BM, van Helden PM, Schwarz HP, Hausl C. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Br J Haematol* 2007 Jan;136(1):12-25.
- (195) Gawryl MS, Hoyer LW. Inactivation of factor VIII coagulant activity by two different types of human antibodies. *Blood* 1982 Nov;60(5):1103-9.
- (196) Biggs R, Austen DE, Denson KW, Borrett R, Rizza CR. The mode of action of antibodies which destroy factor VIII. II. Antibodies which give complex concentration graphs. *Br J Haematol* 1972 Aug;23(2):137-55.
- (197) Biggs R, Austen DE, Denson KW, Rizza CR, Borrett R. The mode of action of antibodies which destroy factor VIII. I. Antibodies which have second-order concentration graphs. *Br J Haematol* 1972 Aug;23(2):125-35.
- (198) Sigma-Aldrich Co. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline - Informationen von Sigma Aldrich. 2014 ;URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8537?lang=de&region=DE> [cited 2014 May 15]
- (199) Züchner T. Working with proteins: Protein stability and storage - a brief guide. 2014 ;URL: <http://www.uni-leipzig.de/uspdu/teach.htm> [cited 2014 May 22]
- (200) Sigma-Aldrich Co. Product Information - Albumin from bovine serum. 2014 ;URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2058?lang=de&region=DE> [cited 2014 May 22]



- (201) Bernhardt P. Elaprased specific activity assay. 13-7-2014.  
Ref Type: Personal Communication
- (202) Sulisty Winarto J. Die kardiale Beteiligung der Mukopolysaccharidose Typ II und Einfluss der Enzymersatztherapie Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2011.
- (203) Braunlin EA, Berry JM, Whitley CB. Cardiac findings after enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type I. *Am J Cardiol* 2006 Aug 1;98(3):416-8.
- (204) Wiklund I, Raluy-Callado M, Chen WH, Muenzer J, Fang J, Whiteman D. The Hunter Syndrome-Functional Outcomes for Clinical Understanding Scale (HS-FOCUS) Questionnaire: item reduction and further validation. *Qual Life Res* 2014 May 8.
- (205) Singh G, Athreya BH, Fries JF, Goldsmith DP. Measurement of health status in children with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994 Dec;37(12):1761-9.
- (206) Lamers KJ, Vos P, Verbeek MM, Rosmalen F, van Geel WJ, van Engelen BG. Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Res Bull* 2003 Aug 15;61(3):261-4.
- (207) DeGiorgio CM, Correale JD, Gott PS, Ginsburg DL, Bracht KA, Smith T, et al. Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology* 1995 Jun;45(6):1134-7.
- (208) Beems T, Simons KS, van Geel WJ, De Reus HP, Vos PE, Verbeek MM. Serum- and CSF-concentrations of brain specific proteins in hydrocephalus. *Acta Neurochir (Wien)* 2003 Jan;145(1):37-43.
- (209) Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Oct 1;322(4):1111-22.
- (210) Vedolin L, Schwartz IV, Komlos M, Schuch A, Puga AC, Pinto LL, et al. Correlation of MR imaging and MR spectroscopy findings with cognitive impairment in mucopolysaccharidosis II. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007 Jun;28(6):1029-33.
- (211) Munoz-Rojas MV, Vieira T, Costa R, Fagundes S, John A, Jardim LB, et al. Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression. *Am J Med Genet A* 2008 Oct 1;146A(19):2538-44.

- (212) Shi N, Pardridge WM. Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jun;97(13):7567-72.
- (213) Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Mar 23;47(1):65-81.
- (214) Urayama A, Grubb JH, Banks WA, Sly WS. Epinephrine enhances lysosomal enzyme delivery across the blood brain barrier by up-regulation of the mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Jul 31;104(31):12873-8.
- (215) Dean CJ, Bockmann MR, Hopwood JJ, Brooks DA, Meikle PJ. Detection of mucopolysaccharidosis type II by measurement of iduronate-2-sulfatase in dried blood spots and plasma samples. *Clin Chem* 2006 Apr;52(4):643-9.
- (216) Civallero G, Michelin K, de MJ, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* 2006 Oct;372(1-2):98-102.

## Anhang

Anhang 1 - HOS-Patienteninformation und Einwilligungserklärung _____	182
Anhang 2 - HOS-Einwilligungserklärung für Kinder _____	187
Anhang 3 - Patienteninformation / Einwilligungserklärung 6 – 12-Jährige ____	189
Anhang 4 - Patienteninformation 18-Jährige und Eltern _____	192
Anhang 5 - Einwilligungserklärung 18-Jährige und Eltern _____	193
Anhang 6 - Patienteninformation 13 – 17-Jährige _____	194
Anhang 7 - Einwilligungserklärung 13 – 17-Jährige _____	195
Anhang 8 - ERNDIM Zertifikat _____	196
Anhang 9 - HOS-Formblatt für die Gelenkbeweglichkeitsmessung _____	197
Anhang 10 - HOS-Formblatt für den 6-Minuten-Gehtest _____	199
Anhang 11 - HOS-Formblatt für eine Enzyminfusion _____	200
Anhang 12 - Elternberichtsformular (HS-FOCUS) _____	201
Anhang 13 - Patientenselbstberichtsformular (HS-FOCUS) _____	211
Anhang 14 - Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum____	219
Lebenslauf _____	224
Eidesstattliche Erklärung _____	225
Posterbeiträge und Vorträge _____	226
Danksagung _____	227

## Anhang 1 - HOS-Patienteninformation und Einwilligungserklärung

### **Hunter Outcome Survey**

#### **Hunter Outcome Survey**

#### **Eine internationale, multizentrische, Langzeitbeobachtungsstudie bei Patienten mit Morbus Hunter (Mucopolysaccharidose II)**

#### **Patienteninformation**

Liebe Patientin, lieber Patient,

##### *Was ist Morbus Hunter?*

Morbus Hunter ist eine seltene genetische Störung, die den Abbau komplexer Kohlenhydrate, sogenannter Mucopolysaccharide, im Körper beeinträchtigt. Es wird auch als Mucopolysaccharidose des Typ II (MPS II) bezeichnet, da es eine von verschiedenen, verwandten lysosomalen Speicherkrankheiten ist.

Morbus Hunter ist eine Störung, die an das X-Chromosom gebunden ist, sie wird also über das weibliche X-Chromosom von der Mutter an ihre Kinder vererbt. Das Syndrom tritt daher am häufigsten bei Männern auf, wobei vereinzelt auch Fälle bei Frauen berichtet wurden. Bei Morbus Hunter (MPS II) besteht ein Mangel an dem Enzym Iduronatsulfat-sulfatase; dies hat zur Folge, dass teilweise abgebaute Mucopolysaccharide, auch Glykosaminoglykane (GAGs) genannt, sich in Zellen im gesamten Körper ansammeln. Diese Ansammlung beeinflusst zunehmend die Funktion bestimmter Gewebe und Organe, und es treten zunehmend Zeichen von Morbus Hunter (MPS II) auf. Hierzu zählen typische Gesichtszüge, Kleinwuchs, vorgewölbter Bauch auf Grund einer Vergrößerung von Leber und Milz, Skelettveränderungen und Gelenksteifheit. Personen mit Morbus Hunter (MPS II) können auch an fortschreitendem Hörverlust und Verschlechterung der Sehkraft, Verdickung der Herzklappen, die zu einer Verringerung der Herzfunktion führt, obstruktiven Atemwegserkrankungen und Schlafapnoe leiden. In besonders schweren Fällen führt eine Beteiligung des Zentralen Nervensystems zu einer fortschreitenden Abnahme der Intelligenz. Nicht alle Patienten mit Morbus Hunter (MPS II) sind von dieser Erkrankung in gleichem Maße betroffen, der Schweregrad der Symptome variiert deutlich.

##### *Was ist der Hunter Outcome Survey?*

Im Hinblick auf Morbus Hunter (MPS II) bleiben noch viele Fragen offen. Um mehr über die Erkrankung zu erfahren und die klinische Behandlung von betroffenen Patienten zu verbessern, wurde der Hunter Outcome Survey eingerichtet.

In dieser Datenbank werden gemäß den Empfehlungen von führenden international anerkannten Experten Informationen von Patienten mit Morbus Hunter (MPS II), über lysosomale Speicherkrankheiten allgemein und insbesondere über Morbus Hunter (MPS II) erfasst. Hauptziel des Hunter Outcome Survey ist die Verwendung dieser Daten zur Verbesserung der Behandlung dieser Erkrankung. Der Auftraggeber bzw. Sponsor der Hunter Outcome Survey ist die Firma Shire Pharmaceuticals, Rinkebyvägen 11B, SE 182 36 Danderyd, Schweden.

