

Universitätsklinikum Ulm

Institut für Virologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Thomas Mertens

**Einfluss von Mycophenolatmofetil und
Natriummycophenolat auf die Proliferation von
T-Lymphozyten bei Patienten mit IgA-Nephritis**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Alexandra Maria Schiller

aus Augsburg

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Mertens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frieder Keller

Tag der Promotion: 16.01.2015

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. Einleitung	1
1.1 T-Lymphozyten im menschlichen Immunsystem	1
1.2 Die IgA-Nephritis (Morbus Berger)	4
1.3 Immunsuppressive Therapie mit Mycophenolsäure	7
1.4 Monitoring immunsuppressiver Therapien	10
1.5 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Spender und Probenmaterial	15
2.2 Lymphozytenisolierung	15
2.3 Fluoreszenzmarkierung mit CFSE	16
2.4 Stimulation der PBMNC und Zugabe der Immunsuppressiva	17
2.5 Kultivierung der Zellen und Oberflächenantigenmarkierung	18
2.6 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)	19
2.7 CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellproliferation unter MMF- bzw. EC-MPS-Therapie	22
2.8 Proliferation heterologer Lymphozyten nach Zugabe von Patientenserum	25
2.9 Statistische Methoden	25
3. Ergebnisse	27
3.1 T-Zellproliferation unter dem Einfluss von MPA und CsA bei Gesunden	27
3.2 Pharmakokinetik und -dynamik der Mycophenolsäure bei IgA-Nephritis	31
3.3 Proliferation von Patientenlymphozyten	39
3.4 Proliferation von Spenderlymphozyten nach Inkubation mit Patientensera	42
3.5 Korrelation von Pharmakodynamik und Pharmakokinetik	43
4. Diskussion	50
4.1 Unterschiedliche Pharmakokinetik nach EC-MPS und MMF	51
4.2 Beeinflussung der IMPDH-Aktivität	55
4.3 Veränderung der Proliferation von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Lymphozyten	55
4.4 Vergleich der IC ₅₀	56
4.5 Assoziation von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik	58
4.6 Schlussfolgerung	59

5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis.....	64
Danksagung	77
Lebenslauf.....	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	<i>antigen presenting cell:</i> antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AUC	<i>area under the time-concentration curve</i>
b.i.d.	bis in die: zweimal täglich
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDI	<i>cell division index:</i> Zellteilungsindex
CFSE	5'-6'-Carboxyfluoreszeindiacetat- succinimidylester
C_{max}	maximale Konzentration
C_{min}	minimale Konzentration
CMV	Cytomegalievirus
CsA	Cyclosporin A
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC-MPS	<i>enteric coated mycophenolic acid</i>
EMIT	<i>enzyme multiplied immunoassay technique</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HFF	<i>human foreskin fibroblast</i>
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
IgAN	IgA-Nephropathie
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphatdehydrogenase
KI	Konfidenzintervall
MHC	<i>major histocompatibility complex:</i>

	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMF	Mycophenolatmofetil
MPA	mycophenolic acid: Mycophenolsäure
MPAG	7-O-MPA-Glucuronid
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
PBMNC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerycrin
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TDM	<i>therapeutic drug monitoring</i> : therapeutische Arzneimittelüberwachung
t_{\max}	Zeitpunkt, zu dem die Maximalkonzentration erreicht wird
t_{\min}	Zeitpunkt, zu dem Minimalkonzentration erreicht wird

1. Einleitung

1.1 T-Lymphozyten im menschlichen Immunsystem

1.1.1 Grundlegendes

T-Lymphozyten sind Teil des Immunsystems, das der menschliche Körper im Laufe der Evolution zur Abwehr exogener Krankheitserreger und zur Elimination unkontrolliert agierender körpereigener Zellen und Substanzen entwickelt hat. Sie sind zentrale zelluläre Bestandteile der antigenabhängigen adaptiven Immunantwort. T-Zellen haben ihren Ursprung in pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. Ihr Name leitet sich von ihrem Reifungsort, dem Thymus, ab [1]. T-Lymphozyten erkennen Antigene über spezifische Rezeptoren, die auf ihrer Oberfläche exprimiert werden. Diese T-Zellrezeptoren (TCR, *T-cell receptor*) erkennen im Gegensatz zu den Rezeptoren der B-Lymphozyten keine nativen Proteine, sondern nur bereits prozessierte Antigene und nur in Verbindung mit dem passenden Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*) [38]. Dies bezeichnet man als die MHC-Restriktion der T-Zellen. Der TCR ist ein Multiproteinkomplex, welcher die Zellmembran durchspannt. Die Hauptpopulation der T-Zellen trägt einen TCR aus einer α - und einer β - Kette, welche jeweils aus einer variablen und einer konstanten Region bestehen. Die variable Region kann ein an einen MHC gebundenes Antigen erkennen und binden. Nur ein kleiner Teil, nämlich etwa 5% der T-Zellen eines Menschen weist einen $\gamma\delta$ -TCR auf. $\alpha\beta$ -T-Zellen lassen sich an Hand ihrer Korezeptoren untergliedern in $CD4^+$ -T-Zellen und $CD8^+$ -T-Zellen. $CD4^+$ -T-Zellen können nur Antigene im Verbund mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex MHC II erkennen [17]. Dieser wird auf der Oberfläche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC, *antigen presenting cells*) exprimiert [70]. $CD4^+$ -Zellen werden nach ihrer Rolle als Immunfunktionen regulierende Zellen auch vereinfachend als T-Helferzellen bezeichnet. Sie sind an der Initiierung der humoralen Immunantwort und der Aktivierung von anderen Zellen des Immunsystems beteiligt. Bereits aktivierte $CD4^+$ -T-Zellen lassen sich an Hand ihrer Zytokinproduktion weiter unterscheiden: T_H1 -Zellen sezernieren inflammatorische Zytokine wie u.a. IL-2,

