

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Christian Weber

**Hemmung der Glykoprotein (GP) VI-vermittelten
Thrombozytenaggregation *versus* primärer Hämostase
durch Ibrutinib und die neuen Btk-Inhibitoren
Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Viola Denzinger

aus Ellwangen

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Siess
Dr. Dr. Sabine Liebscher
Prof. Dr. Klaus Parhofer

Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Janina Jamasbi

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2020

Eidesstattliche Versicherung

Denzinger, Viola

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

**Hemmung der Glykoprotein (GP) VI-vermittelten Thrombozytenaggregation
versus primärer Hämostase durch Ibrutinib und die neuen Btk-Inhibitoren
Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib**

selbstständig verfasst, mich außer den angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15.03.2020

Viola Denzinger

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	Thrombozytenfunktion	3
2.2	Hämostasereaktion	3
2.3	Thrombozytäre Oberflächenrezeptoren	7
2.3.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	7
2.3.2	Glykoprotein Ib	8
2.3.3	Glykoprotein VI	9
2.3.4	Integrine	10
2.4	Bruton Tyrosin Kinase (Btk)	11
2.4.1	Btk-Entdeckung, Struktur, Expression und Aktivierung	11
2.4.2	Bedeutung der Btk für die Thrombozytenfunktion	15
2.5	Irreversible Bruton Tyrosin Kinase Inhibitoren (Btk-Inhibitoren)	18
2.5.1	Ibrutinib – Btk-Inhibitor der ersten Generation	18
2.5.1.1	Ibrutinib: Hemmung der Thrombozytenfunktion und Blutungen unter Therapie von Patienten mit malignen B-Zell Erkrankungen	19
2.5.2	Btk-Inhibitoren der zweiten Generation	22
2.5.2.1	Acalabrutinib (ACP-196)	22
2.5.2.2	ONO/GS-4059 (Tirabrutinib)	24
2.5.2.3	BGB-3111 (Zanabrutinib)	24
2.5.2.4	Evobrutinib (M2951)	25
3	Fragestellung und Ziele der Arbeit	27
4	Materialien	29
4.1	Btk-Inhibitoren	29
4.2	Reagenzien und Chemikalien	29
4.3	Puffer und Lösungen	29
4.4	Stammlösungen	30
4.5	Verbrauchsmaterialien	30
4.6	Geräte und Software	31
5	Methoden	32
5.1	Blutentnahme	32
5.2	Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen	32
5.3	Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen	33
5.3.1	Beschichtung der Deckgläser mit Fibrinogen	33
5.3.2	Vorbereitung der Blutproben für Flusskammerexperimente	33
5.3.3	Durchführung der Flusskammerexperimente	34
5.3.4	Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter arterieller Strömung	35
5.4	Messung der <i>in vitro</i> Verschlusszeit mittels „platelet function analyzer“ PFA-200®	35
5.5	Statistik	36

6 Ergebnisse	37
6.1 Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Ibrutinib und die Btk-Inhibitoren zweiter Generation ACP-196 (Acalabrutinib), ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib nach Stimulation mit niedrigen Kollagenkonzentrationen	37
6.2 Aufhebung der Btk-abhängigen Thrombozytenaggregationshemmung nach Stimulation mit steigenden Kollagenkonzentrationen	43
6.3 Hemmung der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation durch Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib	45
6.4 Flussversuch	47
6.5 Wirkung der Btk-Inhibitoren Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib auf die <i>in vitro</i> Blutungszeit	51
7 Diskussion	54
7.1 Einfluss der Btk-Inhibitoren auf die GPVI- und GPIb- abhängige Thrombozytenaggregation	54
7.2 Einfluss der Btk-Inhibitoren auf die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter arteriellen Flussbedingungen	56
7.3 Einfluss der Btk-Inhibitoren auf die <i>in vitro</i> Blutungszeit	58
8 Zusammenfassung	60
9 Abbildungsverzeichnis	62
10 Literaturverzeichnis	63

1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
Btk	Bruton Tyrosin Kinase
Ca ²⁺	Calcium
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CRP	<i>“collagen-related peptide”</i>
DAG	Diacylglycerid
EC ₅₀	„ <i>effective concentration</i> “= mittlere effektive Konzentration
ECM	Extrazelluläre Matrix
FcRγ	Fc-Rezeptor gamma Kette
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPVI	Glykoprotein VI
GPIb	Glykoprotein Ib
HSA	Humanes Serumalbumin
IC ₅₀	<i>“inhibitory concentration”</i> = mittlere inhibitorische Konzentration
IE	internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IP3	Inositol- 3,4,5-trisphosphat
ITAM	<i>“immunoreceptor tyrosin based activation motif”</i>
kDA	Kilodalton
MCL	Mantelzelllymphom
MEA	<i>“multiple electrode aggregometry”</i> , Impedanzaggregometrie
min	Minute
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
PBS	<i>“phosphate buffered saline”</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PIP2	Phosphatidinosit 4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidinosit 3,4,5-trisphosphat
PI3-Kinase	Phosphoinosit-3-Kinase

PKC	Proteinkinase C
PLC γ 2	Phospholipase C γ 2
SD	" <i>standard deviation</i> ", Standardabweichung
sek	Sekunde
TF	" <i>tissue factor</i> "
TRAP	" <i>thrombin-related peptide</i> "
TxA ₂	Thromboxan A ₂
vWF	von-Willebrand-Faktor
XLA	<i>X-linked Agammaglobulinemia</i> , X-chromosomal rezessive Agammaglobulinämie

2 Einleitung

2.1 Thrombozytenfunktion

Thrombozyten sind kleine (2-3 μ m), kernlose Zellfragmente, die aus Megakaryozyten im Knochenmark entstehen und etwa 10 Tage im Blutkreislauf zirkulieren, bevor sie durch Makrophagen in Leber und Milz abgebaut werden. Zentrale Aufgabe der Thrombozyten ist es, die Integrität der Barriere zwischen intravasalem und interstitiellem Raum aufrechtzuerhalten. Bei Kontakt mit traumatisch verletztem Gefäßendothel werden die Thrombozyten rasch aktiviert, sezernieren ihren granulären Inhalt und interagieren miteinander, um einen hämostatischen Pfropf zu bilden (=Hämostase). Diese thrombozytäre Interaktion ist entscheidend, den Blutverlust nach Gewebetrauma gering zu halten und die Wundheilung einzuleiten. Bei Kontakt von Thrombozyten mit pathologisch verändertem Gefäßendothel und subendothelialer, atherosklerotisch veränderter Intima jedoch, wird dieser physiologische Prozess in einen krankhaften Mechanismus verwandelt, der im Verschluss arterieller Gefäße resultieren kann (=Atherothrombose). Am häufigsten betroffen sind atherosklerotische Gefäße von Herz und Gehirn, mit der Folge von Myokardinfarkt und Schlaganfall.^{1,2}

2.2 Hämostasereaktion

Die Aktivierung von Thrombozyten, gefolgt von Aggregation und Thrombusbildung sind entscheidend, den Blutverlust nach einem Gewebetrauma gering zu halten.

Die Freilegung der extrazellulären Matrix (ECM) nach Schädigung des Gefäßendothels, welches insbesondere aus Kollagenfasern vom Typ I und III besteht,³ ermöglicht anhaltende Interaktionen zwischen thrombozytären Oberflächenrezeptoren und Komponenten der extrazellulären Matrix, was letztlich zur Aktivierung, Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten führt.

Die Thrombozytenadhäsion an Kollagen ist ein komplexer Prozess und erfordert das Zusammenspiel zahlreicher Thrombozyten-Agonisten, welche über verschiedene thrombozytäre Oberflächenrezeptoren, darunter Integrine, Immunglobulin (Ig)-Rezeptoren sowie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), agieren.²

Die initiale Adhäsion von Thrombozyten an die geschädigte Gefäßwand unter arterieller Blutströmung wird vermittelt durch die Interaktion zwischen dem thrombozytären Glykoprotein GP Ib-V-IX-Komplex und von-Willebrand-Faktor (vWF).⁴⁻⁶

vWF ist ein multimeres Glykoprotein, welches zum einen in Endothelzellen und α -Granula der Thrombozyten gespeichert wird, zum anderen findet sich vWF in großer Menge als zirkulierender Bestandteil im Blutplasma. Die Immobilisation von vWF durch Bindung an Matrixproteine der ECM führt zur Verlangsamung vorbeiströmender Thrombozyten und transienten Thrombozytenadhäsion durch Interaktion mit GPIb.⁷ Bedingt durch eine hohe *off*-Rate ist die Bindung zwischen von vWF und dem GP Ib-V-IX-Komplex rasch reversibel und deshalb nicht ausreichend für eine stabile Thrombozytenadhäsion an Kollagen. Die Umwandlung in einen stabilen Thrombus erfordert zusätzlichen Kontakt zwischen thrombozytären Oberflächenrezeptoren und der ECM, vor allem mit Kollagen.^{4,8,9}

Zu den wichtigsten Thrombozyten-aktivierenden Kollagenrezeptoren zählt das Glykoprotein VI (GPVI). Durch Generierung intrazellulärer Signale fungiert GPVI als signalweiterleitender Rezeptor im Prozess der thrombozytären Aktivierung, welche Voraussetzung für die Thrombozytenadhäsion an Kollagen ist.

Die scherresistente Thrombozyten-Anheftung an Kollagen wird vermittelt über die Integrine $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha IIb\beta 3$. Das Integrin $\alpha 2\beta 1$ fungiert als Adhäsions-Rezeptor der Thrombozyten durch direkte Bindung an Kollagen.^{10,11}

In Folge der Thrombozytenaktivierung durch GPIb, GPVI sowie durch die Wirkung sekundärer Mediatoren gelangen diese Integrine von einem Zustand niedriger Ligandenaffinität in einen Zustand höherer Affinität. Dieser Prozess wird als „*inside-out*“ *Signaling* bezeichnet und ermöglicht den Integrinen eine wirksame Ligandenbindung, wodurch die Adhäsivität der Thrombozyten nochmals verstärkt wird. Integrin $\alpha IIb\beta 3$ vermittelt durch Bindung über vWF an verletztes Gefäßendothel eine stabile Thrombozytenadhäsion, über Bindung des Glykoprotein Fibrinogen eine Vernetzung der Thrombozyten untereinander und gewährleistet somit die Thrombozytenaggregation und zusammen mit der anschließenden Fibrinbildung Thrombuswachstum und -stabilität.¹²

Die Thrombusstabilität und Verankerung an die geschädigte Gefäßwand erfolgt über die Wirkung von Fibrin, das über Thrombin aus Fibrinogen gebildet wird.^{8,9,12}

Neben der Aktivierung der Integrine führt die Stimulation des thrombozytären GPVI zur Konformationsänderung der Thrombozyten („*shape change*“) sowie zur Exozytose von in Thrombozyten gespeicherten Granula. Die Sekretion von adhäsiven Proteinen, wie von-Willebrand-Faktor (vWF) und Fibrinogen aus α -Granula sowie sekundären Mediatoren (ADP) aus elektronendichten Granula, bedingt, neben der Produktion und Freisetzung von Thromboxan A₂, die Aktivierung weiterer Thrombozyten.^{2,13,14}

Wesentliche Aufgabe der sekundären Mediatoren, darunter ADP, Thromboxan A₂ und Thrombin, ist eine Verstärkung der Thrombozytenaktivierung.

Diese wirken als positive Feedback-Mediatoren über die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) und bewirken eine verstärkte Aktivität der Integrine sowie der GPVI-abhängigen Signalübertragung und unterstützen so die Thrombozytenadhäsion und Rekrutierung weiterer Thrombozyten in den wachsenden Thrombus.^{2,5,14,15}

Thrombozytenrekrutierung und -aggregation

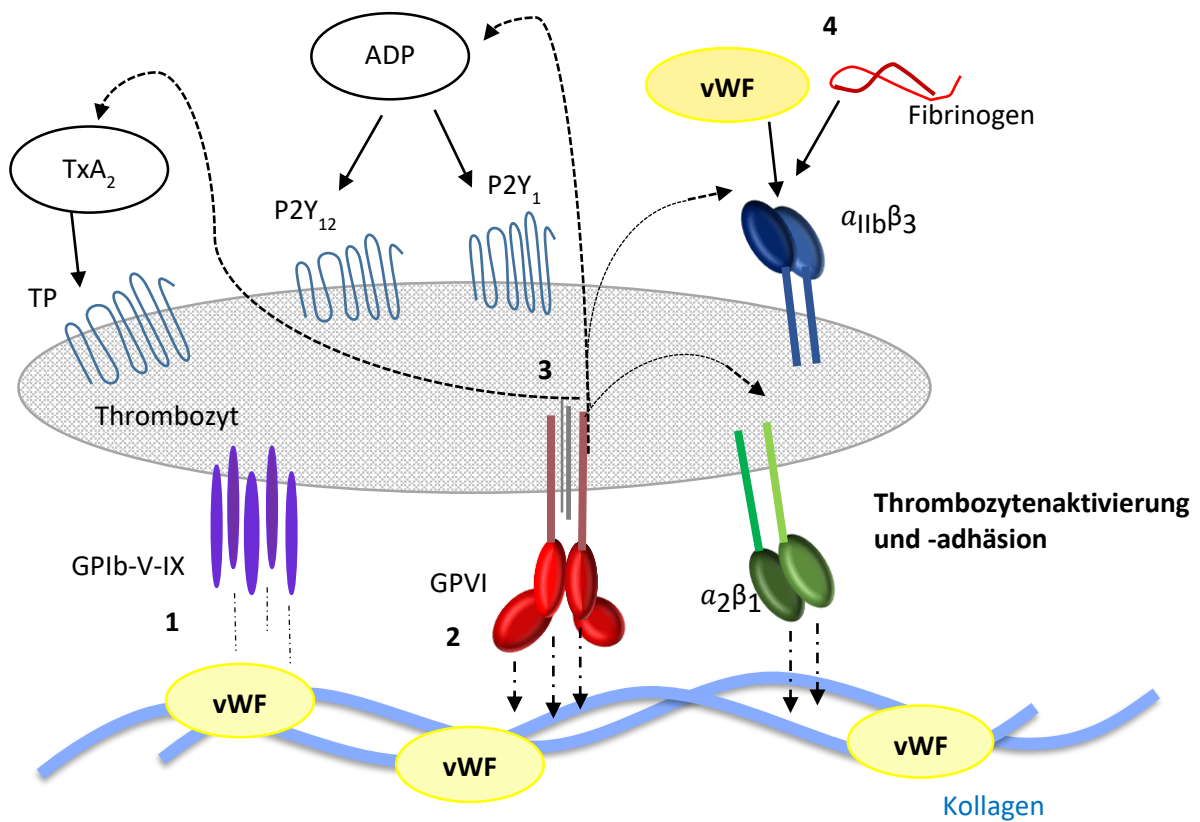


Abbildung 1 : Mechanismus der Thrombozytenadhäsion an subendotheliales Kollagen nach Gefäßverletzung und nachfolgende Thrombozytenaggregation (verändert nach „Ruggeri, Platelets in atherothrombosis, Nat. Med, 2002“)

(1) Die initiale Thrombozytenadhäsion wird vermittelt über die Interaktion zwischen GPIb und vWF. (2) Die nachfolgende Interaktion zwischen GPVI und Kollagen induziert die weitere zelluläre Aktivierung, gefolgt von einer (3) Konformationsänderung der Integrine in einen Zustand hoher Ligandenaffinität und der Freisetzung sekundärer Mediatoren, vor allem ADP und Thromboxan A₂.

Die feste Thrombozytenadhäsion an Kollagen durch aktiviertes Integrin α₂β₁ (direkt) und α_{IIb}β₃ (indirekt über vWF) resultiert in einer Verstärkung der GPVI-abhängigen Signalkaskade, vermehrter Freisetzung sekundärer Mediatoren sowie in einem Zustand prokoagulatorischer Aktivität der Thrombozytenoberfläche. (4) Die Bindung von Fibrinogen an hochaffines Integrin α_{IIb}β₃ führt durch Vernetzung benachbarter Thrombozyten zum Wachstum des Thrombozytenaggregats. Freigesetztes ADP und Thromboxan A₂ verstärken die Aktivierung der Integrine und somit das Thrombuswachstum durch Aktivierung zusätzlicher Thrombozyten. vWF= von Willebrand Faktor, GPIb= Glykoprotein Ib, GPVI= Glykoprotein VI; ADP= Adenosindiphosphat, TxA₂= Thromboxan A₂, TP= Thromboxanrezeptor, P2Y₁₂/P2Y₁= ADP-Rezeptor.

2.3 Thrombozytäre Oberflächenrezeptoren

2.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die meisten löslichen Thrombozyten-Agonisten, darunter Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan A₂ (TxA₂) und Thrombin, wirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). ADP wird aus geschädigten Gefäßendothelzellen sowie aktivierten Thrombozyten freigesetzt und vermittelt über die Bindung an die beiden thrombozytären ADP-Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ eine Verstärkung der Thrombozytenaktivierung sowie eine Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität der Thrombozytenmembran. Durch räumliche Veränderung der gerinnungsaktiven Phospholipide der Plättchenmembran wird die Bindung von im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktoren an die Thrombozytenoberfläche ermöglicht.

P2Y₁ ist verantwortlich für die ADP-induzierte Calcium-Freisetzung, welche für den thrombozytären „*shape change*“ und die Thrombozytenaggregation erforderlich ist.¹⁵

Der P2Y₁₂-Rezeptor ist pharmakologischer Angriffspunkt der Thienopyridine, wie beispielweise Clopidogrel, welche klinisch als Thrombozytenaggregationshemmer zur sekundären Prävention kardiovaskulärer Ereignisse eingesetzt werden.¹⁵⁻¹⁷

Neben ADP fungiert Thromboxan A₂ (TxA₂) als weiterer positiver *Feedback*-Mediator im Prozess der Thrombozytenaktivierung. TxA₂ wird von Thrombozyten mithilfe der Cyclooxygenase 1 aus Arachidonsäure gebildet. Durch Wirkung über die thrombozytären Thromboxanrezeptoren TP_α und TP_β führt freigesetztes Thromboxan A₂ zur Aktivierung weiterer Thrombozyten und unterstützt so die Thrombozytenaggregation und -sekretion.

Thrombin gilt als effektivster Aktivator der Thrombozyten und ist durch Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin verantwortlich für die Stabilisierung des thrombozytenreichen Thrombus. Geringe Mengen Thrombin werden bei Kontakt mit „*tissue factor*“ TF und dem im Plasma zirkulierenden Gerinnungsfaktor VIIa gebildet. Das auf diesem Wege entstehende Thrombin ist jedoch nicht ausreichend für die eigentliche Fibrinbildung, aktiviert aber die zusätzliche Bildung von Thrombin auf der Thrombozytenoberfläche, was eine rasche Zunahme der Thrombinproduktion zur Folge hat.

Im Zentrum der Thrombozytenstimulation via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren steht die Aktivierung der Phospholipase C_β, welche durch Bildung der *second messenger*

Inositrtrisphosphat (IP3) sowie Diacylglycerid (DAG) die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und die Freisetzung von intrazellulärem Calcium bewirkt. Folge ist die Thrombozytenadhäsion, Integrin α IIb β 3-vermittelte Thrombozytenaggregation, Degranulation sowie Schaffung eines Zustands prokoagulatorischer Aktivität.^{2,15}

2.3.2 Glykoprotein Ib

Das Glykoprotein GPIb ist Bestandteil des thrombozytären GP Ib-IX-V Rezeptorkomplex, welcher zu einem der wichtigsten Adhäsionsrezeptoren zirkulierender Thrombozyten zählt. GP Ib-IX-V besteht aus vier verschiedenen glykosylierten Polypeptiden - GPIb α , GPIb β , GPIX und GPV. Wichtiger Ligand des thrombozytären Rezeptorkomplex ist vWF, der über GPIb α gebunden wird.^{18,19}

Wesentliche Aufgabe des thrombozytären GPIb ist die initiale Thrombozytenadhäsion an vWF. Die Rolle der GP Ib/vWF-Interaktion für die Thrombozytenaktivierung ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn durch veränderte hämodynamische Bedingungen erhöhte Blutströmungsgeschwindigkeiten entstehen, was vornehmlich in atherosklerotisch okkludierten Arterien auftritt.^{4,13} vWF ist ein multimeres Glykoprotein, bestehend aus über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten, welche Bindungsstellen für interagierende Partner enthalten. Die Multimere des vWF besitzen eine globuläre Struktur, bei welcher die funktionellen Bindungsstellen im Inneren verdeckt sind. Erst durch scherkraftinduzierte Konformationsänderung des vWF werden die Bindungsstellen exponiert und begünstigen Interaktionen mit der Gefäßwand, insbesondere Kollagen und thrombozytären GPIb. GPIb α bindet die A1 Domäne des, durch Bindung an subendotheliales Kollagen immobilisierten, vWF. Die Bindung von vWF an Kollagen verletzter Blutgefäße wird vermittelt über dessen A1 und A3 Domäne.²⁰ Die Bindung zwischen GPIb und vWF ist jedoch wenig stabil und dient insbesondere der Verlangsamung und Adhäsion vorbeiströmender Thrombozyten.⁶ Über die Bindung von vWF an GPIb werden ähnlich wie nach GPVI-Aktivierung (s.u.) die Tyrosin-Kinasen Lyn und Syk aktiviert,²¹ welche die Bildung eines Signalkomplex aus Adapterproteinen und Enzymen, darunter Btk und Phospholipase C γ 2, initiieren.