Patienteninformation/Einverständniserklärung für Erwachsenen bzw. Erziehungsberechtigte der Patienten,  
Version 1.1 vom 11. November 2005  
Protokoll Version 1.0 vom 04. August 2005

Seite 1 von 5

## Hunter Outcome Survey

Bei Einschluss in den Hunter Outcome Survey wird Ihre bzw. die medizinische Vorgeschichte Ihres Kindes dokumentiert, einschließlich des Jahres, in dem die Erkrankung diagnostiziert wurde, sowie Details über Morbus Hunter (MPS II)-bedingte Zeichen und Symptome und vorangegangene Behandlungen. Diese Informationen werden von Ihnen (Ihrem Kind) selbst und vom behandelnden Arzt gegeben und aus Ihrer bzw. der Krankenakte Ihres Kindes entnommen.

Ihr Arzt bzw. der Arzt Ihres Kindes wird die üblichen klinischen Untersuchungen weiterhin fortsetzen und die Daten in die Hunter Outcome Survey Datenbank eingeben. Dies schließt auch die Ergebnisse von körperlichen Untersuchungen und Labortests ein. Sie bzw. Ihr Kind können auch gebeten werden, Fragebögen (schriftlich oder elektronisch) zur Beurteilung von Veränderungen in Ihrer Lebensqualität zu beantworten.

Ihre Daten bzw. die Daten Ihres Kindes d.h. Informationen zu Ihnen bzw. Ihrem Kind und der Teilnahme am Hunter Outcome Survey, werden computergestützt in der Datenbank bearbeitet. Die Mitarbeiter des Outcome Survey von Shire Pharmaceuticals sind für die Bearbeitung verantwortlich. Shire Pharmaceuticals ist ein pharmazeutisches Unternehmen, das auf die Behandlung seltener Störungen, insbesondere lysosomaler Speicherkrankheiten, spezialisiert ist.

Zu persönlichen Daten zählen Geburtsdatum (es wird nur das Geburtsmonat und -jahr erfasst und gespeichert), Geschlecht, ethnische Zugehörigkeit, genetische Diagnose (falls vorhanden), Symptomatik der Erkrankung, die Behandlung und Lebensbedingungen, die für das Nachsorgeprogramm relevant sind. Ferner werden Ihre Initialen bzw. die Ihres Kindes und eine besondere Hunter Outcome Survey Nummer (Ihre Identifikationsnummer bzw. die Ihres Kindes) in die Datenbank eingegeben. Nur der Sie bzw. Ihr Kind behandelnde Arzt (und seine Mitarbeiter) werden Zugang zu dieser Nummer haben, mit der Sie bzw. Ihr Kind identifiziert werden können.

### *Wozu geben Sie Ihr Einverständnis und welche Rechte haben Sie?*

Ihre persönlichen Daten bzw. die persönlichen Daten Ihres Kindes werden nur wie oben beschrieben in pseudonymisierter Form und ausschließlich an die Mitarbeiter des Hunter Outcome Survey und Gesundheitsbehörden im In- oder Ausland weitergegeben. Der Zugang zur Datenbank ist für den behandelnden Arzt auf seine Patienten begrenzt.

Die Daten werden ausschließlich zur Analyse, zu Studienzwecken, statistischen Berechnungen usw. verwendet, um die Entwicklung von Patienten mit Morbus Hunter (MPS II) zu verfolgen und ihre medizinische Versorgung zu verbessern. Einige dieser Analysen werden auch in wissenschaftlichen Veröffentlichungen verwendet werden. Die Datenanwendung entspricht der EU Directive 2002/58/EC (July 12, 2002).

Die Laufzeit des Hunter Outcome Survey ist unbegrenzt. Nach Beendigung werden die Daten in der Datenbank gemäß den Vorschriften für mindestens 15 Jahre gespeichert.

Durch Unterzeichnen dieser Patienteninformation geben Sie Ihr Einverständnis, dass Ihre persönlichen Daten bzw. die persönlichen Daten Ihres Kindes in der beschriebenen Weise bearbeitet werden dürfen. Ihr Einverständnis ermöglicht es, dass die persönlichen Daten an Shire Pharmaceuticals und Gesundheitsbehörden im In- und Ausland weitergegeben werden können.

## Hunter Outcome Survey

Sie haben jederzeit das Recht, Ihre persönlichen Daten bzw. die persönlichen Daten Ihres Kindes, die in die Datenbank eingegeben wurden, durch den behandelnden Arzt \_\_\_\_\_ (Anschrift) einzusehen.

Sie haben ferner das Recht, um Korrektur jeglicher inkorrektur Angaben zu bitten. Sie können ein Mal pro Jahr schriftliche Informationen über die Form, in der Ihre Angaben bzw. die Angaben Ihres Kindes bearbeitet werden, einfordern (Anschrift: Shire Pharmaceuticals, Outcomes Survey Director, Rinkebyvägen 11B, SE 182 36 Danderyd, Schweden. Tel +46 8 544 964 07. Fax +46 8 544 964 29).

Ihre Teilnahme bzw. die Teilnahme Ihres Kindes) am Hunter Outcome Survey ist völlig freiwillig. Ihre Behandlung bzw. die Behandlung Ihres Kindes wird nicht dadurch beeinflusst, ob Sie sich für oder gegen eine Teilnahme entschließen. Sie haben ferner das Recht, jederzeit Ihre Einwilligung, dass Daten in den Hunter Outcome Survey eingegeben werden, zu widerrufen. In diesem Fall können aber die Daten, die bis zu diesem Zeitpunkt eingegeben wurden, weiterhin verwendet werden.

Wenn Sie Fragen zum Hunter Outcome Survey haben, wird \_\_\_\_\_ diese gern beantworten.

Sie können ihn/sie unter Tel: \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_ erreichen.

Patientennummer: \_\_\_\_\_

## Hunter Outcome Survey

### Hunter Outcome Survey

#### Eine internationale, multizentrische, Langzeitbeobachtungsstudie bei Patienten mit Morbus Hunter (Mucopolysaccharidosis II)

#### Einverständniserklärung des Patienten

Ich erkläre mich damit einverstanden, in der in der Einverständniserklärung beschriebenen Form an dem Hunter Outcome Survey teilzunehmen bzw. mein Kind teilnehmen zu lassen. Ich weiß, dass die Teilnahme freiwillig ist und dass ich das Recht habe, jederzeit aus dem Survey auszusteigen bzw. die Teilnahme meines Kindes zu beenden. Ich habe die Informationen über den Survey gelesen und alle meine Fragen wurden beantwortet. Ich stimme zu, dass die Daten dieses Survey ohne Nennung meines Namens bzw. des Namens meines Kindes zur Auswertung, Speicherung und elektronischen Bearbeitung über das Internet weitergegeben werden können. Ich weiß, dass ich eine von mir unterzeichnete Ausfertigung dieser Einverständniserklärung wie auch der Patienteninformation erhalten werde.

.....  
Vollständiger Name des Patienten in Druckbuchstaben

Unterschrift..... Datum:.....  
(Patient)

.....  
Name des 1. Sorgeberechtigten in Druckbuchstaben      Art der Beziehung zum Patienten

.....  
Unterschrift des 1. Sorgeberechtigten      Datum

.....  
Name des 2. Sorgeberechtigten in Druckbuchstaben      Art der Beziehung zum Patienten

.....  
Unterschrift des 2. Sorgeberechtigten      Datum

## Hunter Outcome Survey

### Erklärung des aufklärenden Arztes

Ich erkläre, dass ich den Patienten bzw. die Sorgeberechtigten des Patienten über die Art, die Bedeutung und die Konsequenzen des Survey informiert habe. Die Patienteninformation wurde besprochen und der Patient bzw. die Sorgeberechtigten haben zusammen mit der Einverständniserklärung eine Ausfertigung erhalten.

Name.....  
(aufklärender Arzt)

Unterschrift..... Datum:.....

(Mit freundlicher Genehmigung der Firma Shire)



## Anhang 2 - HOS-Einwilligungserklärung für Kinder

### **Hunter Outcome Survey**

#### **Hunter Outcome Survey**

#### **Eine internationale, multizentrische, Langzeitbeobachtungsstudie bei Patienten mit Morbus Hunter (Mucopolysaccharidosis II)**

#### **Einwilligungserklärung für Kinder**

##### *Warum haben wir einen Termin mit dir vereinbart?*

Wir möchten Dir etwas zu einer Studie zu Kindern mit Morbus Hunter erzählen und wir möchten herausfinden, ob Du an dieser Studie teilnehmen möchtest. Dr. \_\_\_\_\_ und weitere Ärzte führen diese Studie weltweit durch.

##### *Warum führen wir diese Studie durch?*

Wir möchten Informationen über Morbus Hunter sammeln. Diese Informationen werden uns helfen, Deine Krankheit besser zu verstehen, und hoffentlich helfen, die Behandlung zu verbessern.

##### *Was wird mit dir geschehen?*

Deine Krankheit wird wie bisher kontrolliert, und Du wirst weiterhin behandelt. Es werden keine besonderen Untersuchungen durchgeführt, nur solche, die erforderlich sind, um Deine Krankheit optimal zu überwachen. Zu diesen Routineuntersuchungen können regelmäßige Bluttests sowie Bilder von Deinem Herz, Bauch, Deinen Knochen und Deinem Gehirn zählen. Außerdem können Dein Gehör, Deine Sehkraft, Deine Atmung und die Fähigkeit, Deine Arme und Beine zu bewegen, getestet werden. Du kannst auch gebeten werden, Fragebögen zu Deinen allgemeinen Aktivitäten und dazu, wie Du Dich fühlst, auszufüllen.