TNF- β und Interferone. Diese triggern zellvermittelte Immunmechanismen und unterstützen die Abwehr vor allem intrazellulärer Pathogene. T_H2-Zellen sezernieren hauptsächlich IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Sie fördern unter anderem durch die Unterstützung von B-Zellfunktionen die Eliminierung extrazellulärer Pathogene. T_H1- und T_H2-Zellen können sich gegenseitig regulieren [88]. Die dritte Subpopulation der CD4⁺-T-Zellen wird auch als Suppressor- oder regulatorische Zellen bezeichnet. Sie zeigen eine starke Expression von CD25.

CD8⁺-T-Zellen interagieren mit an MHC I gebundenen Antigenen. Fast alle kernhaltigen Körperzellen tragen MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Sind CD8⁺-T-Zellen aktiviert, werden sie als CTL (Cytotoxic T-Lymphocytes) bezeichnet und können beispielsweise virusinfizierte und maligne Zellen durch die Freisetzung von Perforinen und Proteasen lysieren. Sie haben auch die Fähigkeit, die Apoptose von Zielzellen auszulösen. Eine weitere Funktion ist die Freisetzung von Zytokinen, darunter besonders IFN γ [70].

Weitere Subpopulationen der T-Zellen stellen die Gedächtnis- oder Memory-Zellen, die regulatorischen T-Zellen und die Natural-Killer-T-Zellen dar.

1.1.2 Aktivierung von T-Lymphozyten

Betrachtet man den Aktivierungszustand und die zelluläre Morphologie, lassen sich die T-Lymphozyten auch untergliedern in:

- **Naive Zellen** ohne vorherigen Antigenkontakt, welche bereits im Thymus ausgereift sind, aber noch keinen Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen hatten. Sie exprimieren das Oberflächenmolekül CD45RA.
- **Aktivierte T-Zellen** wurden bereits durch Interaktion mit ihrem spezifischen Antigen und dem passenden MHC-Komplex sowie durch zusätzliche kostimulatorische Signale zur Proliferation und Differenzierung angeregt.
- **Aktivierte T-Effektorzellen** entsprechen aktivierten T-Zellen, die durch Differenzierungsvorgänge neue Eigenschaften erworben haben, welche ihnen z.B. die Bekämpfung von Zielzellen ermöglichen. Sie tragen den CD45-Rezeptor in der reifen Form CD45RO.

- **Gedächtniszellen (memory cells)** können über lange Zeit im Organismus persistieren. Sie können durch ein erneutes Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antigen aktiviert werden und stellen dann die Basis einer schnelleren Immunantwort dar.

Naive T-Zellen zirkulieren zwischen Blutbahn und peripheren Lymphgeweben. In den T-Zell-Arealen der Lymphknoten treten sie mit zahlreichen antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt. Erst wenn eine Zelle ihr spezifisches Antigen an einem passenden MHC erkennt kann sie aktiviert werden. Dazu sind drei Signale nötig: der spezifische MHC-Peptid-Komplex, der Korezeptor (CD4) der T-Zelle und zusätzliche kostimulatorische Signale. Ein Antigenstimulus über den TCR allein kann nur Effektor- oder Gedächtniszellen vollständig aktivieren. Bei naiven Zellen erfolgt nur eine Teilaktivierung mit Zellvergrößerung und vermehrter Expression von u.a. CD69 und CD25 [57]. Naive Zellen benötigen zur vollständigen Aktivierung ein zweites kostimulatorisches Signal von professionellen APC. Dieses Phänomen verhindert, dass die körpereigene Selbsttoleranz durchbrochen wird, da nur professionelle APCs, aber nicht sonstige Körperzellen eine solche Kostimulation bieten können [59].