Btk wird dabei durch die Kinasen Syk und Lyn phosphoryliert, dann autophosphoryliert und bedingt die Phosphorylierung und Aktivierung der PLC γ 2.^{22,23}

Die GPIb/vWF-Interaktion wird derzeit als pharmakologischer Angriffspunkt zur Prävention und Behandlung des akuten ischämischen Schlaganfalls untersucht. Durch Applikation von GPIb α Fab-Antikörpern sowie defizientem vWF konnte im Mausmodell die Schwere des akuten ischämischen Schlaganfalls reduziert, eine sekundäre Zunahme des Infarktareals verhindert und der neurologische Zustand verbessert werden. Trotz Hemmung der für die initiale Thrombozytenaktivierung essentiellen GPIb/vWF-Interaktion konnten keine begleitenden Blutungskomplikationen beobachtet werden.^{24,25}

2.3.3 Glykoprotein VI

Glykoprotein VI (GPVI) ist einer der beiden Kollagenrezeptoren der Thrombozyten. Er vermittelt deren Aktivierung, Aggregation, Degranulation und Gerinnungsaktivität.¹⁴ GPVI (62kDa) zählt zu den Typ I Transmembranrezeptoren der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie und wird ausschließlich auf der Oberfläche von Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert. GPVI besteht aus zwei extrazellulären Ig-Domänen, einem mucinreichen Stiel sowie einer zytosolischen Sequenz, bestehend aus 51 Aminosäuren. Der transmembranäre Teil von GPVI ist nicht-kovalent über eine Salzbrücke mit einem Homodimer von zwei Fc-Rezeptor- γ (FcR γ) Ketten verbunden, welche kovalent über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die Assoziation von GPVI mit FcR γ ist von essentieller Bedeutung für die Expression von GPVI auf der Oberfläche der Thrombozyten und für dessen Signalübertragung.²⁶ Jede der beiden FcR γ -Ketten enthält jeweils ein ITAM („*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*“) als signalübertragende Untereinheit.²⁷ Der zytosolische Teil des GPVI-Rezeptors enthält eine prolinreiche Sequenz, welche spezifisch an die SH3-Domäne der Src Kinasen Lyn und Fyn bindet.²⁸ *Crosslinking* des GPVI-Rezeptors durch Ligandenbindung ermöglicht den Src Kinasen zwei Tyrosinreste der ITAM-Untereinheit zu phosphorylieren. Nach Phosphorylierung der ITAM-Sequenz bindet Syk eine weitere Protein-Tyrosin-Kinase, mit seinen tandem SH2 Domänen, an das phosphorylierte ITAM und wird durch die Src Kinasen phosphoryliert und autophosphoryliert. Aktiviertes Syk initiiert dann eine Signalkaskade und zusammen mit Lyn und Fyn die Bildung eines Signalosoms. Wesentliche Bestandteile des Signalosoms sind die Adapterproteine SLP-76 und LAT sowie einige weitere

Signalenzyme, darunter die PI3-Kinase, die Kinasen Btk und Tec sowie Proteinkinase C (PKC). Gemeinsam regulieren diese das wesentliche Effektorenzym der GPVI-abhängigen Signalkaskade, die PLC γ 2, welche, wie oben beschrieben, zur Bildung der *second messenger* Diacylglycerid (DAG) sowie Inositoltrisphosphat (IP3) und zur Thrombozytenaggregation und -sekretion führt.^{8,14,26}

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch direkte GPVI-Antagonisten (GPVI-Antikörper, rekombinantes GPVI-Fc) die atherosklerotische Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation, welche wesentliche Ursache für Herzinfarkt und Schlaganfall ist, gehemmt werden kann ohne dabei die physiologische Hämostase zu beeinflussen. Wesentliche thrombogene Plaquekomponenten sind Kollagenfasern vom Typ I und III, welche unter statischen Bedingungen und unter arterieller Strömung die Thrombozyten über die Aktivierung von GPVI und nicht das Integrin α 2 β 1 (zweiter Kollagenrezeptor) aktivieren.²⁹⁻³³ Die zentrale Rolle des GPVI innerhalb der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation macht diesen zu einem möglichen therapeutischen Angriffspunkt für die selektive Hemmung der Atherothrombose.

2.3.4 Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembranäre Proteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Von den auf Thrombozyten exprimierten Integrin-Rezeptoren sind zwei entscheidend für die Thrombozytenaktivierung und -adhäsion: das Integrin α 2 β 1 und das Integrin α IIb β 3. Die Aktivität der Integrine wird reguliert durch Thrombozyten-Agonisten, die die Affinität der Integrine zu adhäsiven Liganden durch sogenanntes „*inside-out*“ *Signaling* verstärken. Im Gegenzug triggert die Ligandenbindung und Komplexbildung „*outside-in*“ Signale, die Signalkaskaden während Thrombozytenaktivierung und -aggregation verstärken.¹²

Integrin α 2 β 1, auch bekannt als GPIa/IIb, zählt neben GPVI zu den thrombozytären Kollagenrezeptoren und fungiert hauptsächlich als Adhäsionsrezeptor.^{10,11} Die Bindung von α 2 β 1 an Kollagen bewirkt indirekt durch Verstärkung der GPVI-abhängigen Signalkaskade sowie direkt durch Initiierung intrazellulärer Signale eine zelluläre Aktivierung. Letzteres „*outside-in*“-*Signaling* beinhaltet, ähnlich der GPVI-

abhängigen Signalübertragung, die Effektorproteine Src, Syk und PLC γ 2.^{14,34} Somit teilen die beiden Kollagenrezeptoren GPVI und α 2 β 1 trotz unterschiedlicher Struktur wichtige Effektorproteine und bewirken eine wechselseitige Signalverstärkung.

Integrin α IIb β 3, auch bekannt als GPIIb/IIIa, ist mit einer Expression von 50.000-70.000 Molekülen pro Zelle das bedeutendste Integrin auf der Thrombozytenoberfläche. Integrin α IIb β 3 vermittelt durch die Bindung an Kollagen-gebundenem vWF sowie durch Bindung an Fibrinogen, vor allem unter arterieller Blutströmung eine stabile Thrombozytenadhäsion und -aggregation.^{13,14,}

Die Bindung von Fibrinogen an Integrin α IIb β 3 induziert „*outside-in*“ Signale, welche über eine Aktivierung von Src-Kinasen³⁵, Syk, und PI3-Kinase, auch Btk stimulieren, was letztendlich zur Phosphorylierung und Aktivierung der PLC γ 2 führt.^{8,12,26}

2.4 Bruton Tyrosin Kinase (Btk)

2.4.1 Btk-Entdeckung, Struktur, Expression und Aktivierung

Btk wird kodiert durch das XLA-Gen, ein 37kb großes DNA-Fragment auf Chromosom Xq22^{36,37} und findet sich in Zellen hämatopoetischer Abstammung, darunter B-Zellen, Monozyten, Neutrophile, natürliche Killerzellen und Thrombozyten. Btk spielt eine unerlässliche Rolle innerhalb der B-Zell-Lymphopoese. Durch Aktivierung von positiven Zellzyklusregulatoren und Differenzierungsfaktoren reguliert Btk die Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen und kontrolliert Proliferation und Überleben durch Regulation von pro- und antiapoptotischen Proteinen.³⁸⁻⁴²

Die Rolle der Bruton Tyrosin Kinase (Btk) gewann erstmals an Bedeutung, als die Ursache der X-chromosomal-rezessiv vererbten Agammaglobulinämie (XLA) mit einer Mutation der Tec Kinase Btk, auch bekannt als ATK (Agammaglobulinämie Tyrosinkinase) oder BPK (B-Zell-Progenitorkinase) in Verbindung gebracht wurde.^{43,44}

Die Entdeckung der Agammaglobulinämie geht zurück auf Ogden C. Bruton 1952, der als Ursache für die Immundefizienz eines Jungen mittels Elektrophorese einen Mangel an Gammaglobulin als zugrundeliegenden Krankheitsmechanismus identifizierte.⁴⁵

XLA verursacht durch mangelnde Expression von Btk oder durch funktionell defekte Btk, welche eine entscheidende Rolle im B-Zell-Rezeptor-Signalweg einnimmt, eine

unzureichende B-Zellreifung mit niedrigem Anteil zirkulierender B-Lymphozyten sowie niedrige Immunglobulin-Spiegel.⁴⁶⁻⁴⁸

Btk (76 kDa) zählt zur Familie der Tec Kinasen, welche aus den weiteren Mitgliedern Tec, Itk, Bmx und Txk/Rlk besteht. Die Familie der Tec Kinasen gehört, neben Syk und Src, der Gruppe der zytosolischen Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen an, welche eine entscheidende Rolle u.a. im Signalweg ITAM-abhängiger Rezeptoren einnehmen. Btk besteht aus einer N-terminalen Pleckstrin-homologen Domäne (PH), gefolgt von prolin- und cysteinreichen Regionen, welche zusammen als Tec-homologe (TH) Domäne bezeichnet werden, den Src-homologen Domänen SH3 und SH2 sowie der katalytischen C-terminalen Domäne (SH1). Die initiale Aktivierung der Btk erfolgt innerhalb der katalytischen SH1-Domäne, welche den Tyrosinrest 551 (Y551) enthält. Die weitere Aktivierung findet innerhalb der SH3-Domäne statt, in welcher die Autophosphorylierungsstelle Y223 lokalisiert ist.^{49,28,50}

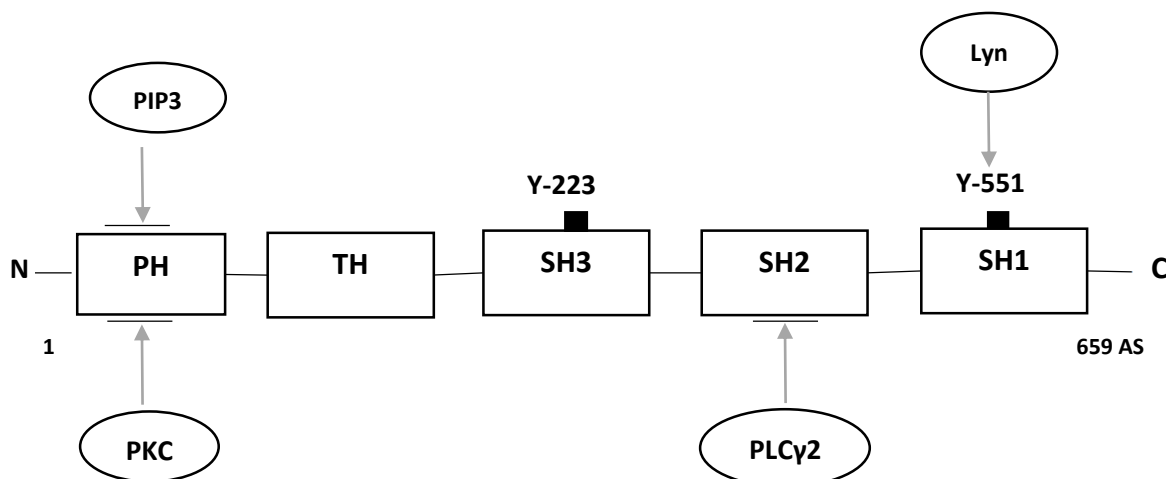


Abbildung 2: Bruton Tyrosin Kinase (Btk)- Struktur und interagierende Partner (verändert nach Mohamed et al. „Bruton’s tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain“, Immunol Rev., 2009)

Btk (76kDa) besteht aus 659 Aminosäuren und gehört zur Familie der Tec Kinasen. Btk besteht aus fünf verschiedenen Regionen: einer Pleckstrin-homologen Domäne (PH), einer Tec-homologen Domäne (TH), Src-homologen Domänen (SH3, SH2) sowie einer Kinase-Domäne (SH1). Btk verfügt über zwei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen – Y551 innerhalb der SH1-Domäne sowie Y223 innerhalb der SH3-Domäne. Zu den wichtigsten mit Btk interagierenden Partnern zählen die Kinase Lyn, PIP3 =Phosphoinosit- 3,4,5-trisphosphat, PKC= Proteinkinase C sowie PLC γ 2 = Phospholipase C γ 2.

Im physiologischen Gleichgewichtszustand unstimulierter Zellen ist Btk vorwiegend zytosolisch lokalisiert, unphosphoryliert und katalytisch inaktiv. Die Btk-Aktivierung ist ein komplexer Prozess, der vor allem in B-Lymphozyten untersucht wurde (Abb. 3) und in Thrombozyten nach GPVI-Aktivierung ähnlich abläuft. Die Translokation der Btk an die Plasmamembran^{51,52} ist wesentliche Voraussetzung für die Phosphorylierung und Aktivierung der Kinase. Die Aktivierung des B-Zell-Rezeptors nach Antigenbindung führt zur Rekrutierung und Aktivierung der Phosphatidinosit 3-Kinase (PI3-Kinase), welche membrangebundenes Phosphatidinosit 4,5-bisphosphat (PIP2) in Phosphatidinosit 3,4,5-trisphosphat (PIP3) umwandelt (Abb. 3). Durch Interaktion der N-terminalen PH-Domäne mit PIP3 wird die zytosolisch gelegene Btk an die zelluläre Plasmamembran transloziert.^{53,54} Dort wird sodann die membranassoziierte Btk durch die Src Kinase Lyn am Tyrosinrest 551 (Y551) phosphoryliert, was in einer Verstärkung der katalytischen Aktivität der Btk resultiert (Abb. 2, Abb. 3).⁵⁴⁻⁵⁶ Nachfolgende Btk-Autophosphorylierung am Tyrosinrest 223 (Y223) innerhalb der SH3-Domäne führt zur Stabilisierung der aktiven Form und vollständigen Aktivierung der Btk (Abb. 2, Abb. 3). Die Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste Y551 sowie Y221 ist essentiell für die vollständige Aktivierung und katalytische Aktivität der Btk.⁵⁶ Aktivierte Btk führt durch direkte Interaktion der SH2-Domäne mit PLC γ 2⁵⁰ zur Phosphorylierung und Aktivierung der PLC γ 2 (Abb. 2, Abb. 3) mit nachfolgender Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und Freisetzung von intrazellulärem Calcium.

50,57-59

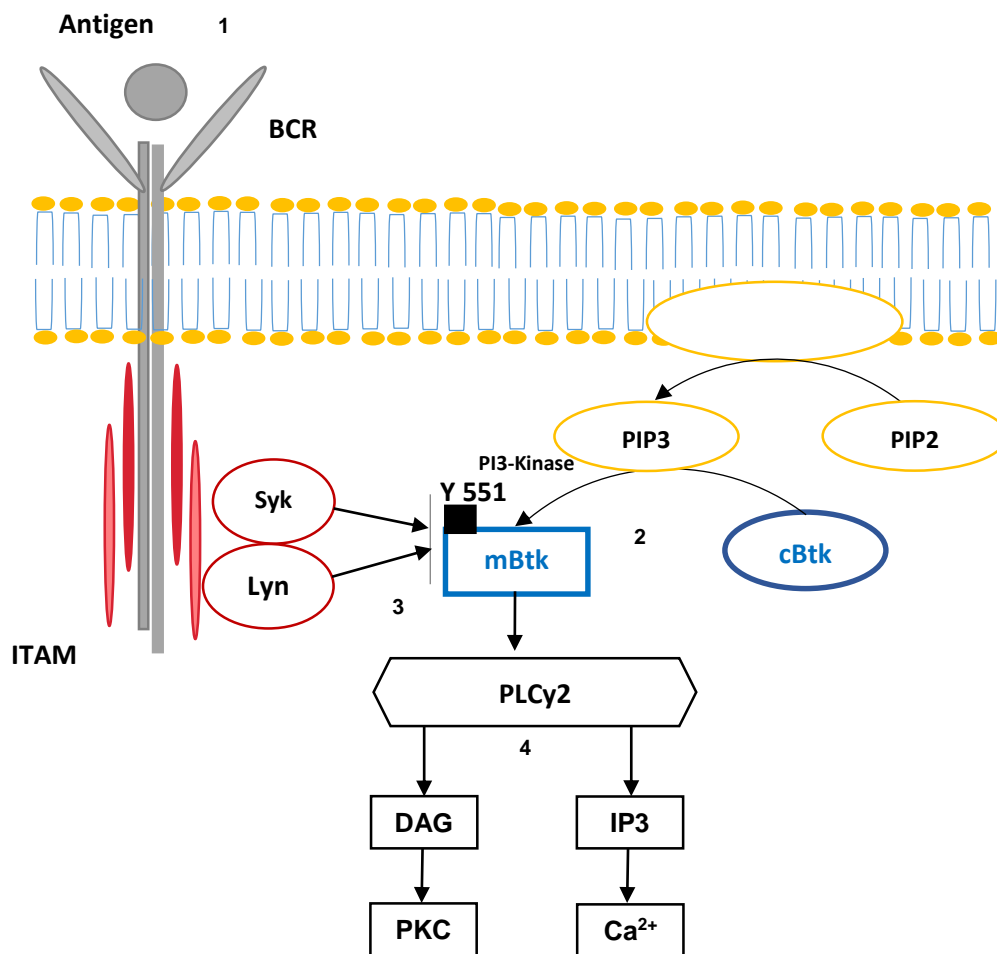


Abbildung 3: Btk-Signaltransduktion (verändert nach Akinleye et al. „Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development“, Journal of Hematology&Oncology 2013)

(1) Aktivierung des B-Zell-Rezeptors nach Antigenbindung führt durch (2) Interaktion der zytosolisch gelegenen Btk mit PIP3 zur Translokation der Btk zur Plasmamembran. (3) Phosphorylierung der Btk durch die Src Kinase Lyn, gefolgt von der Btk-Autophosphorylierung resultiert in einer vollständigen Aktivierung der Btk. (4) Aktivierte Btk triggert die Aktivierung der PLCγ2, welche unter Bildung der *second messenger* DAG und IP3 zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium führt.

BCR= B-Zell-Rezeptor, ITAM = "*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*", cBtk= zytosolische Btk, mBtk= membranassoziierte Btk, PIP3 = Phosphatidinosit 3,4,5-trisphosphat; PLCγ2 = Phospholipase Cγ2; DAG = Diacylglycerid; IP3 = Inosit- 3,4,5-trisphosphat.

2.4.2 Bedeutung der Btk für die Thrombozytenfunktion

Die Ähnlichkeit der GPVI-abhängigen Thrombozytenaktivierung mit der Signalkaskade des B-Zell-Antigen-Rezeptors und die Bedeutung der PLC γ 2, als zentrales Effektorenzym Thrombozyten-aktivierender Signalwege, legt einen ähnlichen Aktivierungsweg und eine ähnliche Funktion für Btk in Thrombozyten nahe.

Mittels Immunoblotting bestätigten Futatani et al die Expression von Btk in Thrombozyten, deren Expressionslevel nahezu dem Level in B-Zellen und Monozyten entspricht. Ein Vergleich der Thrombozytenzahl gesunder Kontrollen mit der von XLA-Patienten ergab keine Unterschiede, was schließen lässt, dass die Abwesenheit von funktionierender Btk die Produktion von Thrombozyten aus Megakaryozyten sowie das Überleben der Thrombozyten nicht nachteilig beeinflusst.^{60,61}

Die funktionelle Rolle der Btk innerhalb thrombozytärer Signalkaskaden wurde durch Untersuchungen an Thrombozyten von XLA-Patienten nachgewiesen.⁶² Btk-defiziente Thrombozyten zeigten in *vitro* nach Stimulation mit Kollagen bzw. „*collagen-related peptide*“ (CRP), einem GPVI-Rezeptor-Agonist, eine signifikant verminderte Thrombozytenaggregation, Degranulation sowie Freisetzung von intrazellulärem Calcium, was zurückzuführen war auf eine verminderte Phosphorylierung der PLC γ 2. Während eine Hemmung der Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit niedrigen CRP-Konzentrationen (1-5 μ g/ml) beobachtet werden konnte, zeigte sich die Aggregation Btk-defizienter Thrombozyten nach Stimulation durch höhere CRP-Konzentrationen (>5 μ g/ml) nicht gehemmt. Auch nach Stimulation mit submaximalen Kollagenkonzentrationen (0,25-2 μ g/ml) konnte eine deutlich reduzierte Thrombozytenaggregation der Btk-defizienten Thrombozyten beobachtet werden. Insgesamt war die Reduktion der Thrombozytenaggregation der Btk-defizienten Thrombozyten nach Stimulation mit Kollagen weniger stark ausgeprägt als nach Stimulation mit CRP. Dies liegt möglicherweise daran, dass Kollagen im Gegensatz zu CRP neben GPVI zusätzlich Integrin α 2 β 1 bindet. Die Thrombozytenaktivierung durch Thrombin, welches G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert, hingegen zeigte sich unbeeinflusst.⁶²

Tec ist eine weitere Tyrosinkinase der Tec-Familie, welche ebenfalls in Thrombozyten exprimiert wird und möglicherweise einen Mangel an Btk in Thrombozyten kompensieren kann.⁶³ Die Phosphorylierung und Aktivierung von Tec wird wie bei Btk

nach GPVI Aktivierung beobachtet, wobei die Phosphorylierungskinetik von Tec der von Btk entsprach. Die Tec-Aktivierung fand auch statt in XLA Thrombozyten, was zeigt, dass Tec unabhängig von Btk aktiviert werden kann und vermuten lässt, dass außer Btk auch Tec für die Antworten GPVI-aktivierter Thrombozyten wichtig ist.⁶³

Das Fehlen einer Blutungsdiathese bei XLA-Patienten ist daher möglicherweise auf die Expression von Tec zurückzuführen. Es konnte in der Tat an Btk^{-}/Tec^{-} defizienten Mäusen nachgewiesen werden, dass Tec die Abwesenheit von Btk nach GPVI-Aktivierung zumindest teilweise kompensiert. Im Gegensatz zur geringen Reduktion der Aggregation defizienter Btk (Btk^{-}) Thrombozyten, stimuliert mit hohen Kollagenkonzentrationen, zeigten Thrombozyten von Btk^{-}/Tec^{-} defizienten Mäusen eine stark verminderte Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit hohen Kollagenkonzentrationen und keine Aggregation nach CRP-Stimulation. Weiterhin wurde in Mäusen mit Btk^{-} eine um mehr als die Hälfte verminderte Phosphorylierung der $PLC\gamma 2$ nach Stimulation mit Kollagen nachgewiesen, wohingegen sich nur eine geringe Minderung in Tec^{-} Mäusen zeigte. Die größte Minderung der $PLC\gamma 2$ -Phosphorylierung zeigte sich bei Btk^{-}/Tec^{-} defizienten Thrombozyten nach Stimulation mit CRP.⁴⁰

Diese Beobachtungen zeigen, dass Btk durch Regulation der Phosphorylierung und Aktivierung der $PLC\gamma 2$ nur nach geringgradiger GPVI-Stimulation essentiell für die Thrombozyten-Aktivierung ist. Die zusätzliche Reduzierung der $PLC\gamma 2$ -Aktivierung bei Abwesenheit von sowohl Btk, als auch Tec, legt eine kompensatorische Rolle der Kinase Tec für die Regulation der $PLC\gamma 2$ in Abwesenheit von Btk nahe. Tec kann zwar zu einem begrenzten Ausmaß defiziente Btk kompensieren, nimmt jedoch insgesamt nur eine untergeordnete, minimale Rolle für die Regulation der thrombozytären $PLC\gamma 2$ ein.⁴⁰

Der Nachweis einer ausbleibenden Tyrosin-Phosphorylierung der Btk nach Stimulation mit Thrombin, im Vergleich zur starken Phosphorylierung und Aktivierung nach Stimulation mit Kollagen, deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von Btk in Thrombozyten durch Rezeptoren verursacht wird, die über eine ITAM-Untereinheit reguliert werden, weniger durch Thrombozyten-Agonisten, die über andere Signalwege auf Thrombozyten einwirken.^{40,62,63}

Liu et al zeigten durch Untersuchungen an Mäusen, dass Btk essentiell für die vWF-vermittelte Aggregation nach Botrocetin-Stimulation in statischen Experimenten und

die GP Ib-V-IX/vWF vermittelte Bildung stabiler Thrombi *in vivo* erforderlich ist. Die Bindung von vWF an GP Ib-V-IX-Komplex führte zur Btk-Phosphorylierung, Aktivierung des Integrin α IIb β 3, gefolgt von Thrombozytenaggregation sowie Produktion von TxA₂. Dabei war die TxA₂-Produktion abhängig von der vWF/GP Ib-V-IX-V-Interaktion und der nachfolgenden Integrin α IIb β 3-Aktivierung. Die Stimulation Btk-defizienter Thrombozyten von Mäusen mit vWF führte weder zur Thrombozytenaggregation, noch zu einer messbaren TxA₂-Produktion. Die Signalkaskade, die zur Btk Aktivierung führte, war ähnlich wie nach GPVI-Aktivierung. Sie wurde initiiert durch die Kinase Lyn und ist abhängig von Syk und PI3-Kinase Aktivierung. Btk Aktivierung führte dann zu PLC γ 2- sowie Proteinkinase C-Aktivierung.^{23,64}

Im Kontrast zum GPVI-vermittelten Signalweg gibt es keine Ergebnisse für eine Beteiligung der Kinase Tec innerhalb der GPIb-abhängigen Signalkaskade. Die Signalantwort Btk-defizienter Thrombozyten auf eine induzierte vaskuläre Endothelschädigung im Mausmodell *in vivo* resultierte in der Bildung instabiler Thrombi, welche die Autoren auf eine mangelnde GPIb/vWF-Interaktion zurückführten.²³

Essentiell für die Btk/Tec-Phosphorylierung in Thrombozyten und für die Thrombozytenaggregation nach Kollagenstimulation ist auch die PI3-Kinase-abhängige Signalkaskade, was durch Untersuchungen mit PI3-Kinase-Hemmern belegt wurde. Unterschiedliche PI3-Kinase-Hemmer hemmten *in vitro* die Kollagen-induzierte Btk-Phosphorylierung. Der Mechanismus wurde in Kapitel 2.4.1 ausgeführt.⁶³

Ergebnisse von Laffargue et al zeigten, dass die Aktivierung und Phosphorylierung der Btk wesentlich von der Integrin α IIb β 3-vermittelten Thrombozytenaggregation sowie der PI3-Kinase abhängig ist. So resultiert die Suppression der Thrombin-stimulierten Thrombozytenaggregation durch Hemmung der Fibrinogenbindung an Integrin α IIb β 3 in einer Verminderung der Btk-Phosphorylierung. Nach Einsatz von Wortmannin, einem PI3-Kinase-Hemmer, blieb die Translokation von Btk zur Plasmamembran und deren nachfolgende Phosphorylierung aus. Btk könnte somit nicht nur relevant für die Thrombozytenadhäsion- und aktivierung, vermittelt durch Exposition extrazellulärer Matrixkomponenten via GPVI und GPIb/vWF, sein, sondern auch bei der Thrombozytenaggregation und der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen, welche abhängig von Integrin α IIb β 3 ist, eine Rolle zu spielen.⁶⁵

2.5 Irreversible Bruton Tyrosin Kinase Inhibitoren (Btk-Inhibitoren)

Die Btk-Aktivierung nach B-Zell-Rezeptorstimulation reguliert Proliferation, Differenzierung und Zellmigration und ist essentiell für die Regulation der B-Zell-Entwicklung.^{66,67} Eine dysregulierte Btk-Aktivität stellt die Ursache für die Entstehung und Aufrechterhaltung von B-Zell-lymphoproliferativen Erkrankungen⁶⁸⁻⁷⁰ sowie Autoimmunerkrankungen⁷¹ dar. Die pharmakologische Hemmung der Btk durch Entwicklung irreversibler Inhibitoren hat sich als erfolgreiche therapeutische Strategie zur Behandlung B-Zell-abhängiger Malignitäten erwiesen.⁷²

Alle hier untersuchten Btk-Inhibitoren gehören zu den irreversiblen Btk-Inhibitoren, welche über die kovalente Bindung an Cys-481 innerhalb der Kinasedomäne von Btk irreversibel dessen enzymatische Aktivität hemmen.