Die Ergebnisse Deiner Untersuchungen werden aufgezeichnet und (ohne Deinen Namen) in einen Computer eingegeben. Hierdurch können die Daten, die von vielen Patienten wie Dir gesammelt werden, in regelmäßigen Abständen ausgewertet werden.

##### *Wird es dir durch die Teilnahme an der Studie besser gehen?*

Nein, durch die Studie wird es Dir in nächster Zeit nicht besser gehen. Die Ärzte hoffen aber, dass sie etwas finden werden, das Dir und anderen Patienten später helfen wird.

##### *Hast du irgendwelche Fragen?*

Du kannst jederzeit Fragen stellen. Du kannst jetzt fragen oder auch später. Du kannst mit mir oder auch mit jemand anderem sprechen.

## Hunter Outcome Survey

*Musst du an dieser Studie teilnehmen?*

Nein, musst Du nicht. Niemand wird böse sein, wenn Du nicht an der Studie teilnehmen möchtest. Du musst es uns nur sagen. Sag uns einfach, ob Du an der Studie teilnehmen möchtest. Und denke daran, dass Du jetzt ja sagen und deine Meinung später ändern kannst. Es liegt bei Dir.

Name:.....  
(Patient)

Name.....  
(Aufklärender Arzt)

Unterschrift.....

Unterschrift .....

Datum:.....

Datum:.....

Patienteninformation/Einverständniserklärung für Erwachsenen bzw. Erziehungsberechtigte der Patienten,  
Version 1.0 vom 01. Oktober 2005  
Protokoll Version 1.0 vom 04. August 2005

Seite 2 von 2

(Mit freundlicher Genehmigung der Firma Shire)

## Anhang 3 - Patienteninformation / Einwilligungserklärung 6 – 12-Jährige

Neutralisierende Antikörper bei Morbus  
Hunter und Morbus Fabry-Patienten



UNIVERSITÄT **medizin.**

MAINZ

Studienleitung: Herr Prof. Dr. M. Beck  
Ansprechpartnerin: Frau M. Bayer (Apothekerin)  
Langenbeckstr. 2, 55131 Mainz  
Telefon: +49 (0) 6131 17-5754 oder -7209  
Telefax: +49 (0) 6131 17-5672

### Patienteninformation und Einwilligungserklärung

#### Dein Informationsblatt

Liebe Patientin, lieber Patient,

wie du weißt, leidest du an einer Erkrankung, die dich in deinen täglichen Leben einschränkt. Dir fehlt ein bestimmter Stoff, den Dein Körper nicht herstellen kann. Auf der ganzen Welt gibt es Kinder, die mit dieser Störung leben müssen. Überall versuchen Forscher, Ärzte und Apotheker, die Behandlung für Kinder wie dich zu verbessern. Sie führen sogenannte „Studien“ durch, um mehr über deine Krankheit zu lernen.

#### Was soll ich nun tun?

Wir möchten dich nun fragen, ob du uns hilfst, eine Studie durchzuführen, um mehr über die Therapie deiner Erkrankung zu lernen.

Jeder Mensch hat eine Gesundheitspolizei, die dafür sorgt, dass Bakterien erkannt und keinen Schaden mehr anrichten können. Ein Teil dieser Gesundheitspolizei nennt sich „Antikörper“.

Du bekommst regelmäßig eine Infusion mit dem Stoff, der deinem Körper fehlt. Leider kann es passieren, dass die Antikörper den Stoff als fremd erkennen und genauso unschädlich machen wollen wie die Bakterien.

Wir wollen herausfinden, ob es bei dir auch diese Antikörper gibt gegen den Stoff in der Infusion gibt und wie viele andere Patienten diese Antikörper haben.

Wir fragen daher auch 160 andere Kinder in der Villa Metabolica, ob sie uns ebenfalls helfen.

#### Was wird mit mir geschehen?

Du kannst mit deiner Mama oder deinem Papa in der nächsten Zeit wie gewohnt weiter in die Villa Metabolica kommen. Alle Untersuchungen und Behandlungen werden wie immer verlaufen. Der einzige Unterschied wird sein, dass mit einer deiner Blutproben ein zusätzlicher Test gemacht wird. Der Test wird zeigen, ob deine Antikörper den Stoff unschädlich machen wollen. Außerdem wollen wir schauen, ob diese Antikörper den Verlauf deiner Krankheit beeinflussen.

**Du hast durch unsere Studie keine zusätzlichen Termine und auch keine zusätzlichen Untersuchungen.**

**Kann ich meine Meinung ändern?**

Wenn du uns jetzt helfen möchtest, deine Meinung aber später änderst, macht das auch nichts. Du kannst jederzeit, wann immer du willst mit der Studie aufhören. Deine Ärzte werden dich auch dann jederzeit weiterbetreuen.

Wenn du weitere Fragen hast zu dem, was wir mit deinem Blut machen, kannst du natürlich deine Mama oder deinen Papa fragen, oder du kannst die Ärzte oder die Apothekerin befragen.

Sie werden dir all deine Fragen beantworten.

Vielen Dank, dass du unsere Information gelesen hast.

**Prof. Dr. M. Beck**  
Leiter der Villa Metabolica

**M. Bayer**  
Apothekerin

Neutralisierende Antikörper bei Morbus  
Hunter und Morbus Fabry-Patienten



UNIVERSITÄTSmedizin.

MAINZ

Studienleitung: Herr Prof. Dr. M. Beck  
Ansprechpartnerin: Frau M. Beyer (Apothekerin)  
Langenbeckstr. 2, 55131 Mainz  
Telefon: +49 (0) 6131 17-5734 oder -7209  
Telefax: +49 (0) 6131 17-5672

### Deine Einwilligungserklärung

*Diesen Teil soll die Patientin / der Patient selbst ausfüllen!*

Hast du dein Informationsblatt gelesen?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Hast du alle Fragen gestellt, die du stellen wolltest?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Hat der Arzt alle deine Fragen beantwortet?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Weißt du, dass du mit der Studie aufhören kannst, wenn du das möchtest?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Möchtest du teilnehmen?	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein

#### **Patientin / Patient**

Name: \_\_\_\_\_  
Geburtsdatum: \_\_\_\_\_  
Unterschrift: \_\_\_\_\_  
Datum: \_\_\_\_\_

#### **Eltern / gesetzlicher Vertreter**

Name: \_\_\_\_\_  
Unterschrift: \_\_\_\_\_  
Datum: \_\_\_\_\_

#### **Aufklärender Arzt**

Name: \_\_\_\_\_  
Unterschrift: \_\_\_\_\_  
Datum: \_\_\_\_\_

## Anhang 4 - Patienteninformation 18-Jährige und Eltern

**UNIVERSITÄTSmedizin.**

MAINZ

Studienleitung: Herr Prof. Dr. M. Beck  
Ansprechpartnerin: Frau M. Bayer (Apothekerin)  
Langenbeckstr. 2, 55131 Mainz  
Telefon: +49 (0) 6131 17-5754 oder -7209  
Telefax: +49 (0) 6131 17-5672

### Patienteninformation

#### **Untersuchung der Neutralisationskapazität von Antikörpern bei Morbus Fabry- und Morbus Hunter-Patienten gebildet unter Enzyersatztherapie und deren klinischen Auswirkungen**

Liebe/r Patient/In, liebe Eltern,

wir laden Sie ein, an einer Studie teilzunehmen.

Im Sommer 2011 startet an der Villa Metabolica der Universitätsmedizin Mainz eine Studie zu neutralisierenden Antikörpern bei Morbus Fabry und Morbus Hunter-Patienten. Bei Fabry- und Hunter-Patienten besteht seit 2001 bzw. 2007 die Möglichkeit der Enzyersatztherapie (ERT). Im Laufe der ERT können sich bei einigen Patienten Antikörper bilden, die zum Teil auch die Enzyme der ERT neutralisieren, d.h. deren Wirkung einschränken könnten.

In der Studie soll untersucht werden, ob sich neutralisierende Antikörper entwickeln und ob diese Antikörper auch die Wirksamkeit der ERT einschränken.

#### Ablauf der Studie

Für diese Studie werden die Ergebnisse des halbjährlichen Klinikbesuches von Ihnen/ Ihres Kindes verwendet und lediglich mit dem routinemäßigen abgenommenen Blut ein zusätzlicher Test durchgeführt. Außerdem wird eine kleine Menge der Blutprobe an die Firma Shire (300 Shire Way, Lexington, MA 02421, USA), ebenfalls zum Zwecke zusätzlicher Antikörper-Untersuchungen im Rahmen dieser Studie, verschickt. Dies geschieht jedoch nicht unter Nennung Ihres Namens / Namen Ihres Kindes, sondern die Blutprobe wird pseudonymisiert, d.h. kodiert, so dass die Firma nicht nachvollziehen kann, um welchen Patienten es sich handelt. Eine weitere Belastung entsteht Ihnen/ Ihrem Kind nicht. Bei Untersuchung des Blutes wird festgestellt, ob sich bei Ihnen/ Ihrem Kind bereits neutralisierende Antikörper entwickelt haben. Danach wird das Ergebnis der zusätzlichen Blutuntersuchung mit Ihren sonstigen aktuellen und in der Vergangenheit festgehaltenen Labor- und klinischen Ergebnissen in Verbindung gebracht. Es werden ebenfalls die von Ihnen/ Ihrem Kind ausgefüllten Fragebögen mit in dieser Studie ausgewertet.