1.1.3 Proliferation von T-Lymphozyten

Vor allem durch die Wirkung von IL-2 tritt die aktivierte T-Zelle in die Phase der Proliferation ein. Der bis dahin kleine Lymphozyt vergrößert sich, das Chromatin im Nukleus lockert sich auf, Nukleoli erscheinen, Nukleus und Zytoplasma nehmen an Umfang zu. Es beginnt die Synthese von mRNA und neuen Proteinen. Innerhalb weniger Stunden entwickelt sich die Zelle zum Lymphoblasten. Dieser teilt sich, wobei sich die Zahl der Tochterzellen über drei bis fünf Tage alle 8-12 Stunden verdoppelt. Dementsprechend entstehen Zellklone gleicher Antigenpezifität von bis zu 1000 Zellen. In vitro lässt sich die maximale DNS-Synthese, misst man den Einbau von ³H-Thymidin, 72 bis 150 Stunden nach der Zugabe des Antigenstimulus messen [11]. Die auf die Aktivierung folgende Proliferation von Lymphozyten ist für die physiologische Funktion des menschlichen Immunsystems grundlegend wichtig. Allerdings ist die Proliferationsfähigkeit von Lymphozyten zugleich eine Voraussetzung verschiedener Autoimmun- bzw. immunvermittelter Erkrankungen.

1.2 Die IgA-Nephritis (Morbus Berger)

1.2.1 Allgemeines

Die IgA-Nephritis ist die weltweit häufigste primäre chronische glomeruläre Erkrankung [116; 92; 32; 39]. In Europa wird von einer Prävalenz von 10% aller glomerulären Krankheiten ausgegangen, während aus Japan Prävalenzen von bis zu 50% berichtet werden. Männer, meist im Alter von 20 bis 40 Jahren, sind häufiger betroffen, das Geschlechterverhältnis beläuft sich auf etwa 2:1 [6; 34; 47]. Erstmals beschrieben wurde das Krankheitsbild im Jahre 1968 durch den Franzosen Berger in seiner Publikation „Les dépôts intercapillaires d'IgA-IgG“ [14]. Die primäre IgA-Nephropathie (Morbus Berger) stellte histologisch und klinisch in Unterscheidung zu den bis dahin bekannte Nephropathien eine neue Krankheitsentität dar.

1.2.2 Pathogenese und klinisches Erscheinungsbild

In den letzten Jahren mehrte sich das Wissen über molekulare Mechanismen in der Entstehung der IgA-Nephritis. Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch die Dominanz von IgA-Ablagerungen (entweder nur IgA oder in Kombination mit IgG und/oder IgM) im glomerulären Mesangium. Bei an IgA-Nephritis Erkrankten sind die Serumkonzentrationen von IgA gegenüber gesunden Menschen erhöht [107]. Es ist von einer Mitbeteiligung des alternativen und Lektin-Pathways der Komplementaktivierung auszugehen [116].

Die Deposits im Mesangium sind der Subklasse IgA₁ zuzuordnen und sind galaktosedefizient. Letzteres scheint von großer Wichtigkeit für die Pathogenese der Erkrankung zu sein. Verschiedene Autoren gehen davon aus, dass Patienten, die eine IgA-Nephritis entwickeln, als „first hit“ erhöhte zirkulierende Spiegel von IgA₁ mit galaktosedefizienten O-Glykanen in der Hinge-Region aufweisen. Als zweiter und dritter Schritt entstehen Antikörper (IgA, IgG), welche sich gegen galaktosedefizientes IgA₁ richten. Es werden Immunkomplexe gebildet, die sich im glomerulären Mesangium ablagern. In der Folge kommt es zu einer Aktivierung von Mesangiumzellen, welche letztendlich über eine Proliferation derselben und die Bildung von Chemo- und Zytokinen sowie die Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen für die Schädigung verantwortlich ist [116; 103; 74; 10].

1.2.3 Histologie der IgAN

Die Diagnosestellung erfolgt ausschließlich durch Nierenbiopsie. Bei der histopathologischen Aufarbeitung wird die sogenannte Oxford-Klassifikation für das Grading anhand lichtmikroskopischer Kriterien verwendet. Es zeigt sich zumeist eine fokale mesangioproliferative Glomerulonephritis. Im immunhistologischen Bild lassen sich polymere IgA-Moleküle im Mesangium und entlang der glomerulären Kapillarwände nachweisen, zum Teil im Verbund mit IgM und IgG. Vermutlich binden die IgA-Antikörper an F_c-Rezeptoren wie CD89 und 71 auf den Mesangiumzellen, was eine mesangiale Hyperzellularität sowie eine Produktion proinflammatorischer Cytokine (TGF- β , IL-1 β , IL-6, TNF-alpha, MIF) induziert. Durch eine Komplementaktivierung über den alternativen Pathway können die IgA-Komplexe weiterhin indirekt die Zellproliferation und die mesangiale Matrixdeposition stimulieren [7; 28; 42].