2.5.1 Ibrutinib – Btk-Inhibitor der ersten Generation

Ibrutinib (PCI-32765) ist der erste oral verfügbare, selektive, irreversible Btk-Inhibitor, der erfolgreich in der Therapie B-Zell-abhängiger maligner Erkrankungen eingesetzt wird. Ibrutinib findet derzeit klinische Anwendung in der Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) sowie des Mantelzelllymphoms (MCL).⁷³ Durch kovalente Bindung an den Cysteinrest 481 (Cys-481) innerhalb der ATP-Bindungsstelle der Btk,⁷⁴ welche sich innerhalb der SH1-Domäne befindet, führt Ibrutinib zu einer irreversiblen Blockade der enzymatischen Aktivität. Die zusätzliche Hemmung der Btk-Autophosphorylierung am Tyrosinrest Y223 durch Ibrutinib resultiert in einer vollständigen Btk-Blockade.⁷³ Neben der Bindung an Cys-481 der Btk (*on-target*), bindet Ibrutinib *in vitro* in höheren Konzentrationen an Kinasen, welche ebenfalls über ein Cystein in der ATP-Bindungstasche der Kinasedomäne verfügen, darunter insbesondere an EGFR, Itk und Tec, und hemmt diese.^{73,75} Darüber hinaus kann Ibrutinib in höheren Konzentrationen auch Kinasen der Src-Familie (Lyn, Fyn, Yes) hemmen.^{73,75} Diese *off-target* Wirkungen könnten manche unerwünschte Nebenwirkungen bei Patienten unter Ibrutinib Therapie, darunter Hautausschlag, Diarrhoe, Vorhofflimmern sowie ein erhöhtes Blutungsrisiko, erklären.

2.5.1.1 Ibrutinib: Hemmung der Thrombozytenfunktion und Blutungen unter Therapie von Patienten mit malignen B-Zell Erkrankungen

Bei bis zu 50 Prozent der mit Ibrutinib behandelten Patienten wurden Blutungsereignisse berichtet. Die Mehrheit der in klinischen Studien beschriebenen Blutungsereignisse waren von geringgradiger Ausprägung (Grad 1 und 2), darunter insbesondere spontane subkutane Blutungen, Zahnfleischblutungen, Epistaxis, petechiale Blutungen sowie Hämaturie. Etwa 5 Prozent der Patienten präsentierte höhergradige (Grad 3) Blutungen.⁷⁶⁻⁷⁹ Die beobachteten Blutungsereignisse, welche nicht mit einer Thrombozytopenie assoziiert sind,⁸⁰ lassen eine Dysfunktion der Thrombozyten vermuten. Dafür spricht zum einen das klinische Muster der Blutungen, was mit einem Defekt der primären Hämostase vereinbar ist, sowie fehlende Abnormalitäten der klassischen Gerinnungsparameter.^{80,81}

Verschiedene Untersuchungen wurden zur Klärung der möglichen Blutungsursache unter Therapie mit Ibrutinib durchgeführt.

Levade et al untersuchten den Einfluss von Ibrutinib auf die Thrombozytenaktivierung, induziert durch verschiedene Thrombozytenstimuli *in vitro* und *ex vivo* bei Patienten unter Ibrutinib Therapie. In einer Konzentration von 0,5µM, welche im Bereich der maximalen Blutplasmakonzentration der mit Ibrutinib behandelten Patienten liegt, zeigte Ibrutinib *in vitro* keine Wirkung auf die durch Thromboxan A₂, „*thrombin-related peptide*“ (TRAP) sowie Thrombin induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten. Jedoch konnte eine dosisabhängige Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation gewaschener Thrombozyten und der Thrombozytenaggregation in PRP durch Ibrutinib nachgewiesen werden, welche die Autoren auf die verminderte Btk-Aktivierung und Btk-abhängige Phosphorylierung der PLC γ 2 zurückführten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Inkubation von Ibrutinib mit Thrombozyten gesunder Spender zu einer verminderten Thrombozytenadhäsion an immobilisierten vWF unter arterieller Strömung bei hohen Scherraten führt. Alle untersuchten Patienten mit Blutungsdiathese unter Therapie zeigten eine starke Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation in PRP. Thrombozyten von Patienten mit Blutungsereignissen adhärten unter Blutströmung kaum an vWF im Vergleich mit Patienten ohne Blutungskomplikationen.⁸²

Ähnliche Ergebnisse beobachteten Bye et al in Untersuchungen der Thrombozytenfunktion an mit Ibrutinib behandelten Patienten. Während eine

Stimulation der Thrombozyten mit Kollagen bzw. CRP in einer kompletten Thrombozytenaggregationshemmung resultierte, zeigte sich die durch die Thrombozytenstimuli ADP, TRAP und ein Thromboxan-Analogon induzierte Thrombozytenaggregation nicht gemindert.⁸³

In einer weiteren Studie konnte bei Patienten unter Therapie mit Ibrutinib ein Zusammenhang zwischen der Minderung der Kollagen-abhängigen Thrombozytenaggregation von PRP und dem Auftreten klinischer Blutungsereignisse festgestellt werden: Patienten, bei welchen Blutungsereignisse aufgetreten waren, zeigten eine signifikant niedrigere maximale Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Kollagen im Vergleich zu Patienten ohne nachgewiesene hämostatische Komplikationen.⁸⁴

Ein Vergleich der Wirkung von Ibrutinib *in vitro* auf die Kollagen-stimulierte Thrombozytenaggregation in Suspension und die Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter arterieller Strömung ergab, dass die durch Ibrutinib verursachte Thrombozytenadhäsionshemmung milder ausgeprägt war. Die Thrombozyten adhärten zwar an Kollagen, was sich in einer unverminderten thrombozytären Bedeckung der Kollagenfasern zeigte, bildeten jedoch instabile Thrombozytenaggregate.⁸⁵

Die durch das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ vermittelte Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen, gefolgt von der Bildung stabiler Thrombozytenaggregate, zeigte sich durch Ibrutinib *in vitro* gehemmt. Die Kombination von Ibrutinib mit Cangrelor, einem reversiblen P2Y₁₂-Antagonisten, äußerte sich in einer additiven Hemmung der Plättchenthrombusbildung unter arteriellem Fluss.⁸⁵

Ibrutinib hemmt also *ex vivo* die GPVI-abhängige Signaltransduktion und kann *in vitro* das durch das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ induzierte „*outside-in*“ Signaling hemmen, was in der Bildung instabiler Thrombi auf einer Kollagenoberfläche resultiert. Diese könnten möglicherweise für die unter Therapie auftretenden Blutungsereignisse *in vivo* verantwortlich sein. Die Wirkung sekundärer Mediatoren (ADP, Thromboxan A₂) über deren G-Protein gekoppelte Rezeptoren wird durch Ibrutinib hingegen nicht beeinflusst.⁸⁵

Rigg et al zeigten, dass die irreversible Hemmung von Btk mit zwei Ibrutinib-Analoga *in vitro* zu einer verminderten Thrombozytenaktivierung, Btk-Phosphorylierung, Ausbreitung auf Fibrinogen und Thrombozytenaggregation auf Kollagen unter

arterieller Strömung führt. Wurden diese Ibrutinib-Analoga Primaten oral verabreicht, zeigte sich ebenfalls eine Minderung der Thrombozytenaggregation, jedoch ohne eine Verlängerung der Blutungszeit oder einen Einfluss auf klassische Gerinnungsparameter. Diese Ergebnisse zusammenfassend, bedingte die Hemmung der Btk eine signifikante Minderung der GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung und -aggregation ohne dabei die Blutungszeit zu verlängern.⁸⁶

Kazianka et al untersuchten im Blut von CLL-Patienten die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation, welche abhängig von der Bindung von vWF an GPIIb ist. Während CLL-Patienten ohne Therapie oder unter Chemotherapie eine nahezu normwertige Ristocetin-vermittelte Thrombozytenaggregation zeigten, konnte bei CLL-Patienten unter Therapie mit Ibrutinib eine deutliche Verminderung nachgewiesen werden. Weiterhin konnte bei diesen Patienten ein Zusammenhang zwischen klinischen Blutungsereignissen und einer weiteren Abnahme der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation beobachtet werden. Die Autoren schlugen daher die Messung der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation im Blut als leicht durchführbare Methode zur Überwachung der Blutungsneigung bei Patienten unter Btk-Inhibitor Therapie vor.⁸⁷

Lipsky et al untersuchten in einer Studie an CLL-Patienten den Einfluss von Ibrutinib auf Thrombozytenfunktion und Gerinnungsfaktoren, um mögliche Rückschlüsse auf die Ursache für die unter Therapie auftretenden Blutungsereignisse zu erlangen. *In vitro* Untersuchungen ergaben einen milden krankheitsbezogenen Defekt thrombozytärer Signalwege bei getesteten CLL-Patienten, welcher durch die Therapie mit Ibrutinib nochmals verstärkt wird. Einige Parameter, welche mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergehen, konnten bereits zu Studienbeginn nachgewiesen werden: So wurden bei 55% aller Patienten Blutungsereignisse vom Grad ≤ 2 beobachtet, Blutungen vom Grad 3 traten nicht auf. Die Blutungszeit zeigte sich unter Verwendung der Epinephrin-Kartusche mittels PFA-100 verlängert. Die Messung der Thrombozytenaggregation von Vollblut mittels Aggregometrie nach Stimulation mit Kollagen oder ADP ergab eine Minderung bei allen CLL-Patienten, ob unter Therapie mit Ibrutinib oder nicht. Zusammenfassend ist die Pathophysiologie der Blutungsereignisse unter Ibrutinib komplex und nicht nur Folge der direkten Medikamenteneinwirkung.⁸⁸

2.5.2 Btk-Inhibitoren der zweiten Generation

Die irreversible Hemmung der Btk durch Ibrutinib stellt einen bedeutenden therapeutischen Fortschritt in der Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) dar. Da vermutet wird, dass die durch Ibrutinib bedingte *off-target* Wirkung auf einige andere Kinasen, darunter EGFR, Itk sowie Tec, verantwortlich ist für die unter Therapie mit Ibrutinib auftretenden Nebenwirkungen und Blutungsereignisse,⁸⁹ wurden neue irreversible Btk-Inhibitoren entwickelt, mit verbesserter Selektivität für Btk und geringeren *off-target* Wirkungen.^{42,90}

2.5.2.1 Acalabrutinib (ACP-196)

Acalabrutinib, auch bekannt als ACP-196, ist ein selektiver, irreversibler Btk-Inhibitor der zweiten Generation, welcher für die Therapie des Mantelzelllymphom (MCL) zugelassen ist.⁹¹ Über die kovalente Bindung an Cys-481 führt Acalabrutinib zu einer irreversiblen Blockade der Btk. Acalabrutinib ist im Vergleich zu Ibrutinib selektiver für Btk und hemmt nicht Src Kinasen,⁹² besitzt jedoch eine etwa fünffache geringere halbmaximale inhibitorische Potenz für Btk.⁷⁵ Acalabrutinib hat eine Halbwertszeit von einer Stunde und bewirkt in zweimal täglicher therapeutischer Dosierung von 100mg eine vollständige Hemmung der Btk für 24 Stunden. Die Peak-Plasmakonzentration im Blut von Patienten unter Therapie mit Acalabrutinib liegt bei 1,3µM.⁷⁵

Im Vergleich zu Ibrutinib konnten unter Therapie mit Acalabrutinib weniger häufig schwere Blutungsereignisse beobachtet werden, was möglicherweise bedingt ist durch die fehlende *off-target* Hemmung der Src-Kinase.^{75,83,91} Die geringere Hemmung von Tec durch Acalabrutinib im Vergleich zu Ibrutinib ist jedoch umstritten.^{75,93}

Bezüglich des Auftretens geringgradiger Blutungen (wie Petechien) unter Acalabrutinib berichtet die Calquence® Zulassungsinformation eine vergleichbare Häufigkeit wie unter Therapie mit Ibrutinib.^{76,91}

Im humanisierten Mausmodell wurde im Blut von behandelten Patienten die Wirkung von Ibrutinib und ACP-196 auf die Thrombozytenadhäsion an die verletzte Carotis *in vivo* verglichen. Thrombozyten von CLL-Patienten unter Therapie mit ACP-196 (2x 100mg) zeigten eine ähnliche Thrombusbildung wie gesunde Kontrollprobanden, während Thrombozyten von mit Ibrutinib (420mg) behandelten CLL-Patienten eine deutlich gehemmte Thrombusbildung zeigten.⁹⁰

Nicolson et al untersuchten den Effekt von Ibrutinib im Vergleich zu Acalabrutinib *in vitro* auf die Thrombozytenfunktion. In dieser Studie erfolgte die Stimulation der Thrombozyten fast ausschließlich mit einer maximalen CRP-Konzentration (10µg/ml). Die irreversible Hemmung der Btk durch Ibrutinib bzw. Acalabrutinib *in vitro* bedingt eine Verzögerung, jedoch keine Hemmung der GPVI-induzierten Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit der maximalen CRP-Konzentration. Die Hemmung der GPVI-vermittelten Thrombozytenaggregation trat bei deutlich höheren Konzentrationen von Ibrutinib und Acalabrutinib auf, als für die Btk-Hemmung erforderlich war. Das Verhältnis zwischen Blockade der Btk-Aktivität und Hemmung der GPVI-induzierten Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit einer maximalen CRP-Konzentration war für Ibrutinib und Acalabrutinib gleich. *Ex vivo* Untersuchungen der Thrombozytenfunktion in PRP an CLL-Patienten unter Therapie mit Ibrutinib (420mg täglich) oder Acalabrutinib (100mg zweimal täglich) ergaben eine Minderung der CRP-induzierten Thrombozytenaggregation unter Ibrutinib, nicht jedoch unter Acalabrutinib, was die Autoren auf die fünffach geringere inhibitorische Potenz von Acalabrutinib für Btk zurückführten.⁹⁴ Dies steht im Kontrast zu Ergebnissen von Bye et al.⁸³, welche *ex vivo* eine komplette Blockade der Thrombozytenaggregation von mit Ibrutinib oder Acalabrutinib behandelten Patienten nach Stimulation mit supramaximalen Kollagenkonzentrationen beobachteten. Bye et al berichteten zudem über eine geminderte Thrombozytenadhäsion an Kollagen sowie eine Thrombusinstabilität unter arterieller Strömung *in vitro* unter Einsatz hoher Ibrutinib-Konzentrationen sowie *ex vivo* im Blut von mit Ibrutinib behandelten Patienten. Diese Beobachtung stimmt überein mit Ergebnissen von Nicolson et al,⁹⁴ welche herausfanden, dass die Thrombozytenadhäsion an Kollagen trotz Btk-Blockade durch Ibrutinib unter Blutfluss unbeeinflusst bleibt und die Hemmung dieser erst durch *off-target* Effekte, welche insbesondere beim Einsatz höherer Ibrutinib-Konzentrationen auftreten, vermittelt wird.

2.5.2.2 ONO/GS-4059 (Tirabrutinib)

ONO/GS-4059 ist ein weiterer, oral verfügbarer Btk-Inhibitor mit erhöhter Selektivität, der ebenfalls durch Bindung an Cys-481 zu einer irreversiblen Hemmung der Btk führt. Zusätzlich bewirkt ONO/GS-4059 eine Hemmung der Kinase Tec.⁹⁵

Die erste klinische Phase I Studie über den therapeutischen Einsatz von ONO/GS-4059 zur Behandlung B-Zell-abhängiger Malignitäten zeigte dauerhafte Ansprechraten ohne toxische Nebenwirkungen. Bei einer Dosierung von 320mg pro Tag war die Peak-Plasmakonzentration im Blut von Patienten 1,95µM.⁹⁵ Pharmakokinetisch zeichnet sich ONO/GS-4059 aus durch eine rasche orale Absorption und Elimination mit einer Halbwertszeit von 6.5 bis 8 Stunden. Für alle eingesetzten therapeutischen Konzentrationen hielt die Btk-Hemmung für mindestens 24 Stunden an. Die häufigsten unter Therapie mit ONO/GS-4059 auftretenden Nebenwirkungen waren geringgradige Blutungsereignisse (Grad1-2) mit einer Auftrittshäufigkeit (ca. 50%), ähnlich der bei Patienten unter Therapie mit Ibrutinib und Acalabrutinib.^{91,96}

2.5.2.3 BGB-3111 (Zanabrutinib)

BGB-3111 ist ein weiterer, oral verfügbarer, irreversibler und selektiver Btk-Inhibitor. Die erste klinische Phase I Studie über den Einsatz von BGB-3111 in der Behandlung maligner B-Zellerkrankungen sowie des Morbus Waldenström zeigte eine gute Verträglichkeit und klinische Wirksamkeit. Die häufigsten Nebenwirkungen unter Therapie mit BGB-3111 waren Infektionen der oberen Atemwege, Diarrhoe sowie Übelkeit. Bisher wurden keine höhergradigen Blutungsereignisse unter Therapie mit BGB-3111 berichtet.⁹⁷

Biochemische und zelluläre Untersuchungen ergaben eine Hemmung der Btk durch Einsatz von Konzentrationen im nanomolaren Bereich.^{97,98} Die *in vivo* und *in vitro* Wirkung von BGB-3111 zur Behandlung des MCL wurde in Versuchen mit Mäusen untersucht. Hier zeigte sich eine potente Hemmung der Zellviabilität durch BGB-3111. Im Gegensatz zu Ibrutinib zeigte BGB-3111 keine Hemmung von *off-target* Kinasen, wie Tec, EGFR und Itk.⁹⁹

2.5.2.4 Evobrutinib (M2951)

Evobrutinib (M2951) ist ein weiterer oraler, selektiver Btk-Inhibitor, der zur Hemmung B-Zell-abhängiger Signalantworten wie Proliferation und Freisetzung von Antikörpern und Zytokinen entwickelt wurde, ohne die Funktion der T-Zellen zu beeinflussen. Die Suppression Antikörper-produzierender B-Lymphozyten soll dabei einen therapeutischen Fortschritt für die Behandlung von speziellen Autoimmunkrankheiten erbringen. Derzeit befindet sich Evobrutinib in klinischer Prüfung für die Therapie der rheumatoiden Arthritis (RA), multiplen Sklerose (MS) sowie des systemischen Lupus erythematoses (SLE).¹⁰⁰ Die ersten Ergebnisse einer Phase II Studie bei Patienten mit MS wurden kürzlich (Oktober 2018) vorgestellt und sind vielversprechend. Unter Therapie mit einer einmal oder zweimal täglichen Dosis von 75mg Evobrutinib konnte eine Minderung der MS typischen Läsionen in der Hirnsubstanz beobachtet werden.¹⁰¹

2.6 Irreversible Btk-Inhibitoren: eventuell mögliche neue Thrombozytenhemmer zur sekundären Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen

Die Exposition thrombogener Plaquekomponenten nach Plaque-Ruptur oder Erosion, insbesondere Kollagen vom Typ I und III, induziert über Aktivierung des GPVI-Rezeptor-Signalweg die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, welche zu einer Gefäß-verschließenden Atherothrombose und damit zu Myokardinfarkt und ischämischem Schlaganfall führen kann.²⁹⁻³¹

Die derzeit eingesetzte duale Thrombozytenaggregationshemmung durch Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin®) in Kombination mit einem P2Y₁₂-Antagonist zur sekundären Prävention zerebro- und kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit vorangegangenem Myokardinfarkt, ist begleitet von einem erhöhten Blutungsrisiko.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Die Entwicklung einer antithrombozytären Substanz, welche vornehmlich die Plaque-induzierte Thrombusbildung effizient hemmt ohne dabei Einfluss auf die Hämostase zu nehmen, wäre deshalb ein bedeutender Fortschritt für die sekundäre Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Antikörper gegen den GPVI-Rezeptor oder die vWF-Bindungsstelle des GPIb-Rezeptors eine effizientere Minderung der Plaque-induzierten Thrombusbildung unter Blutfluss bewirken als Aspirin® und P2Y₁₂-

Antagonisten.^{32,106} GPVI Antikörper, jedoch nicht Integrin $\alpha 2\beta 1$ -Antikörper, hemmten dabei die Plaque-induzierte Thrombusbildung, welche von essentieller Bedeutung für die Entstehung der Atherothrombose ist.^{29,31,107}

Kürzlich zeigten Busygina et al, dass irreversible Inhibitoren der Kinase Btk (Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059), welche ja Bestandteil der thrombozytären Signalkaskade von GPIIb/IIIa und GPVI ist, selektiv die Plaque-induzierte Thrombusbildung hemmen. Die Btk Hemmung durch Ibrutinib hatte keinen Einfluss auf die vWF-vermittelte und Integrin $\alpha 2\beta 1$ -abhängige Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Kollagen unter arterieller Strömung, welche essentiell für die physiologische Hämostase ist.