Die Teilnahme an der Studie ist selbstverständlich freiwillig. Wenn Sie/ Ihr Kind sich für eine Teilnahme entscheiden sollten, ist es aus datenschutzrechtlichen Gründen notwendig, dass eine Einwilligungserklärung ausgefüllt und unterschrieben wird. Für Ihre Bereitschaft zum Lesen und ggf. zur Teilnahme an dieser Studie möchten wir uns bereits jetzt bei Ihnen bedanken.

#### Datenschutzrechtliche Informationen:

Die Ergebnisse der Blutuntersuchung dienen nur zum Zweck der oben genannten Studie. Die Daten sind vor fremdem Zugriff geschützt. Die Daten werden pseudonymisiert, d.h. kodiert ohne Angaben von Namen, Anschrift, Initialen oder Ähnliches erhoben, gespeichert und vom Auftraggeber der Studie (Villa Metabolica der Universitätsmedizin Mainz) ausgewertet.

Die Weitergabe an Dritte und wissenschaftliche Veröffentlichung erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form, d.h. die Daten können keiner Person mehr zugeordnet werden.

Soweit gesetzliche Vorschriften keine längeren Aufbewahrungspflichten vorsehen, werden die Daten spätestens nach 10 Jahren nach der letzten Eintragung von der Villa Metabolica der Universitätsmedizin Mainz gelöscht.

Mit freundlichen Grüßen und besten Wünschen,

Prof. Dr. M. Beck  
Leiter der Villa Metabolica

M. Bayer  
Apothekerin

**Anhang 5 - Einwilligungserklärung 18-Jährige und Eltern****UNIVERSITÄTSmedizin.**

MAINZ

Studienleitung: Hr. Prof. Dr. M. Beck  
Ansprechpartnerin: Fr. M. Bayer (Apothekerin)  
Langenbeckstr. 2, 55131 Mainz  
Telefon: +49 (0) 6131 17-5734 oder -7209  
Telefax: +49 (0) 6131 17-5672

**Einwilligungserklärung****Untersuchung der Neutralisationskapazität von Antikörpern bei Morbus Fabry- und Morbus Hunter-Patienten gebildet unter Enzyersatztherapie und deren klinischen Auswirkungen**

Ich erkläre mich bereit, dass ich oder mein Kind an der oben genannten Studie freiwillig teilnehmen wird.

Ich bin in einem persönlichen Gespräch ausführlich über das Projekt mit den neutralisierenden Antikörpern informiert worden und habe verstanden, um was es in der Studie geht.

Ich hatte die Gelegenheit zu einem Beratungsgespräch. Alle meine Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet, ich kann jederzeit neue Fragen stellen. Ich habe darüber hinaus die aktuelle Patienteninformation gelesen und verstanden. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir/meinem Kind daraus Nachteile entstehen.

**Ich habe verstanden und bin damit einverstanden, dass meine studienbezogenen Daten/die Daten meines Kindes pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Namen, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) erhoben, auf Datenträgern gespeichert und ausgewertet werden; die Weitergabe an Dritte einschließlich wissenschaftlichen Veröffentlichungen erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form, d.h. kann nicht meiner Person zugeordnet werden.**

Eine Kopie der Patienteninformation und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten, gelesen und verstanden.

\_\_\_\_\_  
Vor- und Nachname

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des Patienten  
bzw. des Erziehungsberechtigten

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligungserklärung eingeholt.

\_\_\_\_\_  
Vor- und Nachname der aufklärenden Person

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

## Anhang 6 - Patienteninformation 13 – 17-Jährige

**UNIVERSITÄTS**medizin.

MAINZ

Studienleitung: Herr Prof. Dr. M. Beck  
Ansprechpartnerin: Frau M. Bayer (Apothekerin)  
Langenbeckstr. 2, 55131 Mainz  
Telefon: +49 (0) 6131 17-5754 oder -7209  
Telefax: +49 (0) 6131 17-5672

### Deine Patienteninformation

#### **Untersuchung der Neutralisationskapazität von Antikörpern bei Morbus Fabry- und Morbus Hunter-Patienten gebildet unter Enzymersatztherapie und deren klinischen Auswirkungen**

Liebe Patientin, lieber Patient,

wir laden dich ein, an einer Studie der Villa Metabolica teilzunehmen.

Im Sommer 2011 startet bei uns eine Studie zu Antikörpern bei Morbus Fabry und Morbus Hunter-Patienten. Du bekommst bereits regelmäßig Infusionen mit dem Enzym, das deinem Körper auf Grund deiner Krankheit fehlt. Es kann sein, dass im Laufe deiner Enzymersatztherapie sich Antikörper gebildet haben, die die Enzyme der Infusion unwirksam machen könnten. Antikörper sind Bestandteile deines Immunsystems, die normalerweise dafür zuständig sind, Bakterien und Viren unschädlich zu machen. In unserer Studie soll untersucht werden, ob sich neutralisierende Antikörper entwickeln und ob diese Antikörper die Wirksamkeit der Enzyminfusion einschränken.

#### Ablauf der Studie

Für diese Studie wird lediglich mit einem kleinen Teil von deinem routinemäßig abgenommenen Blut ein zusätzlicher Test durchgeführt. Außerdem wird eine kleine Menge deiner Blutprobe an die Firma Shire (300 Shire Way, Lexington, MA 02421, USA) ebenfalls zum Zwecke zusätzlicher Antikörper-Untersuchungen im Rahmen dieser Studie, verschickt. Dies geschieht jedoch nicht unter Nennung deines Namens, sondern die Blutprobe wird pseudonymisiert, d.h. kodiert, so dass die Firma nicht nachvollziehen kann, um welchen Patienten es sich handelt. Weitere Untersuchungen oder Termine sind nicht nötig. Bei der Untersuchung des Blutes wird festgestellt, ob sich bei dir bereits neutralisierende Antikörper entwickelt haben. Danach wird das Ergebnis der zusätzlichen Blutuntersuchung mit deinen sonstigen aktuellen und in der Vergangenheit festgehaltenen Untersuchungsergebnissen in Verbindung gebracht. Es werden ebenfalls die von dir ausgefüllten Fragebögen mit in dieser Studie ausgewertet.

Die Teilnahme an der Studie ist selbstverständlich freiwillig. Solltest du weitere Fragen haben, dann zögere nicht, diese zu stellen. Du kannst natürlich auch jederzeit deine Meinung ändern und ohne Angabe eines Grundes deine Einwilligung zur Studie zurückziehen.

Wenn du dich für eine Teilnahme entscheiden solltest, ist es aus datenschutzrechtlichen Gründen notwendig, dass eine Einwilligungserklärung ausgefüllt und unterschrieben wird. Für deine Bereitschaft zum Lesen dieser Information möchten wir uns bei dir bedanken.

#### Datenschutzrechtliche Informationen:

Die Ergebnisse der Blutuntersuchung dienen nur zum Zweck der oben genannten Studie. Die Daten sind vor fremdem Zugriff geschützt. Die Daten werden pseudonymisiert, d.h. kodiert ohne Angaben von Namen, Anschrift, Initialen oder Ähnliches erhoben, gespeichert und vom Auftraggeber der Studie (Villa Metabolica der Universitätsmedizin Mainz) ausgewertet.

Die Weitergabe an Dritte und wissenschaftliche Veröffentlichung erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form, d.h. die Daten können keiner Person mehr zugeordnet werden.

Soweit gesetzliche Vorschriften keine längeren Aufbewahrungspflichten vorsehen, werden die Daten spätestens nach 10 Jahren nach der letzten Eintragung von der Villa Metabolica der Universitätsmedizin Mainz gelöscht.

Mit freundlichen Grüßen und besten Wünschen,

Prof. Dr. M. Beck  
Leiter der Villa Metabolica

M. Bayer  
Apothekerin



## Anhang 7 - Einwilligungserklärung 13 – 17-Jährige



UNIVERSITÄTSmedizin.