Zudem lassen sich an Hand der Histologie eines Biopsates Hinweise auf den individuellen Verlauf der Erkrankung gewinnen: Eine Sklerose von Glomerula und Gefäßen ist ebenso ein Indikator für einen rasch progredienten Verlauf der IgAN wie die bei einigen Betroffenen auftretenden endokapillären Proliferationen und zellulären Halbmondbildungen [34; 106], zudem gelten mesangiale Hyperzellularität, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose als Progressionsindikatoren [41].

1.2.4 Klinisches Erscheinungsbild und Verlauf der IgAN

Typischerweise werden die Betroffenen durch eine schmerzlose Makrohämaturie oder eine Mikrohämaturie vergesellschaftet mit einer leichten bis mittelgradigen Proteinurie bis 3 g/die symptomatisch, ein akutes Nierenversagen ist seltener. Eine Rarität ist das nephrotische Syndrom als Erstmanifestation [8; 47]. Häufig besteht eine nahe zeitliche Assoziation zu Infektionen des oberen Respiration- oder Gastrointestinaltraktes.

Der klinische Verlauf des Morbus Berger ist variabel. Das Spektrum erstreckt sich von Patienten, die eine rasch progressive Verschlechterung ihrer Nierenfunktion erleiden bis zu jenen, bei denen dieselbe jahrelang relativ stabil bleibt [78]. In einer trikontinentalen Studie ergab sich eine langsame Progression zur terminalen Niereninsuffizienz bei bis zu 50% der Betroffenen während langjähriger, teils

jahrzehntelanger Beobachtung [48]. Wyatt et al. gehen davon aus, dass bei 20-40% der Patienten 20 Jahre nach Biopsie eine Terminalisierung bis zum ESRD (*end stage renal disease*) eintritt [114].

Als Risikofaktoren für eine schlechte Prognose gelten eine Proteinurie größer als 1g/die, arterielle Hypertonie (>140/90 mmHg) sowie schwere histologische Veränderungen in der Nierenbiopsie wie z.B. mesangiale Hyperzellularität, segmentale glomeruläre Sklerose oder Adhäsionen und Fibrose des Interstitiums [16; 27]. Verschiedenen Studien zufolge verhält sich die IgAN bei Patienten, deren Serumkreatinin den Wert von 3mg/dl überschreitet, klar progredient, weshalb hier der Begriff „point of no return“ geprägt wurde [33; 99]. Eine progrediente Form der IgA-Nephritis wird dann diagnostiziert, wenn das Serumkreatinin innerhalb von mindestens drei Monaten (Ausschluss eines akuten Nierenversagens) oder innerhalb von höchstens drei Jahren (hier Ausschluss einer Zweiterkrankung) um 25 Prozent angestiegen ist.

1.2.5 Therapie der IgA-Nephritis

Zur Therapie der IgA-Nephritis existieren bisher wenige randomisierte kontrollierte klinische Studien. Auch weil die IgA-Nephritis sehr unterschiedliche Verläufe und Varianten der Erstmanifestation zeigen kann, gibt es keinen allgemein gültigen Therapieplan [9; 42]. Die KDIGO-Guidelines von 2012 (Kidney Disease: Improving Global Outcomes, [92]) betonen die Wichtigkeit einer Blutdruckkontrolle mit einem ACE-Hemmer oder Sartan, der systolische Zielblutdruck sollte unter 130 mmHg bzw. unter 125 mmHg bei Proteinurie über 1g/d liegen. Für ACE-Hemmer wurde auch eine antiproliferative Wirkung im Glomerulum, eine Reduktion der Proteinurie und eine Verlangsamung des renalen Funktionsverlustes nachgewiesen [78; 94]. Persistiert eine Proteinurie von mehr als 1g trotz drei- bis sechsmonatiger supportiver Therapie, sollen Fischölpräparate, eine sechsmonatige Glucocorticoidtherapie oder beides zur Anwendung kommen, wobei die Studienlage zu den nierenprotektiven Effekten von Docosahexansäure und Eicosapentaensäure („Fischöl“) als Antioxidantien widersprüchlich ist [40].