Die Plaque-selektive Thrombozytenhemmung konnte auch nachgewiesen werden bei CLL-Patienten unter Ibrutinib-Therapie und bei Probanden nach niedrig-dosierter Einnahme des Btk-Inhibitors.¹⁰⁸

Die potente, selektive Hemmung der Plaque-induzierten Thrombusformation ohne Beeinflussung der physiologischen Hämostase, macht Btk-Inhibitoren in niedriger Dosierung zu vielversprechenden antithrombotischen Medikamenten, welche in klinischen Studien zur sekundären Prävention kardio- und zerebrovaskulärer Erkrankungen weiter untersucht werden könnten.^{108,109}

3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Bruton Tyrosin Kinase (Btk) ist beteiligt an der vWF/GPIb sowie der Kollagen/Glykoprotein (GP) VI vermittelten Thrombozytenaktivierung, welche maßgeblich für die durch atherosklerotischen Plaque-induzierte Thrombusbildung ist.^{23,62,63} Kürzlich zeigten Busygina et al, dass niedrig dosierte Btk-Inhibitoren selektiv die durch atherosklerotischen Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung hemmen ohne die primäre Hämostase zu beeinträchtigen.¹⁰⁸ Andererseits zeigen klinische Studien an Patienten mit B-Zell-abhängigen Malignomen unter Ibrutinib Therapie zu circa 50% Blutungen (Grad 1-2), größere Blutungsereignisse (Grad 3-4) sind jedoch selten.^{76,78,87} Erste klinische Studien zeigen, dass Patienten, die mit Btk-Inhibitoren der zweiten Generation (Acalabrutinib, ONO/GS 4059) mit besserer Selektivität für Btk therapiert werden, weniger Blutungen als Ibrutinib zeigen.

Diese Beobachtungen bilden die Grundlage für folgende Fragen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

Kann durch Einsatz niedrig-dosierter Btk-Inhibitoren eine suffiziente Hemmung der GPVI-vermittelten Thrombozytenaggregation und somit Prävention atherosklerotisch bedingter Thrombosen erzielt werden ohne dabei die physiologische Hämostasereaktion zu beeinflussen? Zeigen neue Btk-Hemmer mit höherer Selektivität für Btk vielleicht bessere Ergebnisse im Vergleich zu Ibrutinib?

Dazu wurde Ibrutinib im Vergleich zu vier neuen Btk-Inhibitoren zweiter Generation (Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111, Evobrutinib) *in vitro* durch Zugabe zu Blut untersucht. Es wurde deren Wirkungen auf die GPVI-vermittelte Thrombozytenaggregation, induziert durch Kollagen, untersucht und mit deren Wirkungen auf die Blutungszeit verglichen.

Um herauszufinden, ob das erhöhte Blutungsrisiko unter Therapie mit Ibrutinib im Gegensatz zu den Btk-Inhibitoren zweiter Generation eventuell erklärbar ist durch eine stärkere Hemmung der vWF/GPIb vermittelten Thrombozytenaktivierung, welche außer bei der Atherothrombose auch wichtig für die Hämostase ist, wurde der Einfluss von Ibrutinib im Vergleich zu den neuen Btk-Inhibitoren auf die Ristocetin-induzierte, vWF/GPIb-abhängige Thrombozytenaggregation untersucht.

Von weiterem Interesse war die Frage, ob die beobachteten Blutungsereignisse unter Therapie mit Ibrutinib bedingt sind durch eine Störung der Integrin α IIb β 3/Fibrinogen

Interaktion, möglicherweise bedingt durch eine *off-target* Hemmung von Src Kinasen durch Ibrutinib. Dazu wurden die Wirkungen von Ibrutinib und Acalabrutinib, als Vertreter der Btk-Inhibitoren zweiter Generation, auf die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen unter arterieller Strömung verglichen.

4 Materialien

4.1 Btk-Inhibitoren

Acalabrutinib (ACP-196)	SelleckChem (Houston, USA)
BGB-3111	MedChem Express (New Jersey, USA)
Evobrutinib	MedChem Express (New Jersey, USA)
Ibrutinib	SelleckChem (Houston, USA)
ONO/GS-4059	SelleckChem (Houston, USA)

4.2 Reagenzien und Chemikalien

DiOC6	Life Technologies (Eugene, OR, USA)
Fibrinogen	Enzyme research (Swansea, UK)
Humanes Serumalbumin (HSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kollagen (Horm®)	Takeda (Österreich, Linz)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Refludan® (rekombinantep Lepirudin)	Prof. Sommerhoff (Klinikum LMU, München, Deutschland)
	Dr. Calatzis (Dynabyte GmbH, München, Deutschland)
Ristotest (Ristocetin)	Roche Diagnostics GmbH (Rotkreuz, Schweiz)

4.3 Puffer und Lösungen

HSA (eigene Herstellung)	HSA 4%, HSA 0,5% in PBS
Natriumchlorid 0,9%	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
SKF-Puffer	Takeda (Linz, Österreich)

4.4 Stammlösungen

Ibrutinib, Acalabrutinib (ACP-196), ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib wurden in Dimethylsulphoxid (DMSO) in einer Konzentration von 10mM gelöst. Aliquots (30µl) davon wurden bei -80 °C gelagert. Vor jedem *in vitro* Experiment wurden Lösungen in DMSO hergestellt (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 mM), um im Blut finale Konzentrationen von 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 µM zu erhalten. Die finale Konzentration von DMSO in Blut war 0,1%.

Kollagen (1000µg/ml) als Stimulus für die Messung der *in vitro* Thrombozytenaggregation mittels Impedanzaggregometrie wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit SKF-Puffer (Stammlösung: 100µg/ml) verdünnt. Lyophilisiertes Ristocetin wurde in destilliertem Wasser gelöst (finale Konzentration: 10mg/ml).

Zur Anfärbung der Thrombozyten wurde DiOC6 in einer Konzentration von 5mM in DMSO gelöst, Aliquots (10µl) davon bei -20°C aufbewahrt. Vor jedem Flusseexperiment wurde die Stammlösung auf eine Konzentration von 100µM mit humanem Serumalbumin (HSA, 0,5% in PBS) verdünnt, um eine finale Konzentration von 1µM in der Blutprobe zu erhalten.

4.5 Verbrauchsmaterialien

Butterflykanüle 19-Gauche	Intermedica GmbH (Mainz Deutschland)
Falcon®- Röhren (15ml und 50ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Deckgläser	Menzel-Gläser GmbH (Braunschweig, Deutschland)
Kollagen/Epinephrin-Kartuschen für PFA-200	Siemens Healthcare (Erlangen, Deutschland)
Multiplate® Testzellen	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Plastikspritzen (5ml, 10ml, 20ml, 50ml Volumen)	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Silikonschlauch (Innen Ø: 1,5mm, AußenØ: 3,5mm, Wandstärke: 1mm)	Wagner&Munz GmbH (München, Deutschland)
S-Monovette®: 3,8ml)NC/PFA (0,129 mol/l gepuffertes Natriumcitrat,	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

pH 5,5)

sticky slide 0,1 Luer

ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)

4.6 Geräte und Software

Inkubator

WTB Binder (Tuttlingen, Deutschland)

Impedanzaggregometer

Multiplate® Dynabite Medical (München, Deutschland)

Innovance® PFA-200 System

Siemens Healthcare (Erlangen, Deutschland)

Kamera

CoolSNAP HQ2 CCD camera Photometrics (Tucson, AZ, USA)

Mikroskop

Nikon Eclipse TE2000-E Fluoreszenz-mikroskop (Tokyo, Japan)

Nis-element 3.2

Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Spritzensaugpumpe

LEGATO 270 Havard Apparatus (Holliston, MA, USA)

Vortex

REAX top, Heidolph (Kehlheim, Deutschland)

Wasseraufreinigungssystem

Milli Q Direct Q 16, Merck Millipore (Billerica, MA, USA)

5 Methoden

5.1 Blutentnahme

Blut wurde von freiwilligen, gesunden, erwachsenen Spendern gemäß den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki sowie nach erfolgter Einverständniserklärung erhalten. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion einer peripheren Vene über eine 19-Gauge-Nadel in eine Plastikspritze, welche in einem Verhältnis von 1/10 des entnommenen Blutvolumens rekombinantes Hirudin, gelöst in 0,9% NaCl (finale Konzentration im Blut 200U/ml; 13µg/ml) als Antikoagulans enthielt. Die ersten 0,5ml des Bluts wurden in eine leere Spritze abgenommen und verworfen. Experimente wurden innerhalb von 30 Minuten bis 180 Minuten nach Blutentnahme durchgeführt. Blut für PFA-200®-Messungen wurde in speziellen Monovetten (S-Monovette NC/PFA 3,8ml), welchen 0,38ml Natriumcitrat in einer Konzentration von 0,129mol/l als Antikoagulans beigefügt ist, entnommen. Keiner der Blutspender hatte Aspirin oder andere, auf die Thrombozytenfunktion einwirkende Medikamente, innerhalb der vorherigen 14 Tage eingenommen.

5.2 Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen

Die Thrombozytenaggregation im Blut wurde durch Mehrfachelektordenaggregometrie („*multiple electrode aggregometry*“, MEA) unter Verwendung eines Multiplate®-Geräts gemessen.^{110,111} Der Multiplate Analyse liegt das Prinzip der Impedanzaggregometrie zugrunde, welches von Cardinal und Flower entwickelt wurde und auf der Messung des elektrischen Widerstands zweier in Vollblut eingebrachter Elektroden beruht.¹¹²

Die Multiplate-Messung wird in Einwegmesszellen mit zwei Impedanzsensoren, jeweils bestehend aus einer Anode und einer Kathode, und einem Polytetrafluorethylen-beschichteten Magnetrührer durchgeführt. Die durch verschiedene Thrombozyten-Agonisten induzierte Thrombozytenaktivierung führt zur Anheftung der Thrombozytenaggregate an die Elektroden, was eine Änderung des Widerstands bedingt. Die Widerstandsänderung wird kontinuierlich über die Messzeit (min) durch die beiden Sensoren aufgezeichnet und resultiert in zwei Kurven, welche sich typischerweise kaum unterscheiden. Der Mittelwert dieser beiden Kurven wird in der Einheit „*aggregation units*“ (AU) angegeben.

Zur Beurteilung der thrombozytären Aggregation über die Zeit (AU*min), wird die Fläche unterhalb der Kurve „*area under the curve*“ (AUC) herangezogen.¹¹⁰ Die Messzeit der durchgeführten Untersuchungen betrug 10 Minuten.

Zur Analyse der Thrombozytenfunktion wurde zuerst DMSO 0,1% (Kontrolle) oder die Btk-Inhibitoren Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111, Evobrutinib zu 300µl NaCl 0,9% in die Messzelle pipettiert, bevor 300µl Hirudin-antikoaguliertes Blut zugegeben wurde. Die Blutproben wurden anschließend abgedeckt im Inkubator bei 37°C bis zur Messung inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit (15 oder 60 Minuten) wurde nach Zugabe der Thrombozytenstimuli sowie des Magnetrührers zu den Blutproben die Messung gestartet. Als Stimuli dienten Horm®-Kollagen und Ristocetin.

5.3 Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen

5.3.1 Beschichtung der Deckgläser mit Fibrinogen

Für Flusskammerexperimente wurden Glasdeckgläser (Menzel 24 x 60mm, #1,5) mit Fibrinogen beschichtet. Dazu wurde Fibrinogen in PBS verdünnt und gevortext (finale Fg-Konzentration: 200µg/ml). Nach Reinigung der Deckgläschen mit Isopropanol (70%) wurden in deren Mitte 30µl der Suspension auf eine Fläche von 5mm x 7mm verteilt und nach 5 Minuten mit 20µl HSA 0,5% überschichtet. Die beschichteten Deckgläser wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C bis zur Verwendung, innerhalb von maximal 24 Stunden, aufbewahrt.

5.3.2 Vorbereitung der Blutproben für Flusskammerexperimente

Für Flusskammerexperimente wurde Hirudin-antikoaguliertes Blut mit DiOC6 (1µM) zur Thrombozytenanfärbung und DMSO 0,1% (Kontrolle) oder Btk-Inhibitor Ibrutinib und ACP-196 für 15 oder 60 Minuten bei 37°C vorinkubiert.

Zunächst wurde Ibrutinib (1µM, 0,2µM), ACP-196 (5µM, 1µM) oder DMSO (finale Konzentration im Blut 0,1%, Kontrolle) zu 100µl NaCl 0,9% in ein 15ml Falcon®-Röhrchen pipettiert, bevor anschließend das Hirudin-antikoagulierte Blut (2,9ml) hinzupipettiert wurde. Dieses Vorgehen garantierte, dass die Btk-Inhibitoren

vollständig im Blut gelöst waren.¹⁰⁸ Die jeweilige Konzentration der Btk-Inhibitoren Ibrutinib und ACP-196 für die Flussexperimente wurde anhand der mittels MEA ermittelten Dosis-Wirkungskurven der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation gewählt. Es wurde jeweils die Konzentration von Ibrutinib und ACP-196 verwendet, welche nach 15 Minuten und 60 Minuten Vorinkubation bei 37°C die Thrombozytenaggregation maximal hemmte. Blutproben für die 15 Minuten Präinkubation wurden mit Ibrutinib (1µM) bzw. ACP (5µM) angesetzt, Blutproben für die 60 Minuten Präinkubation mit Ibrutinib (0,2µM) bzw. ACP (1µM). Zum Anfärben der Thrombozyten wurde den Blutproben der Fluoreszenzfarbstoff DiOC6 (1µM) beigefügt. Anschließend wurden die Blutproben für 15 oder 60 Minuten bei 37°C im Inkubator bis zur Durchführung der Flusskammerexperimente vorinkubiert.

Als Kontrollwert diente jeweils eine Blutprobe, versetzt mit DMSO 0,1% anstelle der Btk-Inhibitoren Ibrutinib oder ACP-196.

5.3.3 Durchführung der Flusskammerexperimente

Für die Flusskammerexperimente wurden die mit Fibrinogen (200µg/ml) beschichteten Deckgläschen auf die Unterseite von Flusskammern (0,1 Luer sticky-Slides, ibidi®), welche zuvor mit HSA 4% bestrichen wurden, montiert. Anschließend wurden die Flusskammern auf dem Objektisch eines Fluoreszenzmikroskops (TE2000-E, Nikon), welches mit einer Inkubationskammer (37°C) ausgestattet ist, befestigt und über einen Silikonschlauch mit einer Spritzensaugpumpe (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) verbunden. Die Perfusion der Flusskammern erfolgte mit einer Scherrate von 600/s. Zur Blockade freier unspezifischer Bindungsstellen auf den Glasdeckgläschen wurden die Flusskammern zunächst mit PBS, dann mit HSA 4% in PBS gespült. Anschließend erfolgte die Perfusion der Flusskammern mit den vorinkubierten Hirudin-antikoagulierten Blutproben. Mittels Fluoreszenzmikroskopie über ein 10x Objektiv (NA 0,4) mit einem Nikon TE2000-E Mikroskop sowie einer CoolSNAP HQ2 CCD Videokamera wurde die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten an Fibrinogen kontinuierlich (1 Bild/sek) über 5 Minuten aufgenommen.

5.3.4 Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter arterieller Strömung

Die Thrombozytenadhäsion und -aggregation an Fibrinogen wurde durch Detektion der mit DiOC6 angefärbten Thrombozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie (Exzitation: 485/25nm, Emission: 528/38nm) kontinuierlich über 5 Minuten (1 Bild/Sekunde) über ein 10x Objektiv eines Nikon TE2000-E Mikroskops sowie einer CoolSNAP HQ2 CCD Kamera aufgenommen.

Die Auswertung der Videos erfolgte über die Software NIS-element 3.2. Nach Abzug eines festgelegten Hintergrunds für jedes Bild, wurde nach Setzen eines Fluoreszenzschwellenwert die Bedeckung der Bildfläche mit Thrombozyten (*platelet coverage*) über die Aufnahmezeit berechnet.³² Die betrachtete Bildfläche betrug 669µm x 896µm. Die dargestellten Graphen ergeben sich aus Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) (gemessen in jeder Sekunde) der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen von n Experimenten verschiedener Blutspender.

5.4 Messung der *in vitro* Verschlusszeit mittels „platelet function analyzer“ PFA-200®

Der „platelet function analyzer“ PFA 200® ist ein spezielles Verfahren zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion durch Bestimmung der *in vitro* Blutungszeit. Durch Simulation der primären Hämostase hat der Plättchenfunktions-Analysator im klinischen Alltag als sensitive Methode zum Monitoring von Thrombozytenfunktionsstörungen sowie zur Überwachung von auf die Thrombozytenfunktion einwirkenden Medikamenten breite Anwendung gefunden.¹¹³⁻¹¹⁵ Die Membran der verwendeten Messzellen ist entweder mit Kollagen/Epinephrin oder Kollagen/ADP beschichtet. Die Kollagenbeschichtung, welche die *in vivo* Situation eines verletzten Gefäßendothels imitiert, führt zur Aktivierung, Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten, Epinephrin bzw. ADP bedingen eine zusätzliche Verstärkung der thrombozytären Aktivierung. Die beschichtete Membran der Messzelle enthält eine winzige Öffnung, in welche das mit Citrat antikoagulierte Blut (800µl) durch hohe

Scherkräfte gesaugt wird. Durch das Anheften der Thrombozyten an die Kollagenmembran wird die Öffnung verschlossen, wodurch der Blutfluss sistiert. Die Dauer in Sekunden bis zum Verschluss der Öffnung durch das gebildete Thrombozytenaggregat dient als Maß für die Thrombozytenfunktion und wird als *in vitro* Verschlusszeit („*closure time*“) bezeichnet. Die maximale Messzeit („*closure time*“, CT) liegt bei 300ms. Die Proben zur Messung der *in vitro* Blutungszeit wurden in 2ml Eppendorf®gefäßen angesetzt. Nach Zugabe von DMSO 0,1%, Ibrutinib (0,5µM, 1µM), ACP-196 (2,5µM), ONO/GS-4059 (2,5µM), BGB-3111 (1µM) oder Evobrutinib (10µM) zu 50µl NaCl 0,9% wurde zuletzt jeweils 750µl Citrat-antikoaguliertes Blut hinzupipettiert und die Proben anschließend im Wasserbad bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Die zur Antikoagulation eingesetzte Citrat-Konzentration von 129mM/l soll stabile Messwerte liefern, auch für Messungen in Blutproben, deren Entnahme bereits einige Zeit zurückliegt.¹⁶ Für dieser Arbeit zugrundeliegende Messungen wurden Kollagen/Epinephrin-Kartuschen verwendet, welche im klinischen Alltag insbesondere zur Abschätzung eines erhöhten Blutungsrisikos unter Therapie mit Aspirin® eingesetzt werden. Messungen wurden innerhalb eines Zeitrahmens von 75 bis 150 Minuten nach Blutentnahme durchgeführt.

5.5 Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) von n Experimenten pro Versuch angegeben. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde das SigmaStat 3.5-Programm-Paket verwendet. MEA („*multiple aggregometry aggregometry*“) -Versuche wurden mit ein- oder zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) unabhängiger Faktoren, gefolgt von einem paarweisen Vergleich zur Kontrolle (DMSO) nach der LSD-Methode („*Least Significant Difference*“) mit *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$) statistisch ausgewertet. Für die statistische Auswertung des Flussexperiments wurde jeweils das Ausmaß der Thrombozytenaggregationshemmung, bedingt durch die Btk-Inhibitoren, im Vergleich zur zeitgleichen Kontrolle (DMSO) zu jeder vollen Minute mit dem zweiseitig gepaarten t-Test analysiert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). Die PFA-200® Messung wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und paarweisem Vergleich der eingesetzten Btk-Inhibitoren vs. Kontrolle (DMSO) nach der Bonferroni- Methode analysiert.

6 Ergebnisse

6.1 Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Ibrutinib und die Btk-Inhibitoren zweiter Generation ACP-196 (Acalabrutinib), ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib nach Stimulation mit niedrigen Kollagenkonzentrationen

Die durch fibrilläres Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen ist abhängig von der thrombozytären GPVI-Signalkaskade, bei der Btk beteiligt ist. Zur Untersuchung der Wirkung von Ibrutinib im Vergleich zu neuen Btk-Inhibitoren zweiter Generation (ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib) auf die Kollagen-abhängige Thrombozytenaktivierung wurden Blutproben mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Btk-Inhibitors für 15 Minuten und 60 Minuten vorinkubiert, bevor die Thrombozytenaggregation mittels MEA („*multiple electrode aggregometry*“) gemessen wurde. Als Stimulus diente Horm®-Kollagen, welches aus equinem Kollagen vom Typ I und III besteht. Die eingesetzten submaximalen Kollagenkonzentrationen wurden so gewählt, um ein ähnliches Ausmaß der GPVI-abhängigen Thrombozytenaggregationshemmung wie nach Stimulation mit atherosklerotischem Plaquematerial zu erhalten.¹⁰⁸

Die eingesetzten Btk-Inhibitoren erster und zweiter Generation zeigten nach 15 Minuten Präinkubationszeit eine dosisabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation *in vitro* nach Stimulation mit niedrigen Kollagenkonzentrationen (0,2-0,5µg/ml). Ibrutinib (1µM) führte zu einer Hemmung um >90% mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 0,12 ± 0,02µM. Die maximale Suppression der Thrombozytenaggregation wurde bei einer Konzentration von 0,5µM erreicht (siehe Abb. 4A1).

Die Btk-Inhibitoren zweiter Generation zeigten eine etwas geringere inhibitorische Wirkintensität (< 90%) auf die Kollagen-induzierte thrombozytäre Aggregation mit maximaler Hemmung durch ACP-196 (5µM) -85%, ONO/GS-4059 (5µM) -80%, BGB-3111 (5µM) -79%, Evobrutinib (20µM) -70% (siehe Abb. 4B1, C1, D1, E1).

BGB-3111 (IC₅₀ 0,51±0,27µM) war somit potenter als ACP-196 (IC₅₀ 1,21 ±0,34µM), ONO/GS-4059 (IC₅₀ 1,20 ±0,83µM) und Evobrutinib (IC₅₀ 5,84±2,31µM) (siehe Tabelle 1, linke Spalte).