MAINZ

Studienleitung: Hr. Prof. Dr. M. Beck  
 Ansprechpartnerin: Fr. M. Bayer (Apothekerin)  
 Langenbeckstr. 2, 55131 Mainz  
 Telefon: +49 (0) 6131 17-5734 oder -7209  
 Telefax: +49 (0) 6131 17-5672

### Deine Einwilligungserklärung

**Untersuchung der Neutralisationskapazität von Antikörpern bei Morbus Fabry- und Morbus Hunter-Patienten gebildet unter Enzyersatztherapie und deren klinischen Auswirkungen**

Ich erkläre mich bereit, freiwillig an der oben genannten Studie teilzunehmen. Ich bin in einem persönlichen Gespräch ausführlich über das Projekt mit den neutralisierenden Antikörpern informiert worden und habe verstanden, worum es in der Studie geht. Ich hatte die Gelegenheit zu einem Beratungsgespräch. Alle meine Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet und ich weiß, dass ich jederzeit neue Fragen stellen kann. Ich habe darüber hinaus die aktuelle Patienteninformation gelesen und verstanden. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

**Ich habe verstanden und bin damit einverstanden, dass meine studienbezogenen Daten pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Namen, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) erhoben, auf Datenträgern gespeichert und ausgewertet werden; die Weitergabe an Dritte einschließlich wissenschaftlichen Veröffentlichungen erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form, d.h. kann nicht meiner Person zugeordnet werden.**

Eine Kopie der Patienteninformation und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten, gelesen und verstanden.

\_\_\_\_\_  
 Vor- und Nachname

\_\_\_\_\_  
 Unterschrift des Patienten

\_\_\_\_\_  
 Ort, Datum

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligungserklärung eingeholt.

\_\_\_\_\_  
 Vor- und Nachname der aufklärenden Person

\_\_\_\_\_  
 Unterschrift

\_\_\_\_\_  
 Ort, Datum

## Anhang 8 - ERNDIM Zertifikat

ERN417KVUG

Dr. M. Beck/M.Bayer

Universitäts-Kinderklinik- Biochemische-Genetisches Labor.

MAINZ

GERMANY

Dear ERNDIM participant,

Below your final score for the ERNDIM Lysosomal Enzymes Scheme 2012 is depicted. The R score reflects the results of the reproducibility, CV<20% 2 pt; CV= 20-25% 1 pt; CV>25% 0 pt. The D score reflects whether the measured enzyme activity compared to the control is correct (False positive D+ when enzyme activity non-patient sample is <20% control, D- when enzyme activity patient sample is >30% control, D0 no results). The other score reflects whether your results are within the mean  $\pm$  sd of the mean score of all the participants (2 pt) or within the mean  $\pm$  2sd (1 pt)

The performance is satisfactory when the total score is at least 11 points out of the maximum 16 this year.

	LF1	LF2	LF3	LF4	LF5	LF6	R Score	D Score	Total Score	Max Score
Iduronidate-2-sulphatase	2	2	2	0	2	2	2	2	14	16

From 2009-2012 your laboratory has participated in the ERNDIM lysosomal enzyme scheme.


Best regards,

Dr. G.C. Schoonderwoerd  
 Scientific Advisor  
[g.schoonderwoerd@erasmusmc.nl](mailto:g.schoonderwoerd@erasmusmc.nl)

This certificate was made by the scientific advisor (28-05-2013) and is valid without a signature when send by email by the scientific advisor



## Anhang 9 - HOS-Formblatt für die Gelenkbeweglichkeitsmessung

Local info		HOS info		
	ID <input type="text"/>	HOS no <input type="text"/>	Initials <input type="text"/>	<input type="text"/>
	Name <input type="text"/>	Family no <input type="text"/>	Sex <input type="text"/>	<input type="text"/>
	Elaprase <input type="text"/>	Birth date <input type="text"/>	Age <input type="text"/>	<input type="text"/>

**Joint Mobility**

*The starting position for this passive range of motion is based on the neutral zero method. Therefore the starting position should be 0°.*

*When it is not possible to begin the movements from the 0° start position, the ROM is recorded by writing the number of degrees the joint is away from the 0° at the beginning of the ROM. Example: The elbow can not be extended beyond 10° of elbow flexion and can be flexed to 120°. The start position is 10° and the end position is 120° so the ROM is 110°.*

*If it is not possible to reach 0° starting position, for a particular motion, then the range is expressed as a negative version of the opposing motion. Example: With a starting position for a flexion of 10° and a full-flexion of 120°, the range of motion is recorded as [120°-10°=110°] and the range of extension is recorded as -10°.*

Date

	Range of motion	Right +/- ROM	Left +/- ROM
<b>1. Wrist</b>			
Flexion	0 - 80°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Extension	0 - 70°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<b>2. Shoulder</b>			
Flexion	0 - 180°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Abduction	0 - 180°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Internal rotation	0 - 90°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
External rotation	0 - 90°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Extension	0 - 80°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<b>3. Elbow</b>			
Flexion	0 - 160°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Extension	0 - 10°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<b>4. Hip</b>			
Flexion, Knee bent	0 - 125°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Extension	0 - 40°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Abduction	0 - 45°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Adduction	0 - 30°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
External rotation	0 - 70°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Internal rotation	0 - 60°	<input type="text"/>	<input type="text"/>


HOS - Version 1.03      Copyright © 2004-2008 HOS - The Hunter Outcome Survey - Page 1 / 2      24/10/2008

	Range of motion	Right +/- ROM	Left +/- ROM
<b>5. Knee</b>			
Flexion	0 - 130°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Extension	0 - 10°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<b>6. Ankle</b>			
Dorsal extension	0 - 30°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Plantar flexion	0 - 50°	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<b>7. Comment</b>	<div style="border: 1px solid black; height: 200px; width: 100%;"></div>		

HOS - Version 1.03      Copyright © 2004-2008 HOS - The Hunter Outcome Survey - Page 2 / 2      24/10/2008

(Mit freundlicher Genehmigung der Firma Shire)


## Anhang 10 - HOS-Formblatt für den 6-Minuten-Gehtest

		Local info		HOS info			
	ID	<input type="text"/>		HOS no	<input type="text"/>	Initials	<input type="text"/>
	Name	<input type="text"/>		Family no	<input type="text"/>	Sex	<input type="text"/>
	Elaprase	<input type="text"/>		Birth date	<input type="text"/>	Age	<input type="text"/> yrs
				<b>6 Minutes Walk Test</b>			
Date	<input type="text"/>						
	Pre-Walk	Immediately following walk	2 minutes post walking				
Oxygen saturation (%)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>				
Heart rate (bpm)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>				
Respiratory rate (breaths/min)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>				
Time walked	<input type="text"/>	minutes	<input type="text"/>	seconds			
Distance walked	<input type="text"/>	meters					
Walking with assistance	<input type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No					
if yes, specify reason	-----						
Comment	<div style="border: 1px solid black; height: 150px; width: 100%;"></div>						

HOS - Version 1.03      Copyright © 2004-2006 HOS - The Hunter Outcome Survey - Page 1      Printed: 2008-01-16


(Mit freundlicher Genehmigung der Firma Shire)

**Anhang 11 - HOS-Formblatt für eine Enzyminfusion**

		Local Info		HOS Info			
		ID	Name	HOS no	Family no	Initials	Sex
		Elaprase	Birth date		Age		
							<b>Infusion Details</b>
Date	<input type="text"/>						
Weight	<input type="text"/>	kg					
Elaprase, prepared dose	<input type="text"/>	mg					
Lot no	<input type="text"/>						
Prepared infusion volume	<input type="text"/>	mL					
Was the infusion interrupted?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No						
<i>If it is not interrupted, just fill in the first infusion period.</i>							
	Start time	Stop time	Interrupted time				
Infusion period 1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>				
Infusion period 2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>				
Infusion period 3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>				
Total infusion time	<input type="text"/>	mn					
Total infusion period	<input type="text"/>	mn					
Total interrupted time	<input type="text"/>	mn					
Was the infusion terminated due to a reaction?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No						
<i>If yes, please report as an AE.</i>							
<i>If no, the infusion volume given should be the same as the prepared infusion volume.</i>							
Infusion volume given	<input type="text"/>	mL					
Elaprase, given dose	<input type="text"/>	mg					
Infusion rate	<input type="text"/>	mL / mn					
Rate of dose	<input type="text"/>	mg / mn					
Premedication	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <i>If yes, please report as a concomitant medication.</i>						
if yes, specify	<input type="text"/>						

(Mit freundlicher Genehmigung der Firma Shire)

## Anhang 12 - Elternberichtsformular (HS-FOCUS)

		Local info		HOS info		
	ID	<input type="text"/>	HOS no	<input type="text"/>	Initials	<input type="text"/>
	Name	<input type="text"/>	Family no	<input type="text"/>	Sex	<input type="text"/>
	Elaprase	<input type="text"/>	Birth date	<input type="text"/>	Age	<input type="text"/> yrs

## Elternberichtsformular

### Hunter Syndrom - Bewertungsskala der Funktionsfähigkeit zur Erweiterung des Klinischen Kenntnisstands

#### Anleitungen

- Wir möchten gerne erfahren, welchen Einfluss das Hunter-Syndrom auf das tägliche Leben ihres Kindes hat.
- Bitte wählen sie bei der Beantwortung der folgenden Fragen die Antwort aus, die die normalen Aktivitäten ihres Kindes IM LAUFE DER VORANGEGANGENEN WOCHEN am besten beschreibt (über einen durchschnittlichen Tag hinweg betrachtet). BITTE GEBEN SIE NUR DIE SCHWIERIGKEITEN ODER EINSCHRÄNKUNGEN AN, DIE DURCH DIE KRANKHEIT VERURSACHT WERDEN. Bitte geben Sie „nicht anwendbar“ an, wenn es sich um Aktivitäten handelt, die ihr Kind nicht durchführen kann, die jedoch für andere Kinder derselben Altersstufe auch nicht normal sind.
- Jede Frage in diesem Fragebogen ist unterschiedlich, obwohl manche ähnlich lauten. Manche Fragen beziehen sich möglicherweise auf Probleme, die bei ihrem Kind nicht immer vorhanden sind. Es ist wichtig, dass Sie angeben, wann diese Probleme auftreten und wann nicht. BITTE BEANTWORTEN SIE ALLE FRAGEN SO VOLLSTÄNDIG WIE MÖGLICH.
- Es gibt keine richtigen oder falschen Antworten. Wenn Sie sich nicht sicher sind, wie Sie eine Frage beantworten sollen, geben Sie die bestmögliche Antwort und machen Sie am Rand eine Notiz.
- Anmerkungen/Kommentare sind jederzeit willkommen.