Kausale Therapieansätze beinhalten immunsuppressive Maßnahmen. Eine immunsuppressive Therapie mit Steroiden in Kombination mit Cyclophosphamid oder Azathioprin wird von der KDIGO für Patienten mit Halbmondbildung in über

50% der Glomeruli und einer raschen Verschlechterung der Nierenfunktion vorgeschlagen. In verschiedenen Studien wurden Therapieregime mit Steroiden, Cyclophosphamid oder Cyclosporin A überprüft [6; 90; 93]. Die Verwendung von Steroiden wurde als hochdosierte Pulstherapie ebenso untersucht wie als Erhaltungstherapie in niedrigerer Dosis. Die vielfältigen und lang bekannten Nebenwirkungen der Kortikosteroide können den Nutzen jedoch limitieren. Cyclophosphamidpulse als Induktionstherapie über einen Zeitraum von einigen Monaten wurden mit guten Ergebnissen durchgeführt [6; 93]. Beim in der Transplantationsmedizin erprobten Cyclosporin A ergibt sich allerdings eine nicht zu vernachlässigende Problematik aus der dem Präparat eigenen Nephrotoxizität [73]. So wird Cyclosporin A bisher nicht zur Langzeittherapie der IgAN empfohlen. Auf Grund des günstigen Nebenwirkungsprofils von Mycophenolatmofetil [55] erscheint diese Substanz für Patienten mit IgA-Nephritis interessant. Es existieren verschiedene Studien, die den Nutzen von MMF als Erhaltungstherapie belegen [15; 30; 86]. Da jedoch auch Untersuchungen existieren, die keinen Benefit zeigen konnten [43; 45; 117] wurde bisher keine generelle Empfehlung für MMF als Erstlinientherapie im Routinegebrauch ausgesprochen. Drei randomisierte kontrollierte Studien (aus Belgien, den USA und China) haben die Wertigkeit von MMF bei IgA-Nephritis-Patienten mit hohem Risiko untersucht. Die chinesische Studie zeigte, dass 2g MMF/d mit einem ACE-Hemmer bei 20 Patienten eine bessere Reduktion der Proteinurie und Stabilisierung der Nierenfunktion erzielen konnten als ein ACE-Hemmer allein [104]. Die beiden anderen genannten Untersuchungen stellten für die hauptsächlich kaukasischen Patienten keinen Effekt auf die Proteinurie fest [45; 81]. Größere randomisierte Studien stehen aus. MMF erscheint für jene Patienten mit progredientem Krankheitsverlauf besonders geeignet, die unter langdauernder Steroidmedikation intolerable Nebenwirkungen entwickeln.

1.3 Immunsuppressive Therapie mit Mycophenolsäure

Eine Modulation der lebenswichtigen Immunfunktionen wird in verschiedenen klinischen Situationen therapeutisch eingesetzt. So war die Entwicklung von geeigneten Immunsuppressiva die Voraussetzung für die moderne

Transplantationsmedizin, da hier die Abstoßung von Spenderorganen verhindert werden muss. Gleichsam bedeutend ist der Einsatz von Immunsuppressiva bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten. Inzwischen hat sich in der immunsuppressiven Therapie eine Vielzahl von Medikamenten etabliert, darunter auch der Wirkstoff Mycophenolsäure.

1.3.1 Geschichtliches und Einsatzbereich

Mycophenolatmofetil (MMF), welches schon im ausgehenden 19. Jahrhundert von Gosio an Maispflanzen isoliert wurde und ein Produkt verschiedener *Penicillium*-Pilzspezies ist [51], wurde im 20. Jahrhundert vor allem in Bezug auf seine zytostatischen Fähigkeiten untersucht [21]. Die Hauptwirkung von MMF, die Inhibition des an der Purinbiosynthese beteiligten Enzymes IMPDH, konnte erst 1969 identifiziert werden [44].

In den Vereinigten Staaten wurde MMF erstmals 1995 für die Behandlung von nierentransplantierten Patienten zugelassen und hat heute einen festen Platz in der Transplantationsmedizin. MMF wird bei Organtransplantationen bereits routinemäßig verwendet, wobei es mit Cyclosporin A und Steroiden kombiniert und meist in einer fixen Dosis verabreicht wird [12; 26]. Es wird erfolgreich bei Herz-, Leber-, Pankreas- und anderen Transplantationen eingesetzt [67; 83]. Daneben erstreckt sich der Einsatzbereich auch auf die Therapie von Autoimmunerkrankungen wie z.B. des systemischen Lupus erythematoses [95].

1.3.2 Pharmakokinetik

Für die orale Therapie existieren zwei Darreichungsformen, das Mycophenolatmofetil und seit 2004 das magensaftresistent ummantelte Natriumsalz der Mycophenolsäure (enteric coated-Mycophenolsäure oder EC-MPS). 1000 mg MMF und 720 mg EC-MPS entsprechen einer äquimolaren Menge an Mycophenolsäure. Mycophenolatmofetil, selbst biologisch inaktiv, ist die Prodrugform des aktiven immunsuppressiven Moleküls Mycophenolsäure (MPS bzw. engl. *mycophenolic acid*, MPA), in welches MMF nach oraler Aufnahme sehr rasch durch Plasmaesterasen hydrolysiert wird [46]. MMF wird schon in der Mucosa des Darmes und bei der ersten Leberpassage vollständig zu MPA

konvertiert, weshalb sich im Plasma keine MMF-, sondern nur MPA-Spiegel messen lassen. Ein großer Teil des MPA wird an Serumalbumin gebunden, nur etwa 1-3% liegen bei Gesunden in freier Form vor [60].