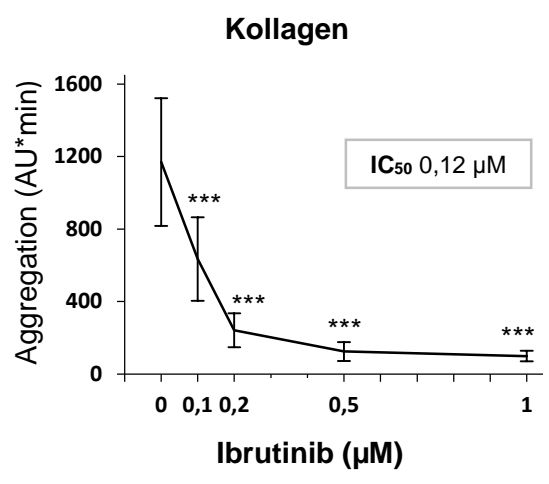
Nach therapeutischer, oraler Applikation der Btk-Inhibitoren ist die Exposition gegenüber Thrombozyten verlängert und könnte in einer stärkeren Hemmung der Btk resultieren. Um die Langzeitwirkung der Btk-Inhibitoren auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation *in vitro* zu untersuchen, welche der therapeutischen Wirkung von Btk-Inhibitoren *in vivo* wahrscheinlich ähnlicher ist, wurden geringere Konzentrationen der Btk-Hemmer (Ibrutinib 0,15µM, ACP-196 1µM, ONO/GS-4059 1µM, BGB-3111 0,15µM und Evobrutinib 5µM) für 60 Minuten bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit geringen Kollagenkonzentrationen stimuliert. Verlängerung der Inkubationszeit verstärkte die Wirkung aller Btk-Inhibitoren auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation. Die Dosis-Wirkungskurven der Btk-Inhibitoren ergaben nach 60 Minuten Präinkubation drei- bis fünffach niedrigere IC₅₀-Werte im Vergleich zu den IC₅₀-Werten, welche nach 15 Minuten Präinkubation ermittelt wurden. (Abb.4, Tabelle 1). Ibrutinib (0,2µM) bewirkte eine maximale Minderung der thrombozytären Aggregation um 99%, IC₅₀ 0,03±0,01µM (Abb. 4A2). Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀) der Btk-Inhibitoren zweiter Generation sind: ACP-196 0,372µM, ONO/GS-4059 0,268µM, BGB-3111 0,094µM, Evobrutinib 1,208µM (siehe Abb. 4B2, C2, D2, E2, Tabelle 1).

Btk-Inhibitor	IC ₅₀ (µM) 15min Präinkubation	IC ₅₀ (µM) 60min Präinkubation	Antiproliferative, therapeutische Plasmakonzentration (µM) und orale Applikationsdosis
Ibrutinib	0,12 ± 0,02	0,025 ± 0,012	0,31; 0,37 (420mg/d; 560mg/d) ^{93,117}
ACP-196	1,21 ± 0,34	0,372 ± 0,091	1,78 (100mg 2x/d) ⁷⁵
ONO/GS-4059	1,20 ± 0,83	0,268 ± 0,142	1,95 (320mg/d) ⁹⁵
BGB-3111	0,51 ± 0,27	0,094 ± 0,046	unbekannt
Evobrutinib	5,84 ± 2,31	1,208 ± 0,209	unbekannt

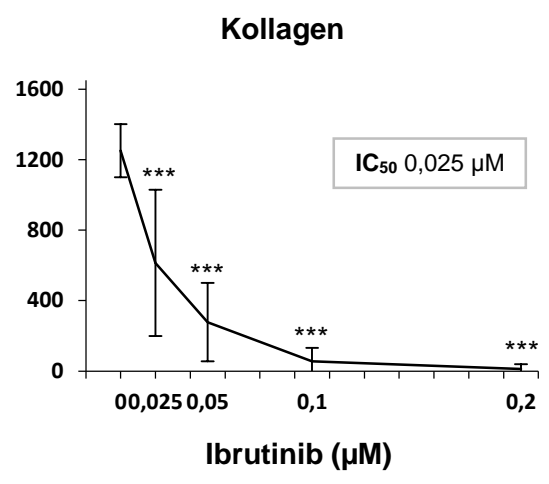
Tabelle 1: Halbmaximale inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) der Btk-Inhibitoren auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und Vergleich mit antiproliferativer, therapeutischer Plasmakonzentration

Steigende Konzentrationen der Btk-Inhibitoren wurden für 15 und 60 Minuten bei 37°C vorinkubiert, bevor die Wirkung auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation *in vitro* mittels MEA gemessen wurde. Werte sind angegeben als MW ± SD.

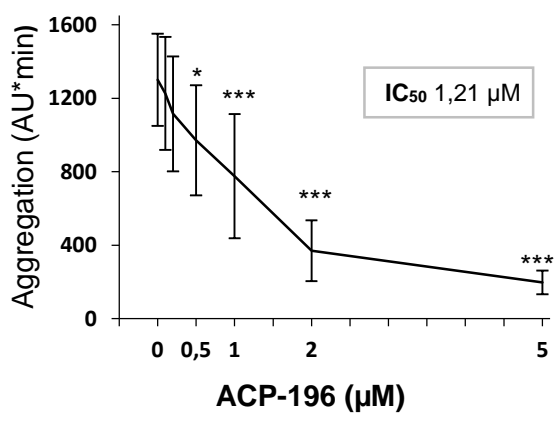
A1 15min Präinkubation



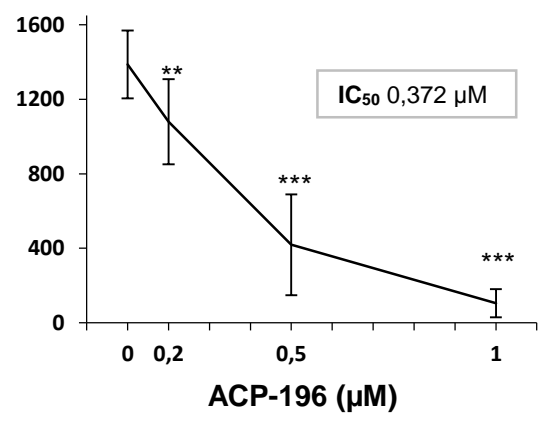
A2 60min Präinkubation



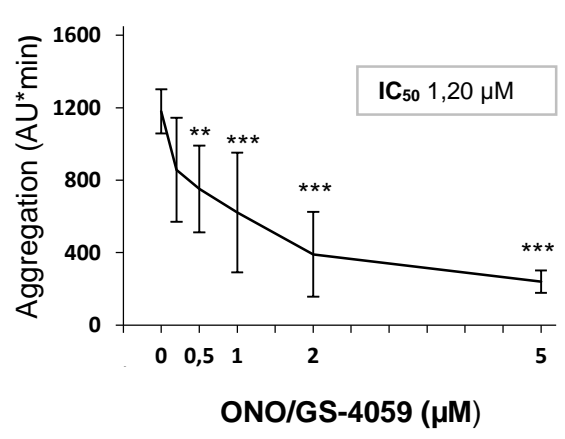
B1



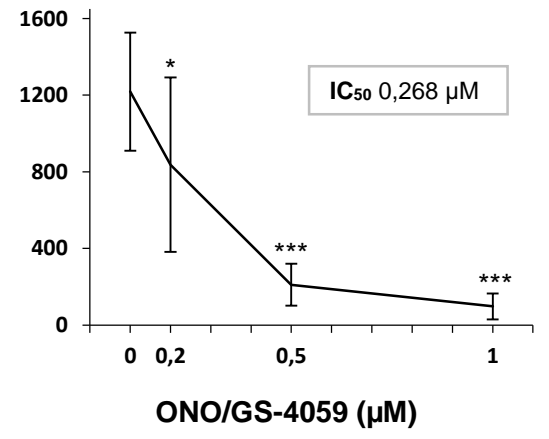
B2



C1



C2



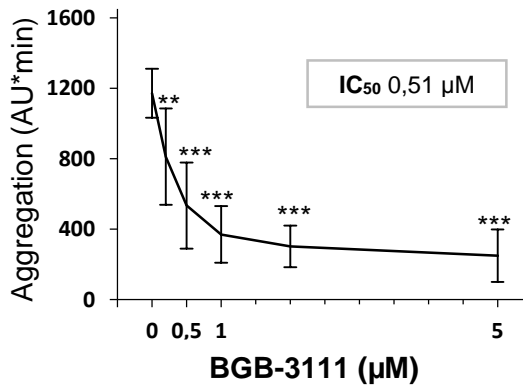
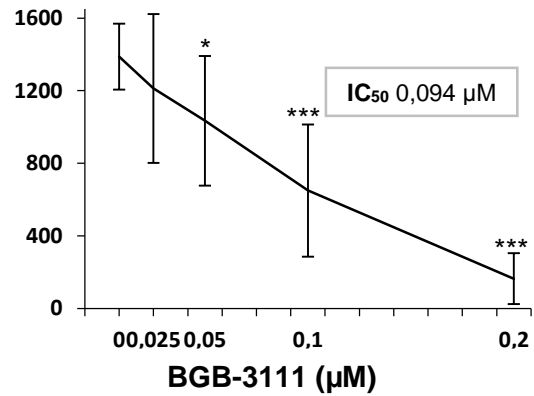
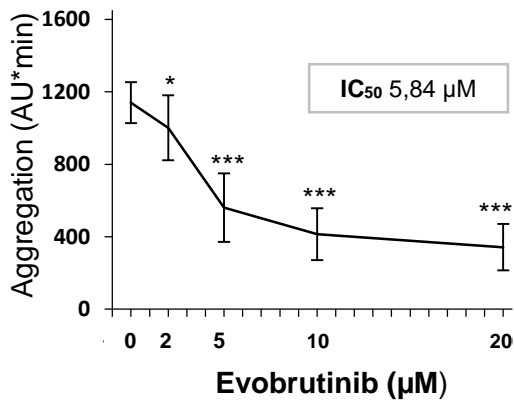
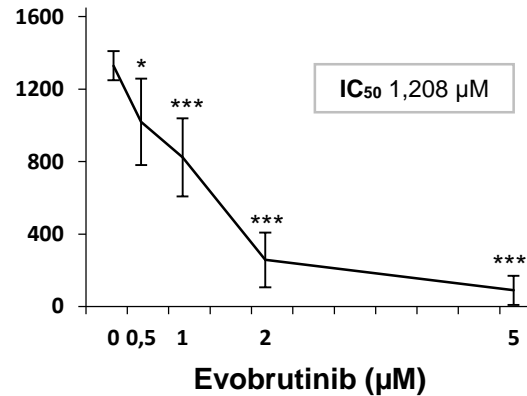
D1**D2****E1****E2**

Abbildung 4: Wirkung von Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4056, BGB-3111 und Evobrutinib auf die GPVI-abhängige Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Kollagen

Blutproben wurden für 15 bzw. 60 Minuten bei 37°C mit DMSO 0,1% oder einem Btk-Inhibitor in steigender Konzentration präinkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der statischen Thrombozytenaggregation mittels MEA nach Stimulation der Proben mit Kollagen (0,2-0,5µg/ml) über eine Dauer von 10 Minuten. Linke Spalte, Dosis-Wirkungs-Kurven nach 15 Minuten Präinkubation von **(A1)** Ibrutinib (0,1, 0,2, 0,5, 1µM), **(B1)** ACP-196 (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 µM), **(C1)** ONO/GS-4059 (0,2, 0,5, 1, 2, 5µM), **(D1)** BGB-3111 (0,2, 0,5, 1, 2, 5µM), **(E1)** Evobrutinib (2, 5, 10, 20 µM) nach Kollagen-induzierter Thrombozytenaggregation, rechts entsprechende Dosis-Wirkungs-Kurven nach 60 Minuten Präinkubation: **(A2)** Ibrutinib (0,025, 0,05, 0,1, 0,2µM), **(B2)** ACP-196 (0,2, 0,5, 1µM), **(C2)** ONO/GS-4059 (0,2, 0,5, 0,1), BGB-3111 **(D2)** (0,025, 0,05, 0,1, 0,2µM), **(E2)** Evobrutinib (0,5, 1, 2, 5µM). Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert ± SD, n=5. Einfacher ANOVA für den Faktor Btk-Inhibitor-Konzentration und paarweisem Vergleich vs. DMSO (*) mit *: p< 0,05, **: p< 0,01, ***: p< 0,001 nach LSD.

Um zu testen, wie sich die Wirkung der Btk-Inhibitoren mit zunehmender Inkubationszeit ändert, wurde die Kinetik der Thrombozytenaggregationshemmung durch submaximale Konzentrationen der Btk-Inhibitoren (Ibrutinib 0,15 μ M, ACP-196 1 μ M, ONO/GS-4059 1 μ M, BGB-3111 0,15 μ M und Evobrutinib 5 μ M) untersucht. Dazu wurden die Btk-Inhibitoren von 5 bis zu 60 Minuten bei 37°C vorinkubiert, bevor die statische Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit niedrigen Kollagenkonzentrationen mittels MEA gemessen wurde.

Die Verlängerung der Inkubationszeit führte zu einer signifikanten Zunahme der auf die Thrombozyten hemmenden Wirkung mit maximaler Suppression der Thrombozytenaggregation nach 60 Minuten (Abb. 5).

Nach vorheriger Präinkubationszeit von 5 Minuten bei 37°C hemmte Ibrutinib (0,15 μ M) die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation um 21% im Vergleich zur Kontrolle (DMSO 0,1%). Mit zunehmender Präinkubationszeit zeigte Ibrutinib (0,15 μ M) eine stärkere Wirkung auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation mit einer Minderung um 55% nach 15 Minuten, 72% nach 30 Minuten und > 98% nach 60 Minuten Vorinkubation (siehe Abb. 5B).

Eine vergleichbare Wirkung auf die Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit ergab sich für ACP-196 (1 μ M), ONO/GS-4059 (1 μ M), BGB-3111 (0,1 μ M) sowie Evobrutinib (5 μ M). Nach 5 Minuten Vorinkubation bei 37°C zeigte sich die Aggregation nur mild gemindert im Vergleich zur Kontrolle: ACP-196 -15%, ONO/GS-4059 -36%, BGB-3111 -30%, Evobrutinib -35%. Die Vorinkubation der Btk-Inhibitoren für 60 Minuten bei 37°C hingegen resultierte in einer nahezu vollständigen Suppression der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation: -98% (ACP-196), -95% ONO/GS-4059, -97% BGB-3111 und -96% Evobrutinib (siehe Abb. 5C, D, E, F).

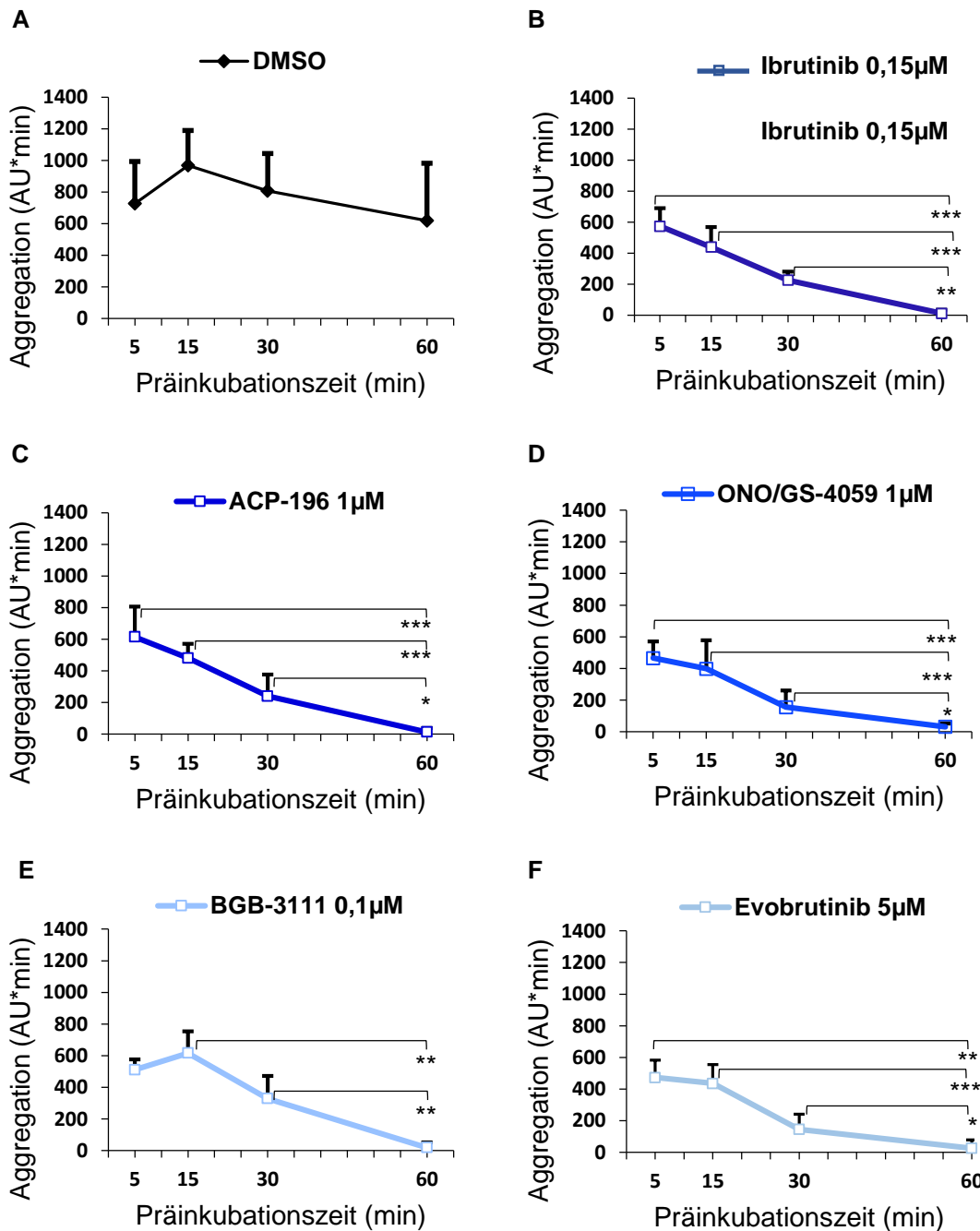


Abbildung 5: Einfluss der Präinkubationszeit auf die durch die Btk-Inhibitoren Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib bedingte Thrombozytenaggregationshemmung nach Stimulation mit Kollagen

Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde jeweils für 5, 15, 30 und 60 Minuten mit DMSO 0,1% (Kontrolle) oder Btk-Inhibitor Ibrutinib (0.15µM), ACP-196 (1µM), ONO/GS-4059 (1µM), BGB-3111 (0.1µM), Evobrutinib (5µM) bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der statischen Thrombozytenaggregation nach Stimulation der Proben mit Kollagen (0,2-0,3µg/ml) über eine Zeitdauer von 10 Minuten. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert ± SD, n=4. Einfacher ANOVA und paarweiser Vergleich der Präinkubationszeit 60min vs. 5, 15 und 30 Minuten nach LSD mit *: p< 0,05, **: p< 0,01 und ***: p< 0,001.

6.2 Aufhebung der Btk-abhängigen Thrombozytenaggregationshemmung nach Stimulation mit steigenden Kollagenkonzentrationen

Zur Untersuchung, ob die durch Btk-Inhibitoren bedingte Hemmung der Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen *in vitro* durch hohe Kollagenkonzentrationen aufgehoben werden kann, wurde Blut mit Btk-Inhibitoren in therapeutischen Konzentrationen Ibrutinib (0,25µM), ACP-196 (2µM), ONO/GS-4059 (2µM) und BGB-3111 (0,4µM) für 60 Minuten präinkubiert und die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit steigenden Kollagenkonzentrationen mittels MEA („multiple electrode aggregometry“) gemessen.

Ibrutinib (0,25µM) bedingte eine Hemmung der statischen Thrombozytenaggregation um 98% nach Stimulation mit Kollagen in einer Konzentration von 0,2µg/ml.

Die Stimulation mit höheren Kollagenkonzentrationen (1µg/ml und 2,5µg/ml) resultierte in einer Abnahme der durch Ibrutinib bedingten Thrombozytenaggregationshemmung. Nach Stimulation mit Kollagen in einer Konzentration von 1µg/ml betrug die Minderung der Thrombozytenaggregation 54%, nach Stimulation mit Kollagen in einer Konzentration von 2,5µg/ml nur 33% (siehe Abb. 6A).

Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich in Anwesenheit der Btk-Inhibitoren zweiter Generation. Auch für Blutproben mit diesen Btk-Inhibitoren konnte eine geminderte Wirkung auf die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen in Abhängigkeit von der eingesetzten Kollagenkonzentration beobachtet werden: Nach Stimulation mit Kollagen in einer Konzentration von 0,2µg/ml zeigte sich die Thrombozytenaggregation um 95% (ACP-196 2µM), 96% (ONO/GS-4059 2µM) und 92% (BGB-3111 0,4µM) gemindert. Die durch Kollagen (1µg/ml) induzierte thrombozytäre Aggregation zeigte sich durch ACP-196 um -45%, ONO/GS-4059 um -56% und BGB-3111 um -40% gemindert. Die Wirkintensität der Btk-Inhibitoren zweiter Generation auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Kollagen in einer Konzentration von 2,5µg/ml zeigte sich um das Dreifache gemindert im Vergleich zur Stimulation mit Kollagen 0,2µg/ml, mit einer Hemmung durch ACP-196 -31%, ONO/GS-4059 -32% und BGB-3111 -29% (siehe Abb. 6B, C, D).