*Wir bedanken uns für Ihre Teilnahme an dieser Studie.*

## Elternberichtsformular

**GEHEN / STEHEN (Unterkörperfunktionen)**

- ① *GAR nicht schwierig*  
 ② *ETWAS schwierig*  
 ③ *SEHR schwierig*  
 ④ *UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage*  
 ⑤ *GAR NICHT dazu in der Lage*  
 ⑥ *nicht anwendbar*

<b>Ist Ihr Kind in der Lage:</b>	①	②	③	④	⑤	⑥
1. auf flachen Füßen (auf Fußsohlen) einen halben Häuserblock einer Stadt bzw. einer Stadtstraße weit zu gehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. ohne Ermüdung 15-20 Minuten lang zu gehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. ohne körperliche Beschwerden zu gehen? (bzw. gemütlich zu gehen)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. auf einem Bein zu stehen / zu balancieren?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. ohne Ermüdung 10 Minuten lang zu stehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. aufrecht mit geradem Rücken und den Schultern an eine Wand gelehnt zu stehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. auf einen Fußbänkchen zu steigen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. bergauf zu gehen (z.B. auf eine Rampe, einen kleinen Hügel oder eine steile Auffahrt hinauf)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. eine Etage/Treppenreihe hinauf zu gehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. eine Etage/Treppenreihe hinunter zu gehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



## Elternberichtsformular

**GREIFEN / FASSEN (Oberkörperfunktionen)**

- ① *GAR nicht schwierig*  
 ② *ETWAS schwierig*  
 ③ *SEHR schwierig*  
 ④ *UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage*  
 ⑤ *GAR NICHT dazu in der Lage*  
 ⑥ *nicht anwendbar*

<b>Ist Ihr Kind in der Lage:</b>	①	②	③	④	⑤	⑥
1. eine Münze mit Daumen und Zeigefinger von einem Tisch zu nehmen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. einen Hamburger / ein Sandwich mit Daumen und Fingern aufzunehmen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. sich oben am Kopf zu berühren?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. eine Tube Zahnpaste zusammenzudrücken?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. sich in die Hände zu klatschen (die Handflächen gegeneinander zu klatschen), um ein Geräusch zu machen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. die Arme seitlich auszustrecken?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Handfläche und Finger flach auf einen Tisch zu legen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. die Hände ganz zu öffnen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Soda oder Saft aus einer Dose / einem Karton in einen Becher zu gießen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. sich die Schuhe anzuziehen, während es auf einem Stuhl sitzt?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. ein Hemd zuzuknöpfen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. alle Teile seines Körpers zu erreichen, um sich sauber und ordentlich zu halten? (z.B. die Rückseite des Kopfes, das Gesäß)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Elternberichtsformular

**SCHLAFEN**

- ① *GAR nicht schwierig*  
 ② *ETWAS schwierig*  
 ③ *SEHR schwierig*  
 ④ *UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage*  
 ⑤ *GAR NICHT dazu in der Lage*  
 ⑥ *nicht anwendbar*

**Ist Ihr Kind in der Lage:**

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

- |  |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. innerhalb von 20 Minuten, nachdem es ins Bett gebracht worden ist, einzuschlafen? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. die ganze Nacht durchzuschlafen, ohne aufzuwachen?                                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. zu schlafen, ohne zu schnarchen?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. morgens ausgeruht aufzuwachen?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. den ganzen Tag ohne Nickerchen wach zu sein?                                      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## Elternberichtsformular

## SCHULE / ARBEIT

- ① GAR nicht schwierig  
 ② ETWAS schwierig  
 ③ SEHR schwierig  
 ④ UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage  
 ⑤ GAR NICHT dazu in der Lage  
 ⑥ nicht anwendbar

## Ist Ihr Kind in der Lage:

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

- |   |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. einen ganzen Schul- / Arbeitstag mitzumachen?                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. alle Klassenaufgaben / Arbeitsaufgaben zu erledigen?         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. während des Unterrichts / bei der Arbeit aufmerksam zu sein? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## AKTIVITÄTEN

## Ist Ihr Kind in der Lage:

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

- |  |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. an körperlichen Aktivitäten (Spielen) mit anderen 1 Stunde lang teilzunehmen?                         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. auf einer Schaukel im Park zu schaukeln?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. mit Freunden / der Familie außer Haus zu gehen? (z.B. zum Einkaufszentrum, zum Essen, ins Kino, usw.) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. einen mittelgroßen Ball zu werfen und zu fangen? (z.B. einen Korbball)                                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Seiten in einem Buch umzublätern?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Brett- oder Videospiele zu spielen?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## Elternberichtsformular

**ATMEN**

- ① *GAR nicht schwierig*  
 ② *ETWAS schwierig*  
 ③ *SEHR schwierig*  
 ④ *UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage*  
 ⑤ *GAR NICHT dazu in der Lage*  
 ⑥ *nicht anwendbar*

**Ist Ihr Kind in der Lage:**

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

- |  |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. eine Geburtstagskerze auszublasen?                          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. als Sie sich ausruhen, lautlos zu atmen?                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. tägliche Aktivitäten auszuführen, ohne kurzatmig zu werden? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. sich zu unterhalten, ohne kurzatmig zu werden?              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. problemlos durch die Nase zu atmen?                         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. mit geschlossenem Mund durch die Nase zu atmen?             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## Elternberichtsformular

Die folgenden Fragen beschäftigen sich mit dem Grad der Zufriedenheit / Besorgnis Ihres Kindes in Bezug auf verschiedene Aspekte seiner Gesundheit. Obwohl wir wissen, dass es für Sie als Elternteil schwierig ist, diese Art von Fragen genau zu beantworten, versuchen sie bitte trotzdem, die Fragen nach bestem Wissen zu beantworten.

## ZUFRIEDENHEIT

- ① *sehr zufrieden*  
 ② *etwas zufrieden*  
 ③ *weder zufrieden noch unzufrieden*  
 ④ *etwas unzufrieden*  
 ⑤ *sehr unzufrieden*  
 ⑥ *nicht anwendbar*

Wie zufrieden, glauben Sie, war IHR KIND bisher in Bezug auf die folgenden Aspekte seiner Gesundheit:

①    ②    ③    ④    ⑤    ⑥

1. Mobilität?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Körperpflege? (z.B. Ankleiden, Kämmen, usw.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. normale Aktivitäten?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Schmerzen / Beschwerden?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Angstgefühle / Depressionen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Energie?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

---

**Elternberichtsformular**

Die folgenden Fragen beschäftigen sich mit dem Grad der Zufriedenheit / Besorgnis Ihres Kindes in Bezug auf verschiedene Aspekte seiner Gesundheit. Obwohl wir wissen, dass es für Sie als Elternteil schwierig ist, diese Art von Fragen genau zu beantworten, versuchen sie bitte trotzdem, die Fragen nach bestem Wissen zu beantworten.

- ① *gar nicht besorgt*
- ② *wenig besorgt*
- ③ *etwas besorgt*
- ④ *Ziemlich besorgt*
- ⑤ *außerst besorgt*
- ⑥ *nicht anwendbar*

**Wie sehr, glauben Sie, ist IHR KIND  
über seine derzeitigen Probleme in  
Bezug auf folgende Aspekte besorgt:**

①    ②    ③    ④    ⑤    ⑥

1. Gehen / Stehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Greifen / Fassen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Schlafen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Ausbildung?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Aktivitäten?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Atmen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Essen / Appetit?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Elternberichtsformular

Die folgenden Fragen beschäftigen sich damit, wie SIE sich in Bezug auf verschiedene Aspekte der Gesundheit Ihres Kindes fühlen.

## ZUFRIEDENHEIT

- ① *sehr zufrieden*  
 ② *etwas zufrieden*  
 ③ *weder zufrieden noch unzufrieden*  
 ④ *etwas unzufrieden*  
 ⑤ *sehr unzufrieden*  
 ⑥ *nicht anwendbar*

Wie zufrieden sind SIE mit den folgenden Aspekten der Gesundheit Ihres Kindes:

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

1. Mobilität?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Körperpflege? (z.B. Ankleiden, Kämmen, usw.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. normale Aktivitäten?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Schmerzen / Beschwerden?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Angstgefühle / Depressionen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Energie?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Elternberichtsformular

Die folgenden Fragen beschäftigen sich damit, wie SIE sich in Bezug auf verschiedene Aspekte der Gesundheit Ihres Kindes fühlen.