Der Hauptmetabolit von MPA ist das 7-O-MPA-Glucuronid (MPAG). Zudem werden ein 7-O-Glucosid und ein Acylglucuronid (AcMPAG) gebildet. Zum größten Teil, die Literatur berichtet von etwa 87%, wird MPA als MPAG renal eliminiert, 6% werden über den Darm ausgeschieden. Der mit der Galle eliminierte Teil wird durch Bakterien der Darmflora zu MPA deglucuronidiert. Dieses wird enteral rückresorbiert, weshalb durch diesen enterohepatischen Kreislauf 6-12 Stunden nach Einnahme die Plasmakonzentration von MPA wieder steigt [46].

1.3.3 Pharmakodynamik

Ihre immunsuppressive Wirkung entfaltet die Mycophenolsäure durch eine Hemmung der Purinsynthese. Dabei wird das Enzym Inosin-5'-monophosphatdehydrogenase (IMPDH) reversibel und hochselektiv inhibiert. Diese NAD⁺-abhängige Dehydrogenase stellt ein Schlüsselenzym der de novo-Guanosinmonophosphat-Synthese (GMP) dar und katalysiert die Umwandlung von Inosinmonophosphat (IMP) in Xanthinmonophosphat (XMP) [113; 46]. Da proliferierende T- und B-Zellen auf den de novo-Stoffwechsel angewiesen sind und nicht in ausreichendem Umfang den sog. *salvage pathway* zur Wiederverwertung nutzen können, werden diese Zellen besonders beeinträchtigt. Die de novo-Synthese von Guanosinmonophosphat ist für den Metabolismus, die Differenzierung und Replikation von T- und B-Zellen essentiell. Ein weiterer Grund für die bevorzugte Wirkung von MPA auf Lymphozyten ist, dass der Wirkstoff die in aktivierten Lymphozyten exprimierte Isoform II der IMPDH fünf- bis zehnfach stärker inhibiert als die in den meisten anderen Zellen vorhandene Isoform I [3; 46; 91].