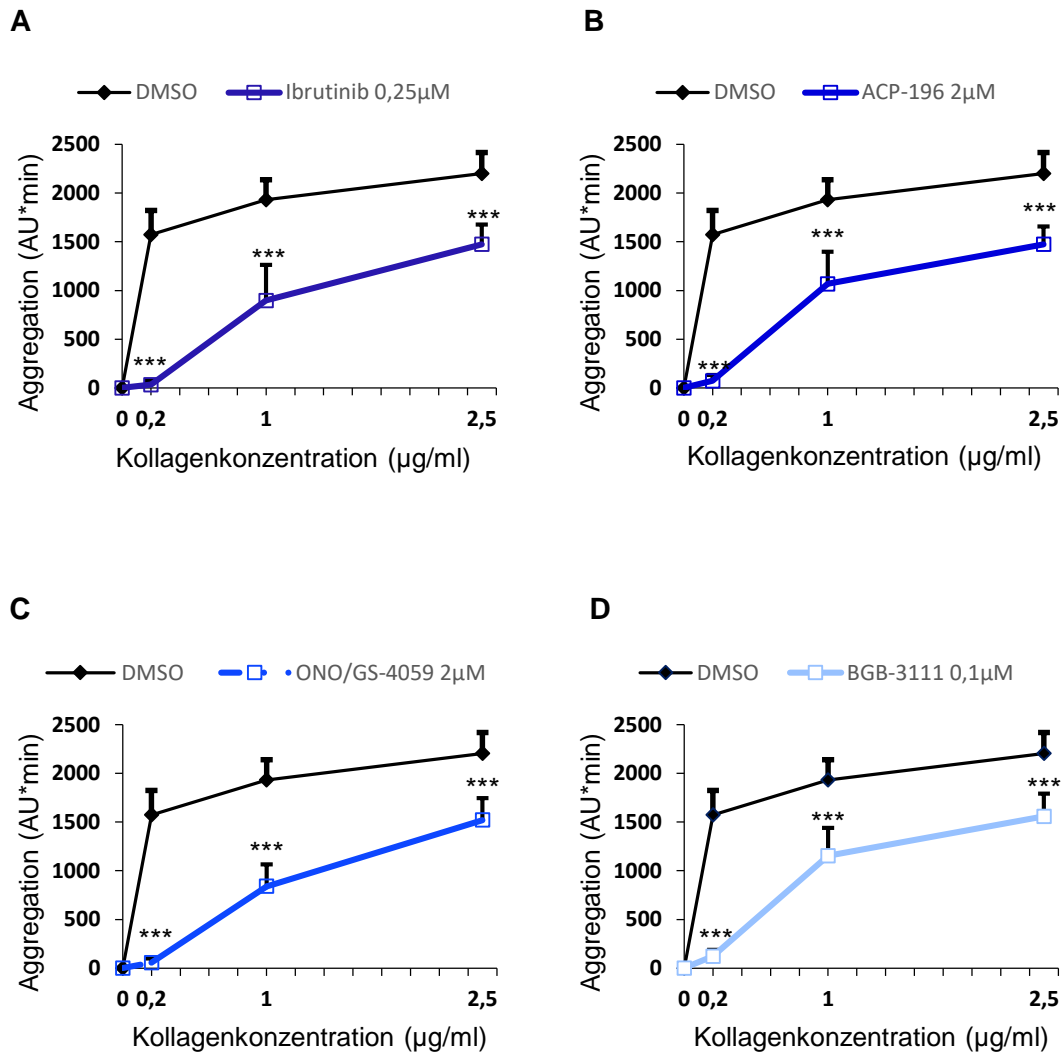


Abbildung 6: Wirkung steigender Kollagenkonzentrationen auf die durch Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059 und BGB-3111 bedingte Thrombozytenaggregationshemmung

Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde für 60 Minuten bei 37°C mit DMSO 0,1% oder Btk-Inhibitor in therapeutischer Konzentration: **(A)** Ibrutinib (0,25µM), **(B)** ACP-196 (2µM), **(C)** ONO/GS-4059 (2µM), **(D)** BGB-3111 (0,4µM) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der statischen Thrombozytenaggregation mittels MEA nach Stimulation der Proben mit Kollagen in steigender Konzentration (0,2 µg/ml, 1µg/ml, 2,5µg/ml) über eine Messdauer von 10 Minuten. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert±SD, n=5. Einfacher ANOVA und paarweisem Vergleich nach LSD mit ***: p< 0,001.

6.3 Hemmung der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation durch Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib

Die Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die von GPIIb/IIIa- und vWF-abhängige Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen wurde durch Messung der thrombozytären Antwort nach Stimulation von Blutproben mit Ristocetin mittels MEA („*multiple electrode aggregometry*“) untersucht. Ristocetin ist ein Antibiotikum, in dessen Anwesenheit Thrombozyten über GPIIb/IIIa an vWF binden, was in einer thrombozytären Aggregation resultiert.^{118,119}

Inkubation der Btk-Inhibitoren für 15 Minuten in der jeweiligen Konzentration, welche eine maximale Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation bewirkte (Ibrutinib 1µM, ACP-196 5µM, ONO/GS-4059 5µM, BGB-3111 2µM, Evobrutinib 10µM), führte auch zu einer Hemmung der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation um >80%. Es ergaben sich keine Wirkunterschiede für die einzelnen Btk-Inhibitoren.

Sowohl für Ibrutinib, als auch für die neuen Btk-Inhibitoren zweiter Generation konnte nach 15 min Präinkubation eine hemmende Wirkung auf die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen gezeigt werden. Ibrutinib (1µM) verminderte die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Ristocetin um -91% im Vergleich zur Kontrolle (DMSO 0,1%). Die Btk-Inhibitoren zweiter Generation führten zu einer Suppression der Aggregation um <90%: ACP-196 (5µM) -84%, ONO/GS-4059 (5µM) -86%, BGB-3111 (2µM) -85%, Evobrutinib -81% (siehe Abb. 7A, B).

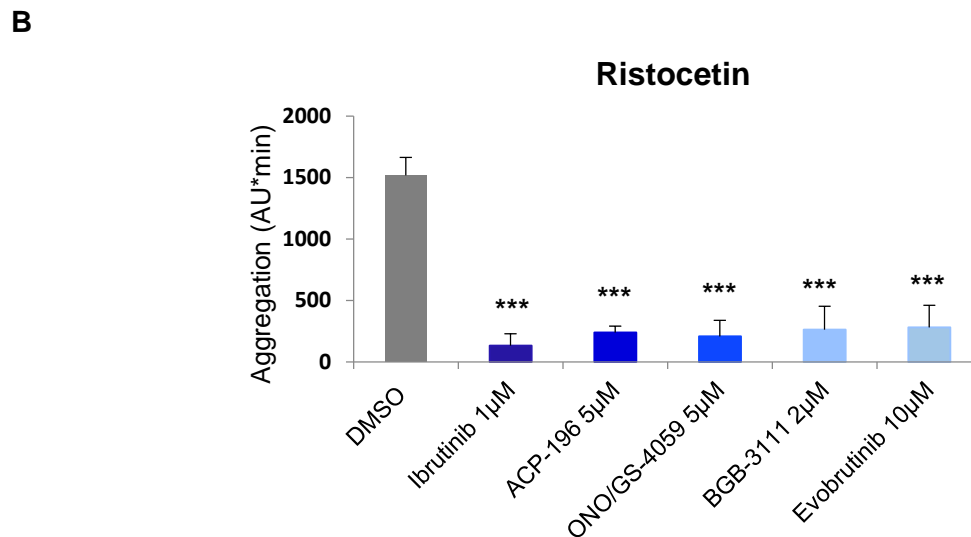
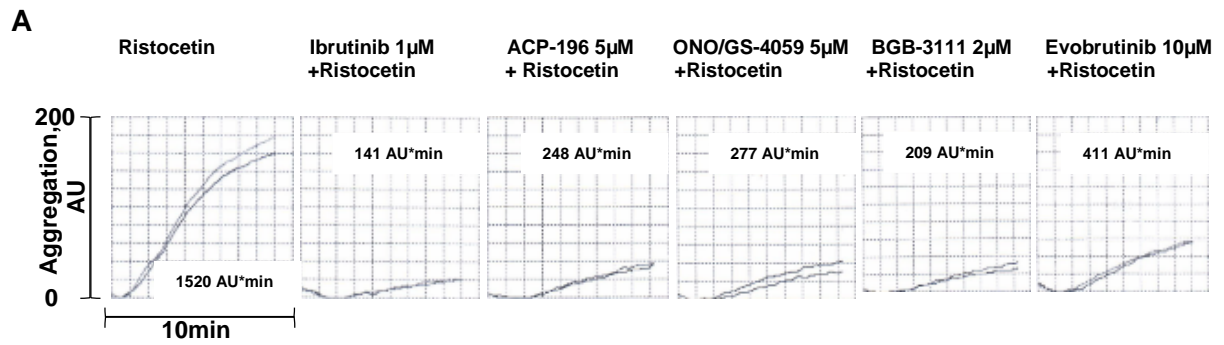


Abbildung 7: Wirkung von Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Ristocetin

(A) Repräsentative MEA-Kurven. **(B)** Balkendiagramm zur Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation. Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde für 15 Minuten bei 37°C mit DMSO 0,1% (Kontrolle) oder Btk-Inhibitor Ibrutinib (1 μ M), ACP-196 (5 μ M), ONO/GS-4059 (5 μ M), BGB-3111 (2 μ M), Evobrutinib (10 μ M) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der statischen Thrombozytenaggregation mittels MEA nach Stimulation der Proben mit Ristocetin (0,5-0,6mg/ml) über eine Zeitdauer von 10 Minuten. Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm SD, n=5. Einfacher ANOVA und paarweisem Vergleich vs. DMSO mit ***: p < 0,001 nach LSD.

6.4 Flussversuch

Eine Hemmung der Fibrinogenbindung an Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ könnte möglicherweise Ursache für das Auftreten von Blutungsereignissen sein. Es wurde bereits beobachtet, dass Ibrutinib das durch Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -vermittelte „*outside-in*“ *Signaling* hemmend beeinflusst.⁸⁵

Es wurden daher die Wirkungen von Ibrutinib und ACP-196 (als Btk-Inhibitor der 2. Generation) auf die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen verglichen. Die Experimente wurden bei arterieller Strömung mit einer Scherrate von 600/s, welche repräsentativ für mittlere Scherraten in Arterien und Arteriolen ist,¹²⁰ durchgeführt. Wesentlich für die Adhäsion der Thrombozyten ist dabei die Interaktion zwischen Fibrinogen und dem thrombozytären Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Besonderes Augenmerk lag darauf, mögliche Unterschiede von Ibrutinib und ACP-196 auf die $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -vermittelte Thrombozytenaktivierung herauszufinden. Dazu wurden die Thrombozyten für 15 Minuten und 60 Minuten mit Konzentrationen der Btk-Inhibitoren vorinkubiert, welche >95% der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation hemmten (siehe Abb. 4 A1, A2, B1, B2).

Inkubation der Thrombozyten mit Ibrutinib (1 μM) für 15 Minuten bei 37°C führte zu einer signifikanten Minderung der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter arterieller Strömung, gemessen am Ausmaß der Oberflächenbedeckung mit Thrombozyten, bei 2,3,4 und 5 Minuten Perfusionszeit im Vergleich zur zeitgleichen Kontrolle (DMSO 0,1%), mit einer maximalen Minderung von -51%. ACP-196 (5 μM) hingegen bedingte unter gleichen Bedingungen keine signifikante Minderung der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter arterieller Strömung (siehe Abb. 8A, B).

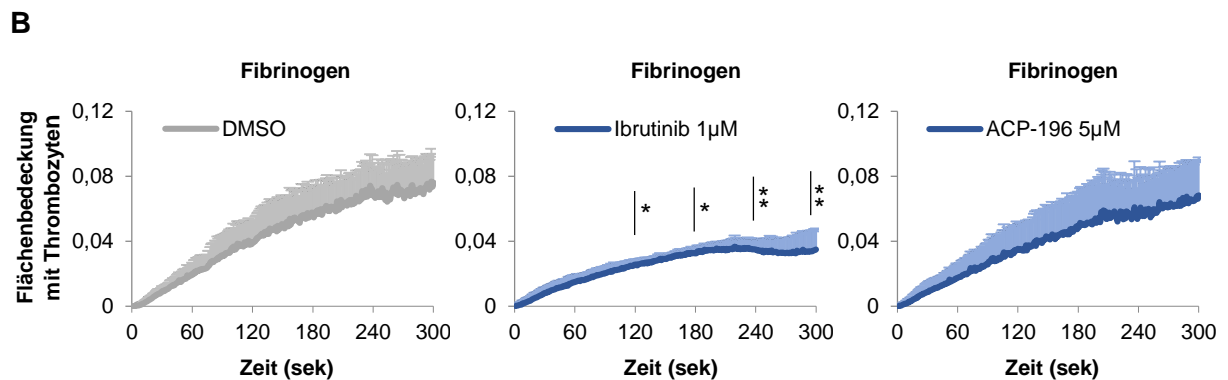
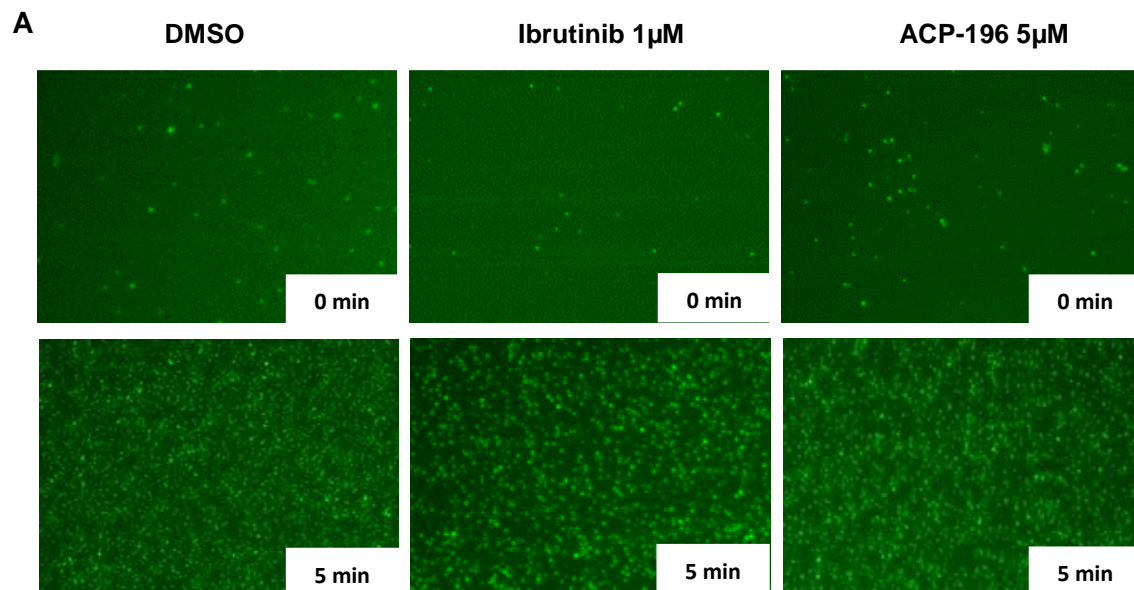


Abbildung 8: Wirkung der Btk-Inhibitoren Ibrutinib und ACP-196 auf die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen unter arterieller Strömung nach vorheriger Inkubation für 15 Minuten bei 37°C

(A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen nach 0 und 5 Minuten nach Beginn der Perfusion bei einer Scherrate von 600/s. **(B)** Darstellung der thrombozytären Flächenbedeckung einer Fibrinogen-beschichteten Oberfläche in Anwesenheit von DMSO (Kontrolle), Ibrutinib (1 μ M) und ACP (5 μ M) unter arterieller Strömung.

Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde mit 3,3'- Dihexyloxacarbocyanin-Jodid (DiOC6) (1 μ M) zur Anfärbung der Thrombozyten und DMSO 0,1% (Kontrolle), Ibrutinib (1 μ M) oder Acalabrutinib (5 μ M) für 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Blut mit einer Scherrate von 600/s über eine Fibrinogen (200 μ g/ml)-benetzte Oberfläche perfundiert und die Thrombozytenaggregation mittels Videomikroskopie kontinuierlich (1Bild/sek) über 5 Minuten aufgenommen. Ergebnisse sind angegeben als MW \pm SD, n=6. *: p<0,05, **:p< 0,01 nach gepaartem t-Test vs. zeitgleiche Kontrolle (DMSO).

Nach therapeutischer, oraler Applikation der Btk-Inhibitoren ist die Exposition gegenüber Thrombozyten verlängert und könnte in einer stärkeren Hemmung der Btk resultieren. Inkubation von Thrombozyten mit fünffach niedrigerer Konzentration der Btk-Inhibitoren für 60 Minuten beeinflusste die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen kaum (siehe Abb. 9).

Ibrutinib (0,2 μ M) bewirkte nach 60 Minuten Präinkubation eine signifikante Minderung der α IIb β 3-abhängigen Thrombozytenadhäsion unter Blutfluss nur bei 5 Minuten Perfusionszeit im Vergleich zur zeitgleichen Kontrolle (DMSO 0,1%) mit einer maximalen Minderung um 44%. ACP-196 (1 μ M) hingegen bedingte unter gleichen Bedingungen keine signifikante Hemmung der α IIb β 3-vermittelten Thrombozytenadhäsion (siehe Abb. 9A, B).

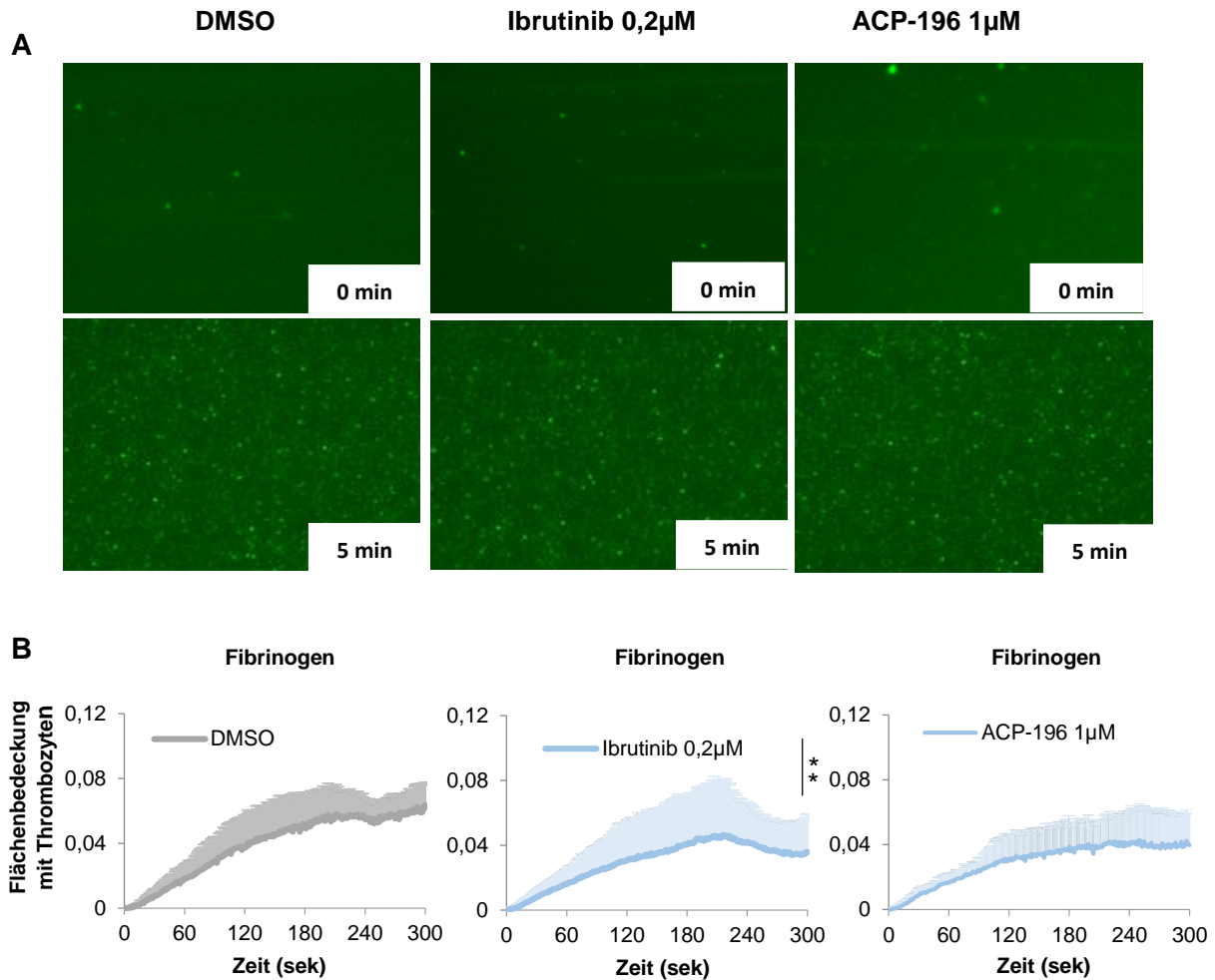


Abbildung 9: Wirkung der Btk-Inhibitoren Ibrutinib und ACP-196 auf die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen unter arterieller Strömung nach vorheriger Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C

(A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen nach 0 und 5 Minuten nach Beginn der Perfusion bei einer Scherrate von 600/s. **(B)** Darstellung der thrombozytären Flächenbedeckung einer Fibrinogen-beschichteten Oberfläche in Anwesenheit von DMSO (Kontrolle), Ibrutinib (0,2µM) und ACP (1µM) unter arterieller Strömung.

Zur Durchführung, siehe Legende Abb 8. Ergebnisse sind angegeben als MW±SD, n=6. **:p< 0,01 nach gepaartem t-Test vs. zeitgleiche Kontrolle (DMSO).

6.5 Wirkung der Btk-Inhibitoren Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib auf die *in vitro* Blutungszeit

Um zu testen, ob die Btk-Inhibitoren zu einer Verlängerung der Blutungszeit führen, wurden Messungen mit dem „platelet function analyzer“ PFA-200® durchgeführt. Dieser simuliert die primäre Hämostase *in vitro* und wird im klinischen Alltag eingesetzt, mögliche Blutungsrisiken abzuschätzen. Zur Messung einer erhöhten Blutungsneigung, insbesondere unter Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS®), wird die Kollagen/Epinephrin-Kartusche verwendet.^{115,121}

Inkubation von Citrat-Blut mit Ibrutinib (0,5µM), ACP-196 (2µM) und ONO/GS-4059 (2µM) für 15min, welche die durch niedrige Kollagenkonzentrationen induzierte Thrombozytenaggregation um 86%, 70% und 67% hemmten, führten zu keiner signifikanten Verlängerung der *in vitro* Blutungszeit bei Verwendung der Kollagen/Epinephrin-Kartusche (siehe Abb. 10).

Höhere Konzentrationen der Btk-Inhibitoren: Ibrutinib (1µM), ACP-196 (5µM) und ONO/GS-4059 (5µM) verlängerten die Blutungszeit hingegen signifikant, mit mittleren Verschlusszeiten von 244±62 Sekunden, 215±72 Sekunden und 224±60 Sekunden.

BGB-3111 (1µM) und Evobrutinib (10µM) bedingten unter gleichen Versuchsbedingungen keine signifikante Verlängerung der *in vitro* Blutungszeit und DMSO (0,1%) zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Blutungszeit (siehe Abb. 10, 11).

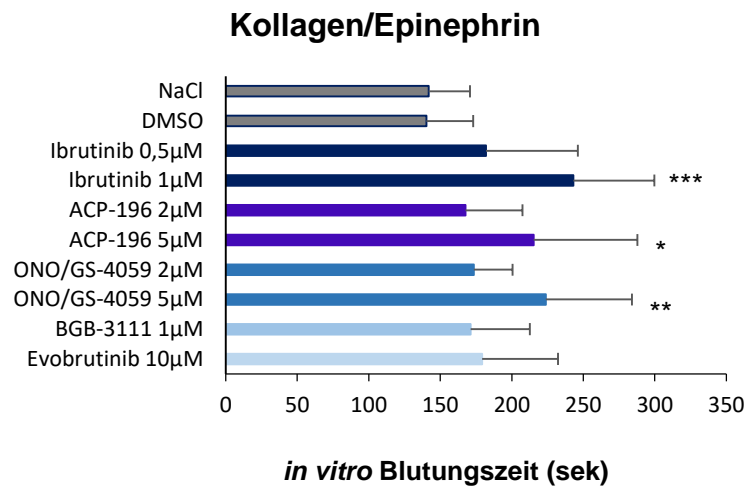


Abbildung 10: Wirkung von Ibrutinib und Btk-Inhibitoren zweiter Generation auf die *in vitro* Blutungszeit

Citratblut wurde mit DMSO 0,1% (Kontrolle) oder Btk-Inhibitor Ibrutinib (1, 0,5µM), ACP-196 (2, 5µM), ONO/GS-4059 (2, 5µM), BGB-3111 (1µM) und Evobrutinib (10µM) bei 37°C im Wasserbad für 15 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die Proben in Kollagen/Epinephrin-Kartuschen überführt und die *in vitro* Blutungszeit mit dem „platelet function analyzer“ PFA-200® gemessen. Ergebnisse sind angegeben als MW±SD, n=8. Einfacher ANOVA mit paarweisem Vergleich vs. DMSO mit *: p< 0,05 nach Bonferroni.