- ① *gar nicht besorgt*
- ② *wenig besorgt*
- ③ *etwas besorgt*
- ④ *Ziemlich besorgt*
- ⑤ *außerst besorgt*
- ⑥ *nicht anwendbar*

Wie besorgt sind SIE über die derzeitigen Probleme Ihres Kindes bezüglich:


① ② ③ ④ ⑤ ⑥

1. Gehen / Stehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Greifen / Fassen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Schlafen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Ausbildung?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Aktivitäten?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Atmen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Essen / Appetit?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(Mit freundlicher Genehmigung der Firma Shire)



## Anhang 13 - Patientenselbstberichtsformular (HS-FOCUS)

		Local info		HOS info		
 Deutsch	ID	<input type="text"/>	HOS no	<input type="text"/>	Initials	<input type="text"/>
	Name	<input type="text"/>	Family no	<input type="text"/>	Sex	<input type="text"/>
	Elapraxe	<input type="text"/>	Birth date	<input type="text"/>	Age	<input type="text"/>   <input type="text"/> yrs

## Patientenselbstberichtsformular

**Hunter Syndrom - Bewertungsskala der Funktionsfähigkeit zur Erweiterung des Klinischen Kenntnisstands**

## Anleitungen

- Wir möchten gerne erfahren, welchen Einfluss das Hunter-Syndrom auf Ihre Funktionsfähigkeit im täglichen Leben hat.
- Bitte wählen Sie bei der Beantwortung der folgenden Fragen die Antwort aus, die Ihre normalen Aktivitäten IM LAUFE DER VORANGEGANGENEN WOCHE am besten beschreibt (über einen durchschnittlichen Tag hinweg betrachtet). BITTE GEBEN SIE NUR DIE SCHWIERIGKEITEN ODER EINSCHRÄNKUNGEN AN, DIE DURCH DIE KRANKHEIT VERURSACHT WERDEN. Bitte geben Sie „nicht anwendbar“ an, wenn es sich um Aktivitäten handelt, die Sie nicht durchführen können, die jedoch für andere Kinder derselben Altersstufe auch nicht normal sind.
- Jede Frage in diesem Fragebogen ist unterschiedlich, obwohl manche ähnlich lauten. Manche Fragen beziehen sich möglicherweise auf Probleme, die bei Ihnen nicht immer vorhanden sind. Es ist wichtig, dass Sie angeben, wann diese Probleme vorhanden sind und wann nicht. BITTE BEANTWORTEN SIE ALLE FRAGEN SO VOLLSTÄNDIG WIE MÖGLICH.
- Es gibt keine richtigen oder falschen Antworten. Wenn Sie sich nicht sicher sind, wie Sie eine Frage beantworten sollen, geben Sie die bestmögliche Antwort und machen Sie am Rand eine Notiz.
- Anmerkungen/Kommentare sind jederzeit willkommen.

*Wir bedanken uns für Ihre Teilnahme an dieser Studie.*

## Patientenselbstberichtsformular

## GEHEN / STEHEN (Unterkörperfunktionen)

- ① GAR nicht schwierig  
 ② ETWAS schwierig  
 ③ SEHR schwierig  
 ④ UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage  
 ⑤ GAR NICHT dazu in der Lage  
 ⑥ nicht anwendbar

Sind Sie in der Lage:	①	②	③	④	⑤	⑥
1. auf flachen Füßen (auf Fußsohlen) einen halben Häuserblock einer Stadt bzw. einer Stadtstraße weit zu gehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. ohne Ermüdung 15-20 Minuten lang zu gehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. ohne körperliche Beschwerden zu gehen? (bzw. gemütlich zu gehen)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. auf einem Bein zu stehen / zu balancieren?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. ohne Ermüdung 10 Minuten lang zu stehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. aufrecht mit geradem Rücken und den Schultern an eine Wand gelehnt zu stehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. auf einen Fußbänkchen zu steigen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. bergauf zu gehen (z.B. auf eine Rampe, einen kleinen Hügel oder eine steile Auffahrt hinauf)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. eine Etage/Treppenreihe hinauf zu gehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. eine Etage/Treppenreihe hinunter zu gehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Patientenselbstberichtsformular

## GREIFEN / FASSEN (Oberkörperfunktionen)

- ① GAR nicht schwierig  
 ② ETWAS schwierig  
 ③ SEHR schwierig  
 ④ UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage  
 ⑤ GAR NICHT dazu in der Lage  
 ⑥ nicht anwendbar

Sind Sie in der Lage:	①	②	③	④	⑤	⑥
1. eine Münze mit Daumen und Zeigefinger von einem Tisch zu nehmen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. einen Hamburger / ein Sandwich mit Daumen und Fingern aufzunehmen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. sich oben am Kopf zu berühren?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. eine Tube Zahnpaste zusammenzudrücken?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. sich in die Hände zu klatschen (die Handflächen gegeneinander zu klatschen), um ein Geräusch zu machen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. die Arme seitlich auszustrecken?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Handfläche und Finger flach auf einen Tisch zu legen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. die Hände ganz zu öffnen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Soda oder Saft aus einer Dose / einem Karton in einen Becher zu gießen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. sich die Schuhe anzuziehen, während es auf einem Stuhl sitzt?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. ein Hemd zuzuknöpfen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. alle Teile ihres Körpers zu erreichen, um sich sauber und ordentlich zu halten? (z.B. die Rückseite des Kopfes, das Gesäß)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Patientenselbstberichtsformular

**SCHLAFEN**

- ① *GAR nicht schwierig*  
 ② *ETWAS schwierig*  
 ③ *SEHR schwierig*  
 ④ *UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage*  
 ⑤ *GAR NICHT dazu in der Lage*  
 ⑥ *nicht anwendbar*

**Sind Sie in der Lage:**

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

- |  |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. innerhalb von 20 Minuten, nachdem Sie zu Bett gegangen sind, einzuschlafen? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. die ganze Nacht durchzuschlafen, ohne aufzuwachen?                          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. morgens ausgeruht aufzuwachen?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. den ganzen Tag ohne Nickerchen wach zu sein?                                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## Patientenselbstberichtsformular

## SCHULE / ARBEIT

- ① GAR nicht schwierig  
 ② ETWAS schwierig  
 ③ SEHR schwierig  
 ④ UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage  
 ⑤ GAR NICHT dazu in der Lage  
 ⑥ nicht anwendbar

## Sind Sie in der Lage:

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

- |   |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. einen ganzen Schul- / Arbeitstag mitzumachen?                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. alle Klassenaufgaben / Arbeitsaufgaben zu erledigen?         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. während des Unterrichts / bei der Arbeit aufmerksam zu sein? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## AKTIVITÄTEN

## Sind Sie in der Lage:

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

- |  |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. an körperlichen Aktivitäten (Spielen) mit anderen 1 Stunde lang teilzunehmen?                         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. auf einer Schaukel im Park zu schaukeln?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. mit Freunden / der Familie außer Haus zu gehen? (z.B. zum Einkaufszentrum, zum Essen, ins Kino, usw.) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. einen mittelgroßen Ball zu werfen und zu fangen? (z.B. einen Korbball)                                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Seiten in einem Buch umzublätern?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Brett- oder Videospiele zu spielen?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## Patientenselbstberichtsformular

**ATMEN**

- ① *GAR nicht schwierig*  
 ② *ETWAS schwierig*  
 ③ *SEHR schwierig*  
 ④ *UNTERSCHIEDLICH: ist manchmal dazu in der Lage*  
 ⑤ *GAR NICHT dazu in der Lage*  
 ⑥ *nicht anwendbar*

**Sind Sie in der Lage:**

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

- |  |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. eine Geburtstagskerze auszublasen?                          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. als Sie sich ausruhen, lautlos zu atmen?                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. tägliche Aktivitäten auszuführen, ohne kurzatmig zu werden? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. sich zu unterhalten, ohne kurzatmig zu werden?              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. problemlos durch die Nase zu atmen?                         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. mit geschlossenem Mund durch die Nase zu atmen?             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**Patientenselbstberichtsformular**

Die folgenden Fragen beziehen sich auf Ihr Grad von Zufriedenheit / Besorgnis in Bezug auf unterschiedliche Aspekte Ihrer Gesundheit.

**ZUFRIEDENHEIT**

- ① *sehr zufrieden*  
 ② *etwas zufrieden*  
 ③ *weder zufrieden noch unzufrieden*  
 ④ *etwas unzufrieden*  
 ⑤ *sehr unzufrieden*  
 ⑥ *nicht anwendbar*

Wie zufrieden waren Sie bisher in Bezug auf die folgenden Aspekte Ihrer Gesundheit:

①    ②    ③    ④    ⑤    ⑥

1. Mobilität?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Körperpflege? (z.B. Ankleiden, Kämmen, usw.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. normale Aktivitäten?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Schmerzen / Beschwerden?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Angstgefühle / Depressionen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Energie?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Patientenselbstberichtsformular**

Die folgenden Fragen beziehen sich auf Ihr Grad von Zufriedenheit / Besorgnis in Bezug auf unterschiedliche Aspekte Ihrer Gesundheit.