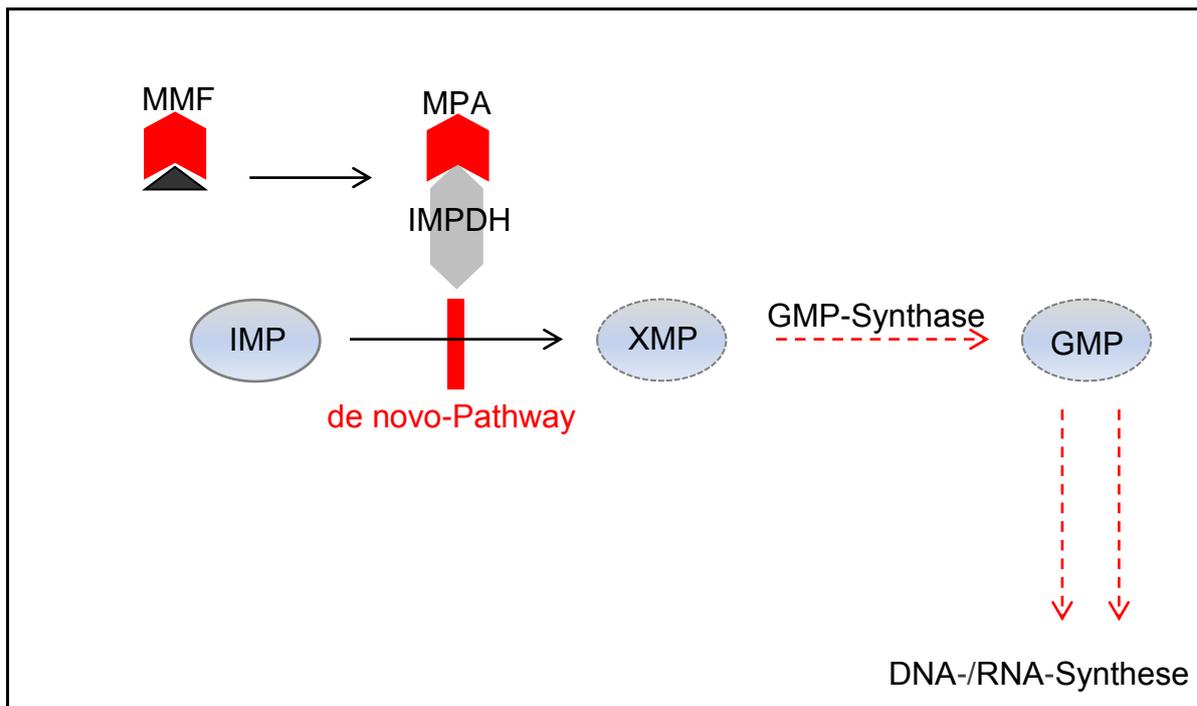


Abb. 1: Pharmakodynamik von Mycophenolatmofetil (nach Allison 2005).
 MMF: Mycophenolatmofetil, MPA: Mycophenolsäure, IMPDH: Inosinmonophosphatdehydrogenase, IMP: Inosinmonophosphat, XMP: Xanthinmonophosphat, GMP: Guaninmonophosphat, DNA/RNA: Desoxyribo-/Ribonukleinsäure.

1.3.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Grundsätzlich wird MMF gut vertragen. Die bei der MMF-Therapie auftretenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind dosisabhängig. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen gastrointestinale Beschwerden (Diarrhöen, Übelkeit, Erbrechen), Infektionen sowie hämatologische Komplikationen (Thrombopenie, Leukopenie, Anämie) [55; 60]. Im Vergleich zu Azathioprin ist die Knochenmarkstoxizität des MMF deutlich geringer ausgeprägt.

1.4 Monitoring immunsuppressiver Therapien

Immunsuppressiva sind durch eine schmale therapeutische Breite, eine komplexe Bioverfügbarkeit und hohe inter- und intraindividuelle pharmakokinetische Variabilität gekennzeichnet. Dementsprechend gilt es die jeweils optimale Balance zwischen bestmöglicher Wirksamkeit eines Pharmakons und minimaler Toxizität zu finden. Zu diesem Zweck dient das sogenannte Therapeutische Drug Monitoring (TDM): Die Konzentration von Pharmaka oder deren Metaboliten bzw.

Surrogatmarker für deren Wirkung werden in biologischen Proben gemessen und das Ergebnis mit dem Ziel der Vorhersage von Organantworten interpretiert [111].

Bei der Cyclosporin- oder Tacrolimustherapie ist das TDM bereits etabliert. Hier wird üblicherweise die Konzentration des Wirkstoffs in einer Blutprobe vor Einnahme des Medikaments bestimmt („pre-dose“-Spiegel oder Talspiegel).

Die Rolle eines TDM für MMF in der Transplantationsmedizin und in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen war zuletzt Gegenstand zahlreicher Studien. Verschiedene Untersuchungen zeigten eine hohe interindividuelle pharmakokinetische, z.T. auch ethnische Variabilität nach der Gabe einer festen Dosis von Mycophenolatmofetil [25; 26; 49; 77; 100]. Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Effektivität und Toxizität von MPA. Daher erscheint eine Überwachung der Therapie sinnvoll, um eine Individualisierung der Immunsuppression zu ermöglichen und neben der gewünschten immunsuppressiven Wirkung die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen oder einer Überimmunsuppression zu minimieren.

Zur klinischen Evaluation einer Therapie mit Mycophenolsäure wird häufig der Wirkstoffspiegel gemessen. Die Plasmakonzentration wird dabei mit einem EMIT-Assay (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*) oder chromatographisch (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) bestimmt. Beim Immunoassay treten Interaktionen mit MPA-Metaboliten wie AcMPAG auf [60]. Aus zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelten MPA-Spiegeln lässt sich die AUC (*Area Under the time-Concentration curve*) errechnen. Möglicherweise könnte aber das individuelle biologische Ansprechen durch pharmakodynamische Untersuchungen besser reflektiert werden, da so die direkte Wirkung der Substanz auf das Immunsystem quantifizierbar erscheint. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Bestimmung der MPA-Wirkung an Hand der Messung der IMPDH-Inhibition. Das Verfahren gelangt allerdings noch nicht regelhaft zur Anwendung.

1.5 Zielsetzung

Der Einsatz von Immunsuppressiva hat einen Durchbruch in der Therapie vieler Erkrankungen erbracht. Auch bei der IgA-Nephritis wird bei selektierten Patienten eine immunsuppressive Therapie durchgeführt. Anders als z.B. nach Transplantationen handelt es sich hier meist um eine immunsuppressive Monotherapie, ggf. in Kombination mit niedrig dosierten Steroiden.

Immunsuppressiva sind durch eine geringe therapeutische Breite gekennzeichnet. Anders als rein pharmakokinetische Verfahren (Bestimmung der AUC, Bestimmung von Medikamentenspiegeln) wäre ein ideales TDM in der Lage direkt biologische Effekte widerzuspiegeln. Damit könnten unerwünschte Nebenwirkungen vermieden und eine optimale individuelle Steuerung der immunsuppressiven Therapie ermöglicht werden. Dazu ist die Untersuchung geeigneter Biomarker notwendig.