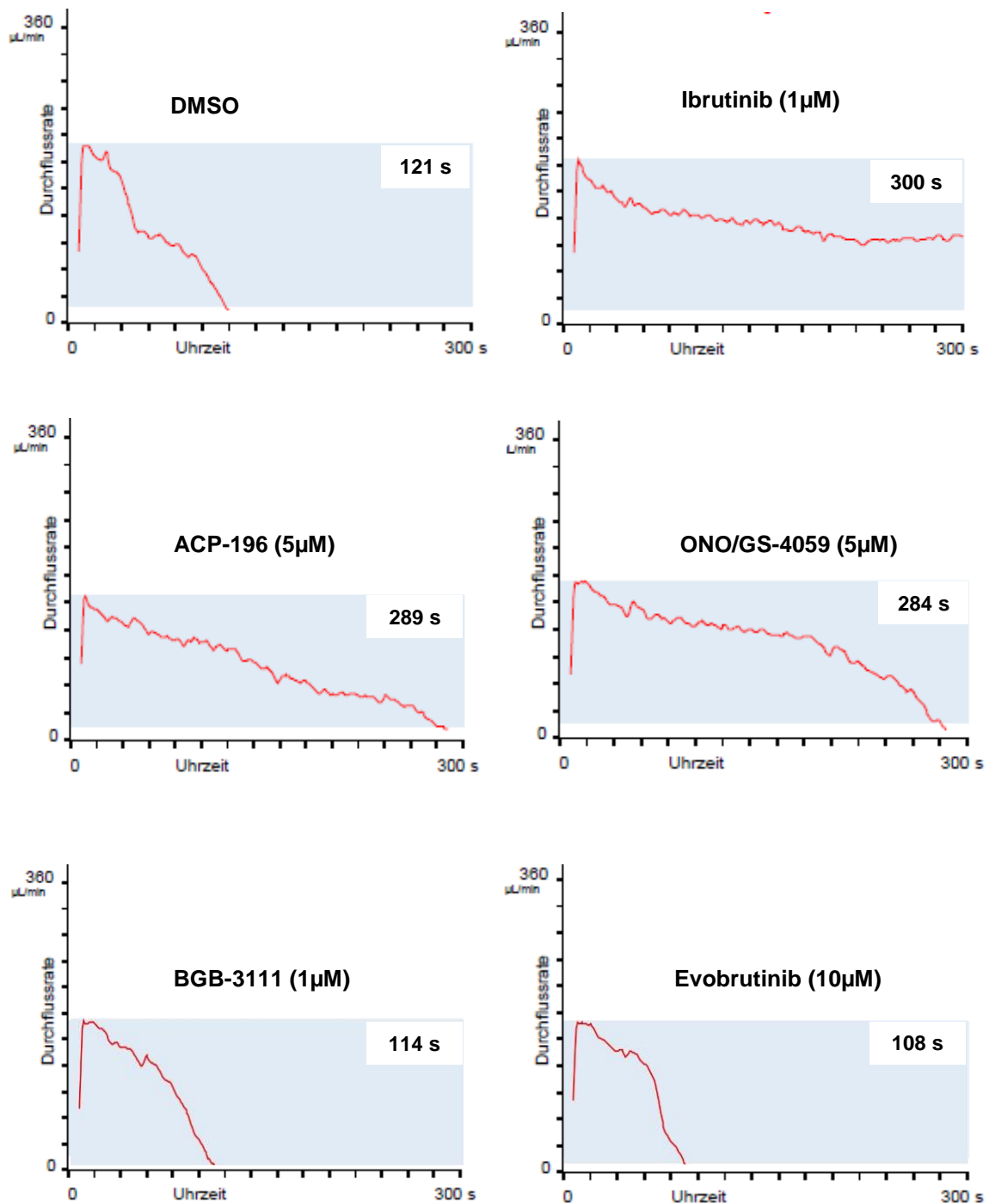


Abbildung 11: Repräsentative PFA-Kinetiken. Wirkung verschiedener Btk-Inhibitoren

Citratblut wurde mit DMSO 0,1% (Kontrolle) oder Btk-Inhibitor Ibrutinib (1, 0,5µM), ACP-196 (5µM), ONO/GS-4059 (5µM), BGB-3111 (1µM) und Evobrutinib (10µM) bei 37°C im Wasserbad für 15 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die Proben in Kollagen/Epinephrin-Kartuschen überführt und die *in vitro* Blutungszeit mit dem „platelet function analyzer“ PFA-200® gemessen.

7 Diskussion

Die pharmakologische Hemmung der Btk hat sich als erfolgreiche Strategie zur Behandlung B-Zell-lymphoproliferativer Erkrankungen erwiesen.

Ibrutinib ist als erster oraler Btk-Inhibitor für die Therapie der CLL sowie des Mantelzelllymphoms zugelassen. Jedoch ist die Therapie mit Ibrutinib assoziiert mit einem erhöhten Blutungsrisiko unter Patienten, was zur Entwicklung einer zweiten Generation an Btk-Inhibitoren, mit erhöhter Selektivität für Btk und in ersten klinischen Studien scheinbar geringerem Blutungsrisiko geführt hat.^{76,78,90} Seit November 2017 ist Acalabrutinib (ACP-196) in den USA für die Therapie des Mantelzelllymphoms zugelassen.⁹¹

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Ibrutinib und vier neuer Btk-Inhibitoren (ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib) auf die GPVI- und GPIIb-abhängige Thrombozytenaggregation und die *in vitro* Blutungszeit untersucht, um herauszufinden, welche Effekte Ibrutinib im Vergleich zu Btk-Inhibitoren zweiter Generation auf thrombozytäre Signalkaskaden hat und wie diese die Hämostase beeinflussen.

Zusätzlich wurde die Wirkung von Ibrutinib und Acalabrutinib auf die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen unter arterieller Blutströmung untersucht.

7.1 Einfluss der Btk-Inhibitoren auf die GPVI- und GPIIb- abhängige Thrombozytenaggregation

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass niedrige Konzentrationen von Ibrutinib und den neuen Btk-Inhibitoren zweiter Generation ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 sowie Evobrutinib dosisabhängig die GPVI-abhängige, Kollagen-vermittelte Thrombozytenaggregation hemmen, welche verantwortlich für die durch atherosklerotischen Plaque induzierte Thrombusbildung ist. Für Experimente dieser Arbeit wurden submaximale Kollagenkonzentrationen (0,2-0,5µg/ml) verwendet, die ein ähnliches, submaximales Ausmaß der GPVI-vermittelten Thrombozyten-

aggregation induzierten wie nach Stimulation mit maximalen Konzentrationen atherosklerotischen Plaquematerials beobachtet wurde.¹⁰⁸

Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 Minuten simuliert möglicherweise die *in vivo* Situation nach oraler Applikation der Btk-Inhibitoren aufgrund der Kinetik ihrer Resorption besser. Die verlängerte Inkubationszeit resultierte in einer Wirkverstärkung aller Btk-Inhibitoren auf die Hemmung der GPVI-abhängigen Thrombozytenaktivierung. Die IC₅₀-Werte lagen um das fünffache (ACP-196), siebenfache (ONO/GS-4059) und zwölffache (Ibrutinib) unterhalb der maximalen Plasmakonzentrationen, welche nach antiproliferativer, therapeutischer Dosierung der Btk-Inhibitoren im Patientenblut erreicht werden (siehe Tabelle 1).

Für die geringgradige Aktivierung der GPVI-Signalkaskade ist insbesondere die Aktivierung von Btk und nicht von Tec essentiell wie in Untersuchungen an XLA-Patienten und Btk-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte.^{40,62} Auch die kürzlich veröffentlichte Studie von Chen et al zeigte, dass nach Stimulation von Thrombozyten mit Kollagen in submaximaler Konzentration die Hemmung von Btk und nicht von Tec verantwortlich ist für die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch insgesamt 12 untersuchte Btk-Inhibitoren. Die Konzentration der Btk-Inhibitoren, welche die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unterdrückte, korrelierte mit der Btk-Inhibitor-Konzentration in *in vitro* Kinase assays, welche hemmend auf die Btk, nicht jedoch die Kinase Tec wirkte.⁹³

Durch Erhöhung der Kollagenkonzentration kann die durch Btk-Inhibitoren induzierte Hemmung der submaximalen GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung aufgehoben werden (siehe Abb. 5). Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Aktivierung der zu Btk homologen Kinase Tec, welche nach Thrombozytenstimulation mit hohen Kollagenkonzentrationen die Abwesenheit (bei XLA-Patienten) oder Hemmung von Btk innerhalb der GPVI-Signalkaskade kompensieren kann.⁶³

Die kompensatorische Rolle der Kinase Tec konnte durch Untersuchungen an Mäusen belegt werden. Die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation von sowohl Btk-, als auch Tec-defizienten Thrombozyten von Mäusen zeigte sich stärker gehemmt, als die Aggregation nur Btk-defizienter Thrombozyten.⁴⁰ Die Hemmung beider Kinasen, Btk und Tec, lässt somit eine stärkere Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch eine möglicherweise komplette Hemmung der GPVI- und GPIIb-abhängigen Signalübertragung vermuten.^{40,83}

Neben der GPVI-abhängigen Thrombozytenaktivierung spielt Btk auch eine Rolle innerhalb der vWF/GPIIb abhängigen Signalkaskade, was durch Versuche an Mensch und Mäusen belegt werden konnte.^{23,82,87}

Die durch Ristocetin induzierte Thrombozytenaggregation^{118,119} zeigte sich durch Ibrutinib⁸⁷ sowie durch die Btk-Inhibitoren zweiter Generation ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib gehemmt (siehe Abb. 6).

In zwei weiteren Studien zeigten Thrombozyten, welche von mit Ibrutinib behandelten Patienten gewonnen wurden, eine verminderte Adhäsion an vWF unter arterieller Strömung⁸² sowie eine verminderte Aktivierung nach Stimulation der vWF-abhängigen Aggregation mit Ristocetin unter statischen Bedingungen, welche assoziiert war mit einer erhöhten Blutungsneigung unter den Patienten.⁸⁷ Unter hoher arterieller Strömung wird die Interaktion von Thrombozyten mit verletzter Gefäßwand wesentlich vermittelt durch die Bindung von vWF an dessen Rezeptor, den thrombozytären GP IIb-V-III-Komplex.⁴⁻⁶

Diese Beobachtungen sind vereinbar mit Untersuchungen an Blut von CLL-Patienten durch Lipsky et al, welche herausfanden, dass höhere Level an vWF (>100 IE/dl) das Blutungsrisiko unter Therapie mit Ibrutinib vermindern.⁸⁸

Unter Einbeziehung der unterschiedlichen Plasmakonzentrationen, welche nach oraler Applikation unter Therapie erreicht werden, konnten keine Wirkunterschiede von Ibrutinib und den neuen Btk-Inhibitoren ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib auf die Hemmung der Kollagen- und Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation festgestellt werden.

7.2 Einfluss der Btk-Inhibitoren auf die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter arteriellen Flussbedingungen

Im Gegensatz zu den neuen Btk-Inhibitoren zweiter Generation konnten für Ibrutinib *off-target* Wirkungen auf andere Protein-Kinasen nachgewiesen werden. Somit könnte die Akkumulation hoher Ibrutinib-Konzentrationen in Thrombozyten von Patienten nach Hochdosistherapie eine *off-target* Hemmung von Kinasen der Src Familie (z.B. Lyn) bewirken, was möglicherweise in einer verminderten Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen via Integrin α IIb β 3 resultiert und somit mögliche Ursache für die unter Therapie mit Ibrutinib auftretenden Blutungen ist.^{79,83,85}

Es wurde bereits nachgewiesen, dass Ibrutinib das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -vermittelte „*outside-in*“ *Signaling* unter arterieller Strömung hemmend beeinflusst, was in der Hemmung der Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen und der Bildung instabiler Thrombozytenaggregate resultiert.⁸⁵ Die Bindung von Fibrinogen an das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und das dadurch hervorgerufene „*outside-in*“ *Signaling* mit Aktivierung von Kinasen der Src-Familie³⁵ bedingt eine Verstärkung der Thrombozytenaktivierung durch Generierung positiver *Feedback*-Mechanismen auf andere thrombozytäre Signalkaskaden und gewährleistet die Bildung stabiler Thrombi durch Vernetzung benachbarter Thrombozyten.¹²

Um die Ursache für die erhöhte Blutungsneigung unter Therapie mit Ibrutinib sowie die Wirkung auf Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung im Vergleich zu Btk-Inhibitoren zweiter Generation zu verstehen, wurde die Wirkung von Ibrutinib sowie ACP-196, als Vertreter der Btk-Inhibitoren zweiter Generation, auf die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter arterieller Strömung analysiert.

Dazu wurde die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, welches $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -abhängiges „*outside-in*“ *Signaling* hervorruft unter arterieller Strömung analysiert. Von wesentlichem Interesse war die Überlegung, ob die unter Therapie mit Ibrutinib beobachteten Blutungsereignisse im Vergleich zu Btk-Inhibitoren zweiter Generation möglicherweise durch Unterbrechung der Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -vermittelten „*outside-in*“ Signalkaskade zu erklären sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter arterieller Strömung in Anwesenheit von Ibrutinib (1 μM) im Vergleich zur Kontrolle (DMSO 0,1%) nach 15 Minuten Vorinkubation der Proben signifikant vermindert war. Unter Anwesenheit von ACP-196 (5 μM) hingegen zeigte sich die Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen unter arterieller Strömung nicht signifikant gemindert im Vergleich zur Kontrolle.

Die deutlich verminderte Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertes Fibrinogen durch 1 μM Ibrutinib lässt schließen, dass Ibrutinib in dieser Konzentration die Src Kinasen abhängige, durch Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -vermittelte „*outside-in*“ Signalkaskade hemmend beeinflusst. Die Beobachtung von Bye et al, dass Ibrutinib, nicht jedoch Acalabrutinib, in hohen Konzentrationen die Aktivierung von Src Kinasen nach Stimulation des GPVI-Rezeptors mittels CRP hemmt,⁸³ könnte als mögliche Erklärung für die Ergebnisse dienen.

Untersuchungen an Mäusen mit genetisch verändertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Rezeptor und dadurch bedingtem Defekt des „*outside-in*“ *Signaling* zeigten eine gehemmte Thrombozytenaggregation sowie Gerinnselbildung *in vitro* sowie eine erhöhte Blutungsneigung *in vivo*, welche durch instabile Thrombusbildung und vermehrte Tendenz zu Nachblutungen charakterisiert ist.¹²² Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der Bildung instabiler Thromben unter Fluss durch Ibrutinib *in vitro* und auch bei manchen Patienten unter Ibrutinib-Therapie.⁸³

Bei Untersuchungen nach Inkubation der Btk-Inhibitoren Ibrutinib und ACP-196 in therapeutischen Konzentrationen von Ibrutinib (0,2 μM) und ACP-196 (1 μM) im Blut für 60 Minuten, welche möglicherweise deren *in vivo* Wirkung nach oraler Therapie besser simuliert, war die Adhäsion an Fibrinogen durch Ibrutinib nur gering gemindert. Unter Anwesenheit von niedrig dosiertem ACP-196 (1 μM) konnte, wie im Versuchsansatz mit 15 Minuten Vorinkubation, ebenfalls keine signifikante Minderung der Thrombozytenadhäsion beobachtet werden (siehe Abb. 8, Abb. 9).

Die Ursache für die fehlende Hemmung der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen durch ACP-196 kann möglicherweise durch die Abwesenheit der *off-target* Wirkung auf Src-Kinasen, welche für die neuen Btk-Inhibitoren zweiter Generation nachgewiesen wurde, erklärt werden.

7.3 Einfluss der Btk-Inhibitoren auf die *in vitro* Blutungszeit

Die Messung der *in vitro* Blutungszeit mittels „*platelet function analyzer*“ PFA-200® ist ein spezielles Verfahren, das zur Analyse der Thrombozytenfunktion sowie zur Messung eines erhöhten Blutungsrisikos eingesetzt wird. Die Kollagen/Epinephrin-Kartusche wird dabei häufig verwendet, um die Wirkung und Einnahme von Acetylsalicylsäure (ASS) zu überwachen.^{115,121} Auch die Wirkung der Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GP-IIb/IIIa)-Antagonisten auf die Thrombozytenfunktion, welche eine Verlängerung der Verschlusszeit bei Verwendung der Kollagen/Epinephrin-, als auch der Kollagen/ADP-Messzelle bedingen, lässt sich mittels PFA-200®-Messung nachweisen.¹²³

Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass niedrige Konzentrationen der Btk-Inhibitoren Ibrutinib (0,5 μM), ACP-196 (2 μM) und ONO/GS-4059 (2 μM), welche eine Hemmung der submaximalen GPVI-abhängigen Thrombozytenaktivierung um >95%

nach Stimulation mit niedrigen Kollagenkonzentrationen bewirkten, keine Zunahme der *in vitro* Blutungszeit bei Verwendung der Kollagen/Epinephrin-Kartusche verursachten (siehe Abb. 11, 12). Diese Konzentrationen entsprechen dem nach oraler Therapie mit Ibrutinib, ACP-196 und ONO/GS-4059 erreichten therapeutischen Medikamentenspiegel im Blut von Patienten. Die maximale Plasmakonzentration nach oraler Einnahme von Ibrutinib in einer Dosis von 420mg täglich entspricht 0,31µM. Nach zweimal täglicher oraler Einnahme von 100mg ACP-196 wird eine maximale Plasmakonzentration von 1,78µM erreicht und die Einnahme einer in klinischen Untersuchungen eingesetzten täglichen Dosis von 320mg ONO/GS-4059 führt zu einer maximalen Plasmakonzentrationen von 1,95µM (siehe Tabelle 1).^{75,93,96,117}

Eine moderate Zunahme der *in vitro* Blutungszeit ergab sich bei 2-2,5fach höheren Konzentrationen der Btk-Inhibitoren (Ibrutinib 1µM, ACP-196 5µM und ONO/GS-4059 5µM), nicht jedoch bei BGB-3111 (1µM) und Evobrutinib (10µM).

Die Ursache der beobachteten Blutungsereignisse unter Therapie mit Ibrutinib ist komplex.^{79,88} Gemäß neueren Studien treten auch bei Patienten unter Therapie mit neuen Btk-Inhibitoren ACP-196 und ONO/GS-4059 geringgradige Blutungsereignisse in ähnlicher Häufigkeit wie unter Therapie mit Ibrutinib auf.^{91,96} Eine mögliche Ursache für Blutungen ist die für die Therapie B-Zell-abhängiger Erkrankungen erforderliche hohe therapeutische Konzentration der Btk-Inhibitoren, welche nicht nur Btk, sondern auch Tec in Thrombozyten hemmt und somit eine komplette Hemmung der GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung bedingt.^{40,63,83,94}

Die Hemmung der submaximalen GPVI-abhängigen Thrombozytenaktivierung durch niedrige Btk-Inhibitor-Konzentrationen, welche nicht mit einer Verlängerung der *in vitro* Blutungszeit einhergeht (siehe Abb. 4, Abb. 10), ist vereinbar mit einem fehlenden Blutungsphänotyp von XLA-Patienten. Trotz nachgewiesenem genetischem Btk-Defizit und einer verminderten GPVI-abhängigen Thrombozytenaggregation haben XLA-Patienten kein erhöhtes Blutungsrisiko.^{43,44,62,63,88} Die Btk-Hemmung in XLA-Patienten entspricht somit der Hemmung der submaximalen GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung durch niedrige Btk-Inhibitor-Konzentrationen, welche dadurch selektiv Btk, nicht jedoch die Kinase Tec hemmen.

Unter Berücksichtigung der nach verlängerter Inkubationszeit der Btk-Inhibitoren ermittelten niedrigen IC₅₀-Werte, welche weit unterhalb der nach Therapie von malignen B-Zellerkrankungen erreichten Plasmakonzentrationen liegen, lässt sich folgern, dass durch Einsatz niedrig dosierter Btk-Inhibitoren eine ausreichende

irreversible Hemmung der Btk erzielt werden kann und die submaximale GPVI-abhängige Thrombozytenaktivierung, welche von entscheidender Bedeutung für die Entstehung der Atherothrombose ist, unterbunden werden kann ohne dabei eine Zunahme der Blutungszeit zu bewirken.

8 Zusammenfassung

Ibrutinib und ACP-196 sind zugelassen für die Therapie B-Zell-abhängiger, maligner Erkrankungen und weitere Btk-Inhibitoren befinden sich derzeit in klinischen Studien zur Therapie von B-Zell-Malignomen (ONO/GS-4059, BGB-3111) und B-Zell-abhängiger Autoimmunerkrankungen wie der Multiple Sklerose (Evobrutinib).

In Thrombozyten vermittelt Btk die Thrombozytenaktivierung via GPVI, welches verantwortlich für die durch atherosklerotischen Plaque induzierte Thrombusbildung ist. Der GPVI- sowie der GPIIb-Signalweg kann durch Btk-Inhibitoren gehemmt werden.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Ibrutinib und vier neuer Btk-Inhibitoren auf die GPVI-vermittelte Thrombozytenaggregation und die *in vitro* Blutungszeit verglichen. Um eine ähnliche, submaximale Aktivierung der GPVI-vermittelten Thrombozytenaggregation, wie sie nach Stimulation mit atherosklerotischem Plaquematerial induziert wird, zu erhalten, wurden für die Experimente dieser Arbeit geringe Kollagenkonzentrationen (0,2-0,5µg/ml) verwendet. Die Btk-Inhibitoren zeigten eine unterschiedliche Wirksamkeit für die Hemmung der Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation. Entsprechend ihren IC₅₀-Werten (nach 15 Minuten Präinkubation) war Ibrutinib der wirksamste Btk-Inhibitor (IC₅₀ 0,12µM), gefolgt von BGB-3111 (0,51µM), ONO/GS-4059 (1,2µM), ACP-196 (1,21µM) und Evobrutinib (5,84µM).

Konzentrationen der Btk-Inhibitoren Ibrutinib 0,5µM, ACP-196 2µM und ONO/GS-4059 2µM, welche den maximalen Plasmakonzentrationen von mit Btk- Inhibitoren behandelten Patienten entsprechen, führten zu einer deutlichen Hemmung (>70%) der GPVI-abhängigen Thrombozytenaggregation, nicht jedoch zu einer Verlängerung der Blutungszeit, gemessen im PFA-200 unter Verwendung der Kollagen/Epinephrin-

Kartusche. Eine signifikante, aber moderate Verlängerung der *in vitro* Blutungszeit zeigte sich erst bei 2-2,5fach höheren Konzentrationen dieser Btk-Inhibitoren.