- ① *gar nicht besorgt*
- ② *wenig besorgt*
- ③ *etwas besorgt*
- ④ *Ziemlich besorgt*
- ⑤ *außerst besorgt*
- ⑥ *nicht anwendbar*

**Wie besorgt sind Sie über Ihre derzeitigen Probleme bezüglich:**

①    ②    ③    ④    ⑤    ⑥

1. Gehen / Stehen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Greifen / Fassen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Schlafen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Ausbildung?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Aktivitäten?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Atmen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Essen / Appetit?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(Mit freundlicher Genehmigung der Firma Shire)



## Anhang 14 - Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum

Tabelle 38: Ergebnisse der IDS-Enzymaktivitätsmessung im Mischserum

Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]
1	45,0	275,0	160,0	18,9	11,8
	12,5	310,0	161,2	155,0	96,1
	11,1	347,0	179,1	211,0	117,8
	29,0	227,0	128,0	188,0	146,9
2	15,7	260,0	137,9	168,0	121,9
	19,9	183,6	101,8	126,9	124,7
	7,8	238,0	122,9	135,0	109,8
	276,0	415,0	345,5	338,0	97,8
3	3,4	348,0	175,7	7,7	4,4
	93,0	275,0	184,0	182,5	99,2
	35,5	193,3	114,4	114,0	99,7
	150,0	347,0	248,5	257,0	103,4
	80,1	350,6	215,4	232,0	107,7
4	0,0	357,0	178,5	180,0	100,8
	17,3	344,0	180,7	204,0	112,9
5	0,9	248,3	124,6	109,9	88,2
	1,2	279,0	140,1	137,0	97,8
6	11,3	324,0	167,7	192,0	114,5
	12,1	273,0	142,6	175,0	122,8
	10,4	253,5	131,9	146,8	111,3
	10,8	239,8	125,3	156,0	124,5
	4,3	271,0	137,7	148,0	107,5
	3,4	279,0	141,2	179,0	126,8
	38,2	427,0	232,6	262,0	112,6
7	7,1	273,0	140,1	144,0	102,8
	0,0	271,0	135,5	148,0	109,2
	4,5	397,0	200,8	191,0	95,1
	31,4	350,6	191,0	212,0	111,0

Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]
7	17,9	301,0	159,5	184,0	115,4
8	18,4	340,2	179,3	176,0	98,2
	6,8	281,0	143,9	149,0	103,6
	12,0	193,3	102,7	131,0	127,6
	8,8	427,0	217,9	218,0	100,1
	3,4	269,0	136,2	158,0	116,0
	6,9	248,3	127,6	124,4	97,5
9	20,9	239,8	130,4	175,0	134,3
	12,8	310,0	161,4	170,0	105,3
	9,9	295,0	152,5	152,0	99,7
	14,4	344,0	179,2	200,0	111,6
	4,6	342,4	173,5	171,2	98,7
10	6,2	237,2	121,7	142,0	116,7
	14,6	183,6	99,1	113,9	114,9
	18,6	322,0	170,3	172,0	101,0
11	6,7	243,4	125,1	144,3	115,4
	11,3	126,0	141,2	126,0	89,3
	297,0	295,0	296,0	291,0	98,3
	203,0	415,0	309,0	306,0	99,0
	6,4	248,3	127,3	135,4	106,3
12	17,8	224,6	121,2	165,7	136,7
	21,1	183,6	102,4	137,2	134,1
	282,0	307,0	294,5	323,0	109,7
	118,0	415,0	266,5	266,0	99,8
	15,6	340,2	177,9	182,0	102,3
13	158,1	243,4	200,8	198,2	98,8
	77,0	307,0	192,0	195,0	101,6
	61,0	227,0	144,0	140,0	97,2
	12,6	342,0	177,3	187,0	105,5
14	20,2	281,0	150,6	148,0	98,3

Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]
14	24,7	193,3	109,0	119,0	109,2
	0,7	279,0	139,8	159,0	113,7
	11,0	301,0	156,0	149,0	95,5
	19,0	301,0	160,0	179,0	111,9
15	28,0	311,0	169,5	172,0	101,5
	12,6	309,0	160,8	189,0	117,5
	9,4	350,6	180,0	210,0	116,7
16	3,3	299,0	151,1	166,9	110,4
	8,7	239,8	124,2	165,0	132,8
	14,0	183,6	98,8	113,4	114,8
	11,3	307,0	159,2	181,0	113,7
	19,0	237,0	128,0	150,0	117,2
17	26,0	273,0	149,5	179,0	119,7
	19,5	224,6	122,1	152,8	125,2
	334,2	183,6	258,9	366,7	141,6
	241,0	306,0	273,5	235,0	85,9
	25,0	185,0	105,0	127,0	121,0
	309,0	324,0	316,5	326,0	103,0
18	1,5	310,0	155,8	171,0	109,8
	3,8	350,6	177,2	196,0	110,6
19	0,9	240,8	120,9	115,5	95,6
	6,7	324,0	165,4	222,0	134,3
	13,3	424,0	218,6	200,0	91,5
	11,1	238,7	124,9	140,4	112,4
	9,6	256,0	132,8	151,2	113,9
	5,7	309,0	157,4	182,0	115,7
	11,4	427,0	219,2	220,0	100,4
	11,0	269,0	140,0	161,0	115,0
20	0,8	242,0	121,4	113,4	93,4
	185,2	183,6	184,4	223,0	120,9

Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]
20	6,6	438,0	222,3	259,0	116,5
	187,0	344,0	265,5	263,0	99,1
21	15,1	282,0	148,6	300,8	202,5
	3,3	254,1	128,7	143,4	111,4
	64,3	235,0	149,7	145,0	96,9
	15,4	193,3	104,4	131,0	125,5
22	5,0	342,0	173,5	159,0	91,6
	1,4	254,1	127,7	119,5	93,6
	3,3	310,0	156,6	150,0	95,8
	13,5	397,0	205,3	184,0	89,7
	3,5	427,0	215,3	214,0	99,4
23	0,5	324,0	162,3	18,4	11,3
	6,5	242,0	124,3	21,1	17,0
	0,9	309,0	154,9	38,3	24,7
	0,0	344,0	172,0	45,0	26,2
24	17,0	289,0	153,0	170,0	111,1
	25,9	183,6	104,8	123,8	118,2
	26,0	387,0	206,5	208,0	100,7
	38,0	179,0	108,5	143,0	131,8
25	15,3	333,2	174,3	337,5	193,7
	5,6	324,0	164,8	188,0	114,1
	8,3	348,0	178,2	186,0	104,4
	0,7	224,6	112,6	138,0	122,5
	18,1	238,0	128,1	136,0	106,2
	11,0	301,0	156,0	152,0	97,4
	26,0	325,0	175,5	222,0	126,5
26	4,3	398,0	201,1	4,9	2,4
	0,3	254,1	127,2	26,2	20,6
	0,2	243,4	121,8	29,1	23,9
	1,6	289,0	145,3	36,5	25,1

Patient N°	Gemessene IDS-Aktivität des Patienten [nmol/4h/ml]	Gemessene IDS-Aktivität des Gesunden [nmol/4h/ml]	Sollwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Istwert IDS-Aktivität Mischserum [nmol/4h/ml]	Prozentualer Anteil Istwert an Sollwert [%]
26	0,1	347,0	173,6	34,0	19,6
27	3,9	350,6	177,3	150,1	84,7
	1,3	324,0	162,7	20,0	12,3
28	12,0	254,1	133,0	141,6	106,5
	6,0	213,0	109,5	127,0	116,0
	10,3	307,0	158,7	171,0	107,8
	9,7	344,0	176,9	222,0	125,5
29	2,7	377,5	190,1	227,4	119,6
	1,8	271,0	136,4	165,0	121,0
	13,0	237,0	125,0	178,0	142,4
30	7,3	424,0	215,7	144,0	66,8
	0,3	239,8	120,0	129,0	107,5
	10,6	193,3	101,9	82,7	81,1

## **Lebenslauf**

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel oder fremde Hilfe angefertigt wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Posterbeiträge und Vorträge

37. Wissenschaftlicher ADKA-Kongress, Mainz

Enzymaktivitätsmessungen bei Morbus Hunter-Patienten unter Idursulfase-Enzymersatztherapie (Elaprase®)

2. LAUD-Forschungstagung, Hamburg

Enzymaktivitätsmessungen bei Morbus Hunter-Patienten unter Idursulfase-Enzymersatztherapie (Elaprase®)

11<sup>th</sup> International Postgraduate Course on Lysosomal Storage Diseases, Nierstein  
Detection of neutralizing antibodies and their impact in Hunter Patients with Elaprase®



## **Danksagung**