BGB-3111 (1 μ M) und Evobrutinib (10 μ M), deren therapeutische Plasmakonzentration unbekannt sind, hemmten ebenfalls deutlich die GPVI-abhängige Thrombozytenaggregation ohne zu einer Verlängerung der Blutungszeit zu führen. Alle Btk-Inhibitoren hemmten auch die Ristocetin-induzierte vWF/GPIIb-vermittelte Aggregation.

Die Verlängerung der Inkubationszeit der Btk-Inhibitoren im Blut auf 60 Minuten reduzierte die IC₅₀-Werte der Btk-Inhibitoren auf die GPVI-vermittelte Thrombozytenaggregation um das 5-fache (Acalabrutinib), 7-fache (ONO/GS-4059) und 12-fache (Ibrutinib). Die IC₅₀-Werte lagen dann weit unter der antiproliferativ wirkenden, therapeutischen Plasmakonzentration der Btk-Inhibitoren (soweit bekannt).

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen maximalen Plasmaspiegel, welche unter Therapie nach oraler Applikation der Btk-Inhibitoren erreicht werden, konnten keine Unterschiede zwischen Ibrutinib und den neuen Btk-Inhibitoren ACP-196 und ONO/GS-4059 hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Kollagen- und Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation sowie (in höheren eingesetzten Konzentrationen) auf die *in vitro* Blutungszeit festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass niedrige, für derzeitige Indikationen subtherapeutische Plasmaspiegel der Btk-Inhibitoren selektiv und effektiv Btk und damit die GPVI-abhängige Thrombozytenaggregation, welche eine entscheidende Rolle bei der Atherothrombose spielt, hemmen ohne dabei die primäre Hämostase zu beeinflussen. Diese Erkenntnis und die Beobachtung, dass Btk-Inhibitoren die durch atherosklerotischen Plaque induzierte Plättchenthrombusbildung selektiv hemmen,¹⁰⁸ könnten den Weg bahnen, um in naher Zukunft irreversible Btk-Inhibitoren in niedriger Dosierung in klinischen Untersuchungen bei kardiovaskulären Patienten zur Prävention und Behandlung akuter atherothrombotischer Ereignisse zu untersuchen.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Mechanismus der Thrombozytenadhäsion an subendotheliales Kollagen nach Gefäßverletzung und nachfolgende Thrombozytenaggregation (verändert nach „Ruggeri, Platelets in atherothrombosis, Nat. Med, Nov 2002“)6

Abbildung 2: Bruton Tyrosin Kinase (Btk)- Struktur und interagierende Partner (verändert nach Mohamed et al. „Bruton’s tyrosine kinase (Btk): function, regulation and transformation with special emphasis on the PH domain“, Immunol. Rev., 2009)..... 12

Abbildung 3: Btk-Signaltransduktion (verändert nach Akinleye et al. „Ibrutinib und novel BTK inhibitors in clinical development“, Journal of Hematology&Oncology 2013) 14

Tabelle 1: Halbmaximale inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) der Btk-Inhibitoren auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und Vergleich mit antiproliferativer, therapeutischer Plasmakonzentration.....38

Abbildung 4: Wirkung von Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4056, BGB-3111 und Evobrutinib auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Kollagen40

Abbildung 5: Einfluss der Präinkubationszeit auf die durch Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059 und BGB-3111 bedingte Thrombozytenaggregationshemmung nach Stimulation mit Kollagen..... 44

Abbildung 6: Wirkung steigender Kollagenkonzentrationen auf die durch Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059 und BGB-3111 bedingte Thrombozytenaggregationshemmung 46

Abbildung 7: Wirkung von Ibrutinib, ACP-196, ONO/GS-4059, BGB-3111 und Evobrutinib auf die Thrombozytenaggregation durch Ristocetin 42

Abbildung 8: Wirkung der Btk-Inhibitoren Ibrutinib und ACP-196 auf die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen unter arterieller Strömung nach vorheriger Inkubation für 15 Minuten bei 37°C..... 48

Abbildung 9: Wirkung der Btk-Inhibitoren Ibrutinib und ACP-196 auf die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen unter arterieller Strömung nach vorheriger Inkubation für 60 Minuten bei 37°C..... 50

Abbildung 10: Wirkung von Ibrutinib und Btk-Inhibitoren zweiter Generation auf die *in vitro* Blutungszeit 52

Abbildung 11: Repräsentative PFA-Kinetiken. Wirkung verschiedener Btk-Inhibitoren 53

10 Literaturverzeichnis

1. Sorrentino S, Studt JD, Medalia O, Tanuj Sapra K. Roll, adhere, spread and contract: structural mechanics of platelet function. *Eur J Cell Biol.* Mar-Apr 2015;94(3-4):129-138.
2. Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med (Berl).* Feb 2011;89(2):109-121.
3. Herr AB, Farndale RW. Structural insights into the interactions between platelet receptors and fibrillar collagen. *J Biol Chem.* Jul 24 2009;284(30):19781-19785.
4. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* Sep 4 1998;94(5):657-666.
5. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost.* Jul 2003;1(7):1602-1612.
6. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* Jan 26 1996;84(2):289-297.
7. Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res.* 2007;120 Suppl 1:S5-9.
8. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Mar 2008;28(3):403-412.
9. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res.* Jun 22 2007;100(12):1673-1685.
10. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell.* Sep 12 1986;46(6):913-920.
11. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, de Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost.* Apr 2004;2(4):561-573.
12. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* Apr 15 1998;91(8):2645-2657.
13. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* Nov 2002;8(11):1227-1234.
14. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* Jul 15 2003;102(2):449-461.
15. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res.* Dec 8 2006;99(12):1293-1304.
16. Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation.* Oct 12 1999;100(15):1667-1672.
17. Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov.* Jan 2003;2(1):15-28.
18. Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J Thromb Haemost.* Apr 2013;11(4):605-614.
19. Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal.* Dec 2004;16(12):1329-1344.
20. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost.* Jul 2003;1(7):1335-1342.
21. Asazuma N, Ozaki Y, Satoh K, et al. Glycoprotein Ib-von Willebrand factor interactions activate tyrosine kinases in human platelets. *Blood.* Dec 15 1997;90(12):4789-4798.

22. Gibbins JM. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci.* Jul 15 2004;117(Pt 16):3415-3425.
23. Liu J, Fitzgerald ME, Berndt MC, Jackson CW, Gartner TK. Bruton tyrosine kinase is essential for botrocetin/VWF-induced signaling and GPIb-dependent thrombus formation in vivo. *Blood.* Oct 15 2006;108(8):2596-2603.
24. Kleinschnitz C, De Meyer SF, Schwarz T, et al. Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke. *Blood.* Apr 9 2009;113(15):3600-3603.
25. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation.* May 1 2007;115(17):2323-2330.
26. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* Aug 2005;3(8):1752-1762.
27. Watson SP, Gibbins J. Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol Today.* Jun 1998;19(6):260-264.
28. Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, Takayama H. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. *J Exp Med.* Jul 20 1998;188(2):267-276.
29. Penz S, Reininger AJ, Brandl R, et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J.* Jun 2005;19(8):898-909.
30. Reininger AJ, Bernlochner I, Penz SM, et al. A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* Mar 16 2010;55(11):1147-1158.
31. Schulz C, Penz S, Hoffmann C, et al. Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol.* Jul 2008;103(4):356-367.
32. Jamasbi J, Megens RT, Bianchini M, et al. Differential Inhibition of Human Atherosclerotic Plaque-Induced Platelet Activation by Dimeric GPVI-Fc and Anti-GPVI Antibodies: Functional and Imaging Studies. *J Am Coll Cardiol.* Jun 9 2015;65(22):2404-2415.
33. Mojica Munoz AK, Jamasbi J, Uhland K, et al. Recombinant GPVI-Fc added to single or dual antiplatelet therapy in vitro prevents plaque-induced platelet thrombus formation. *Thromb Haemost.* Aug 1 2017;117(8):1651-1659.
34. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J, Watson SP. Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. *J Cell Biol.* Mar 3 2003;160(5):769-780.
35. Senis YA, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood.* Sep 25 2014;124(13):2013-2024.
36. Timmers E, de Weers M, Alt FW, Hendriks RW, Schuurman RK. X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol.* Nov 1991;61(2 Pt 2):S83-93.
37. Hagemann TL, Chen Y, Rosen FS, Kwan SP. Genomic organization of the Btk gene and exon scanning for mutations in patients with X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mol Genet.* Oct 1994;3(10):1743-1749.
38. Lewis CM, Broussard C, Czar MJ, Schwartzberg PL. Tec kinases: modulators of lymphocyte signaling and development. *Curr Opin Immunol.* Jun 2001;13(3):317-325.
39. Qiu Y, Kung HJ. Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene.* Nov 20 2000;19(49):5651-5661.

40. Atkinson BT, Ellmeier W, Watson SP. Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk. *Blood*. Nov 15 2003;102(10):3592-3599.
41. Park H, Wahl MI, Afar DE, et al. Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity*. May 1996;4(5):515-525.
42. Yoshizawa T et al. Development of a Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) Inhibitor, ONO-4059: Efficacy in a Collagen Induced Arthritis (CIA) Model Indicates Potential Treatment for Rheumatoid Arthritis (RA). *Arthritis and rheumatism*. 2012;64 Suppl 10:1660.
43. Shillitoe B, Gennery A. X-Linked Agammaglobulinemia: Outcomes in the modern era. *Clin Immunol*. Oct 2017;183:54-62.
44. Stewart DM, Lian L, Nelson DL. The clinical spectrum of Bruton's agammaglobulinemia. *Curr Allergy Asthma Rep*. Nov 2001;1(6):558-565.
45. Smith CI. From identification of the BTK kinase to effective management of leukemia. *Oncogene*. Apr 2017;36(15):2045-2053.
46. Mattsson PT, Vihinen M, Smith CI. X-linked agammaglobulinemia (XLA): a genetic tyrosine kinase (Btk) disease. *Bioessays*. Oct 1996;18(10):825-834.
47. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*. Jan 29 1993;72(2):279-290.
48. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*. Jan 21 1993;361(6409):226-233.
49. Nore BF, Mattsson PT, Antonsson P, et al. Identification of phosphorylation sites within the SH3 domains of Tec family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*. Feb 21 2003;1645(2):123-132.
50. Takata M, Kurosaki T. A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2. *J Exp Med*. Jul 1 1996;184(1):31-40.
51. Mohamed AJ, Nore BF, Christensson B, Smith CI. Signalling of Bruton's tyrosine kinase, Btk. *Scand J Immunol*. Feb 1999;49(2):113-118.
52. Desiderio S. Role of Btk in B cell development and signaling. *Curr Opin Immunol*. Aug 1997;9(4):534-540.
53. Varnai P, Rother KI, Balla T. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. *J Biol Chem*. Apr 16 1999;274(16):10983-10989.
54. Li Z, Wahl MI, Eguinoa A, Stephens LR, Hawkins PT, Witte ON. Phosphatidylinositol 3-kinase-gamma activates Bruton's tyrosine kinase in concert with Src family kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 9 1997;94(25):13820-13825.
55. Rawlings DJ, Scharenberg AM, Park H, et al. Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science*. Feb 9 1996;271(5250):822-825.
56. Wahl MI, Fluckiger AC, Kato RM, Park H, Witte ON, Rawlings DJ. Phosphorylation of two regulatory tyrosine residues in the activation of Bruton's tyrosine kinase via alternative receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 14 1997;94(21):11526-11533.
57. Fluckiger AC, Li Z, Kato RM, et al. Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *EMBO J*. Apr 1 1998;17(7):1973-1985.
58. Scharenberg AM, El-Hillal O, Fruman DA, et al. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P₃)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J*. Apr 1 1998;17(7):1961-1972.

59. Satterthwaite AB, Witte ON. The role of Bruton's tyrosine kinase in B-cell development and function: a genetic perspective. *Immunol Rev.* Jun 2000;175:120-127.
60. Futatani T, Watanabe C, Baba Y, Tsukada S, Ochs HD. Bruton's tyrosine kinase is present in normal platelets and its absence identifies patients with X-linked agammaglobulinaemia and carrier females. *Br J Haematol.* Jul 2001;114(1):141-149.
61. Laffargue M, Monnereau L, Tuech J, et al. Integrin-dependent tyrosine phosphorylation and cytoskeletal translocation of Tec in thrombin-activated platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 8 1997;238(1):247-251.
62. Quek LS, Bolen J, Watson SP. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol.* Oct 8 1998;8(20):1137-1140.
63. Oda A, Ikeda Y, Ochs HD, et al. Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Bruton's tyrosine/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD32 cross-linking. *Blood.* Mar 1 2000;95(5):1663-1670.
64. Liu J, Pestina TI, Berndt MC, Steward SA, Jackson CW, Gartner TK. The roles of ADP and TXA in botrocetin/VWF-induced aggregation of washed platelets. *J Thromb Haemost.* Dec 2004;2(12):2213-2222.
65. Laffargue M, Ragab-Thomas JM, Ragab A, et al. Phosphoinositide 3-kinase and integrin signalling are involved in activation of Bruton tyrosine kinase in thrombin-stimulated platelets. *FEBS Lett.* Jan 22 1999;443(1):66-70.
66. Niir H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol.* Dec 2002;2(12):945-956.
67. Fuentes-Panana EM, Bannish G, Monroe JG. Basal B-cell receptor signaling in B lymphocytes: mechanisms of regulation and role in positive selection, differentiation, and peripheral survival. *Immunol Rev.* Feb 2004;197:26-40.
68. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* Apr 2005;5(4):251-262.
69. Gururajan M, Jennings CD, Bondada S. Cutting edge: constitutive B cell receptor signaling is critical for basal growth of B lymphoma. *J Immunol.* May 15 2006;176(10):5715-5719.
70. Buggy JJ, Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *Int Rev Immunol.* Apr 2012;31(2):119-132.
71. Whang JA, Chang BY. Bruton's tyrosine kinase inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Discov Today.* Aug 2014;19(8):1200-1204.
72. Aalipour A, Advani RH. Bruton tyrosine kinase inhibitors: a promising novel targeted treatment for B cell lymphomas. *Br J Haematol.* Nov 2013;163(4):436-443.
73. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 20 2010;107(29):13075-13080.
74. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem.* Jan 2007;2(1):58-61.
75. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, et al. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* Jan 28 2016;374(4):323-332.
76. Wang ML, Blum KA, Martin P, et al. Long-term follow-up of MCL patients treated with single-agent ibrutinib: updated safety and efficacy results. *Blood.* Aug 6 2015;126(6):739-745.
77. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* Dec 17 2015;373(25):2425-2437.

78. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Three-year follow-up of treatment-naive and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*. Apr 16 2015;125(16):2497-2506.
79. Shatzel JJ, Olson SR, Tao DL, McCarty OJT, Danilov AV, DeLoughery TG. Ibrutinib-associated bleeding: pathogenesis, management and risk reduction strategies. *J Thromb Haemost*. May 2017;15(5):835-847.
80. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. Jul 4 2013;369(1):32-42.
81. Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. Aug 8 2013;369(6):507-516.
82. Levade M, David E, Garcia C, et al. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood*. Dec 18 2014;124(26):3991-3995.
83. Bye AP, Unsworth AJ, Desborough MJ, et al. Severe platelet dysfunction in NHL patients receiving ibrutinib is absent in patients receiving acalabrutinib. *Blood Adv*. Dec 12 2017;1(26):2610-2623.
84. Kamel S, Horton L, Ysebaert L, et al. Ibrutinib inhibits collagen-mediated but not ADP-mediated platelet aggregation. *Leukemia*. Apr 2015;29(4):783-787.
85. Bye AP, Unsworth AJ, Vaiyapuri S, Stainer AR, Fry MJ, Gibbins JM. Ibrutinib Inhibits Platelet Integrin α IIb β 3 Outside-In Signaling and Thrombus Stability But Not Adhesion to Collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Nov 2015;35(11):2326-2335.
86. Rigg RA, Aslan JE, Healy LD, et al. Oral administration of Bruton's tyrosine kinase inhibitors impairs GPVI-mediated platelet function. *Am J Physiol Cell Physiol*. Mar 1 2016;310(5):C373-380.
87. Kazianka L, Drucker C, Skrabs C, et al. Ristocetin-induced platelet aggregation for monitoring of bleeding tendency in CLL treated with ibrutinib. *Leukemia*. May 2017;31(5):1117-1122.
88. Lipsky AH, Farooqui MZ, Tian X, et al. Incidence and risk factors of bleeding-related adverse events in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. *Haematologica*. Dec 2015;100(12):1571-1578.
89. Furman RR, Cheng S, Lu P, et al. Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. Jun 12 2014;370(24):2352-2354.
90. Wu J, Liu C, Tsui ST, Liu D. Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase. *J Hematol Oncol*. Sep 2 2016;9(1):80.
91. Calquence. Full prescribing information. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/210259s000lbl.pdf. 2017.
92. Wu J, Zhang M, Liu D. Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor. *J Hematol Oncol*. Mar 9 2016;9:21.
93. Chen J, Kinoshita T, Gururaja T, et al. The effect of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors on collagen-induced platelet aggregation, BTK, and tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma (TEC). *Eur J Haematol*. Jul 20 2018.
94. Nicolson PLR, Hughes CE, Watson S, et al. Inhibition of Btk by Btk-specific concentrations of ibrutinib and acalabrutinib delays but does not block platelet aggregation to GPVI. *Haematologica*. Jul 19 2018.

95. Walter HS, Rule SA, Dyer MJ, et al. A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. *Blood*. Jan 28 2016;127(4):411-419.
96. Walter HS, Jayne S, Rule SA, et al. Long-term follow-up of patients with CLL treated with the selective Bruton's tyrosine kinase inhibitor ONO/GS-4059. *Blood*. May 18 2017;129(20):2808-2810.
97. Constantine Tam APG, Stephen Opat, Matthew Ku, Michael Gilbertson, Mary Ann Anderson, John F. Seymour, David S. Ritchie, Carmen Dicorleto, Belinda Dimovski, Eric Hedrick, Jianxin Yang, Lai Wang, Lusong Luo, Ling Xue and Andrew W. Roberts. The BTK Inhibitor, Bgb-3111, Is Safe, Tolerable, and Highly Active in Patients with Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies: Initial Report of a Phase 1 First-in-Human Trial. *Blood*. 2015;126:832.
98. Na Li ZS, Ye Liu, Mingming Guo, Yilu Zhang, Dongping Zhou, Bo Zhang, Dan Su, Shuo Zhang, Jing Han, Yajuan Gao, Yunhang Guo, Zhiwei Wang, Min Wei, Lusong Luo, Lai Wang. BGB-3111 is a novel and highly selective Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor In: Proceedings of the 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2015 Apr 2018-2022; Philadelphia, PA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2015;2075(2015 Suppl):Abstract nr 2597. doi:2010.1158/1538-7445.AM2015-2597.
99. Carrie J Li YL, Taylor Bell, Jack Wang, Hui Guo, Makhdum Ahmed, Hui Zhang, Laura T Lam, Krystle Nomie, Lai Wang, Liang Zhang, and Michael Wang. Novel Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Bgb-3111 Demonstrates Potent Activity in Mantle Cell Lymphoma

Blood 2016 128:5374.

100. merckgroup.com. 07.03.2018; <https://www.merckgroup.com/de/news/evobrutinib-06-03-2018.html>.
101. Armstrong M. German Merck boosts autoimmune BTK inhibitor chase. *Vantage*. October 16, 2018.
102. Bonaca MP, Braunwald E, Sabatine MS. Long-Term Use of Ticagrelor in Patients with Prior Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. Sep 24 2015;373(13):1274-1275.
103. Johnston SC, Amarenco P. Ticagrelor versus Aspirin in Acute Stroke or Transient Ischemic Attack. *N Engl J Med*. Oct 6 2016;375(14):1395.
104. Secemsky EA, Yeh RW, Kereiakes DJ, et al. Mortality Following Cardiovascular and Bleeding Events Occurring Beyond 1 Year After Coronary Stenting: A Secondary Analysis of the Dual Antiplatelet Therapy (DAPT) Study. *JAMA Cardiol*. May 1 2017;2(5):478-487.
105. Levine GN. Balancing Ischemic and Bleeding Risks of Prolonged Dual Antiplatelet Therapy. *JAMA*. Jul 11 2017;318(2):194-195.
106. Penz SM, Reininger AJ, Toth O, Deckmyn H, Brandl R, Siess W. Glycoprotein Ibalph inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*. Mar 2007;97(3):435-443.
107. Kuijpers MJ, Schulte V, Bergmeier W, et al. Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *FASEB J*. Apr 2003;17(6):685-687.

108. Busygina K, Jamasbi J, Seiler T, et al. Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors selectively block atherosclerotic plaque-triggered thrombus formation in humans. *Blood*. Jun 14 2018;131(24):2605-2616.
109. Bye AP, Gibbins JM. Move along, nothing to see here: Btk inhibitors stop platelets sticking to plaques. *J Thromb Haemost*. Jul 20 2018.
110. Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost*. Dec 2006;96(6):781-788.
111. Bampalis VG, Brantl SA, Siess W. Why and how to eliminate spontaneous platelet aggregation in blood measured by multiple electrode aggregometry. *J Thromb Haemost*. Aug 2012;10(8):1710-1714.
112. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods*. Feb 1980;3(2):135-158.
113. Kratzer MA, Negrescu EV, Hirai A, Yeo YK, Franke P, Siess W. The Thrombostat system. A useful method to test antiplatelet drugs and diets. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21 Suppl 2:25-31.
114. Favalaro EJ. Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost*. Nov 2008;34(8):709-733.
115. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21 Suppl 2:106-112.
116. von Pape KW, Aland E, Bohner J. Platelet function analysis with PFA-100 in patients medicated with acetylsalicylic acid strongly depends on concentration of sodium citrate used for anticoagulation of blood sample. *Thromb Res*. May 15 2000;98(4):295-299.
117. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. Jan 1 2013;31(1):88-94.
118. Jenkins CS, Meyer D, Dreyfus MD, Larrieu MJ. Willebrand factor and ristocetin. I. Mechanism of rustocetin-induced platelet aggregation. *Br J Haematol*. Dec 1974;28(4):561-578.
119. Howard MA, Firkin BG. Ristocetin--a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh*. Oct 31 1971;26(2):362-369.
120. Tangelder GJ, Slaaf DW, Arts T, Reneman RS. Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol*. Jun 1988;254(6 Pt 2):H1059-1064.
121. Reny JL, De Moerloose P, Dauzat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. Mar 2008;6(3):444-450.
122. Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature*. Oct 21 1999;401(6755):808-811.
123. Stegnar M, Bozic M, Dolenc MS, Anderluh PS, Kikelj D. Utility of PFA-100 closure time vs. optical aggregometry in assessing the efficacy of platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa antagonists in vitro. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(11):1542-1548.