Als derartiger Biomarker kommt die Proliferation von T-Lymphozyten in Frage, da diese Zellen eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr innehaben.

Das Ziel dieser Arbeit war, zunächst einen nichtradioaktiven mit Durchflusszytometrie nutzbaren Assay zur Untersuchung der T-Lymphozytenproliferation zu etablieren. Damit sollten folgende Fragen beantwortet werden: Wie beeinflussen die Mycophenolsäure bzw. die Präparate MMF und EC-MPS die T-Zellproliferation beim gesunden Menschen und bei Patienten mit IgA-Nephritis? Besteht eine Korrelation zwischen der Proliferationsaktivität von T-Lymphozyten und pharmakokinetischen (MPA-Konzentration) sowie pharmakodynamischen (IMPDH-Aktivität) Parametern bei Patienten mit MPA-Therapie?

2. Material und Methoden

Tabelle 1:

Verwendete Materialien

Geräte	Firma
Sterile Arbeitsbank	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer <i>FACSCalibur</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald
Pipettiergerät	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Scientific Ind., Bohemia, USA
Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Sterile Arbeitsbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Software	Firma
FACS-Analysesoftware <i>CellQuest Pro</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
MS Office/Excel/Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, USA
Verbrauchsmaterialien	Firma
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Polystyren-Rundbodenröhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
96 Loch-Mikrotiter-Platte (Rundboden)	Becton Dickinson, Heidelberg
Plastikpipetten	Sarstedt, Nürnberg
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Injekt Einmalspritzen 10 ml und 20 ml	Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Kulturmedien, Puffer, Lösungen, Stimulantien	Firma
Ficoll-Separationsmedium	Biochrom KG, Berlin
RPMI-Medium 1640	Biochrom KG, Berlin
FCS (fetales Kälberserum)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumazid NaN ₃	Sigma, Taufkirchen
Humane IgG-Lösung (Polyglobin)	Bayer, Leverkusen

Penicillin (100 U/ml)	Biochrom KG, Berlin
Streptomycinsulfat (100 µg/ml)	Biochrom KG, Berlin
SEB-Superantigen (1µg/ml)	Sigma, Taufkirchen
Kulturmedium komplett	RPMI supplementiert mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycinsulfat, 1% L-Glutamin 2mM
Kulturmedium ohne FCS	RPMI mit 1% Penicillin/Streptomycinsulfat, 1% L-Glutamin 2 mM
FACS-Medium	98% PBS, 2% FCS, 0,02% Natriumazid
FACS-Blocking-Puffer	10% humane IgG-Lösung (Polyglobin) in FACS-Medium
PBS (phosphate buffered saline), pH 7,4	20fach konzentrierte Stammlösung: 4g KCl, 140g NaCl, 4g KH ₂ PO ₄ , 23g Na ₂ HPO ₄ auf 1 l Aqua deion. Vor Gebrauch 50 ml auf 1 l Aqua deion.
Pharmaka	Firma
Mycophenolsäure (MPA-Natrium), 50 mg/ml	Novartis, Basel, Schweiz
Mycophenolatmofetil (Cellcept®)	Hoffman LaRoche, Basel, Schweiz
EC-MPS (Myfortic®)	Novartis, Basel, Schweiz
Cyclosporin A (Sandimmun®)	Novartis, Basel, Schweiz
Natriumheparinat (Liquemin®)	Hoffman LaRoche, Grenzach-Wyhlen
Monoklonale Antikörper/Fluorochrome	Firma
anti-CD4-PE	Dako, Hamburg
anti-CD8-APC	Caltag, Burlingame, USA
CFSE	Molecular Probes, Eugene, USA

2.1 Spender und Probenmaterial

Für die Etablierung des nichtradioaktiven Testsystems zur Lymphozytenproliferation im ersten Teil der Arbeit wurde vier freiwilligen und gesunden Spendern venöses Blut abgenommen und daraus periphere mononukleäre Zellen (PBMNC) isoliert. Den Spendern wurde am Tag der PBMNC-Isolierung 20 ml periphervenöses Blut entnommen, mit Natriumheparinat antikoaguliert und umgehend weiterverarbeitet.

2.2 Lymphozytenisolierung

Die Zellisolierungen und Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Materialien wurden in sterilisierter bzw. autoklavierter Form verwendet. Inkubationen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37° Grad Celsius mit 5% CO₂ und in gesättigter Wasserdampfatosphäre durchgeführt.

Für sämtliche Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden PBMNC mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gewonnen. Dabei kam das von Böyum im Jahr 1968 beschriebene Verfahren in modifizierter Form zum Einsatz [18]. Das Blut wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt. In sterile blue-cap-Röhrchen wurden je 4 ml Ficoll-Separationsmedium vorgelegt. Das Separationsmedium, ein hochmolekulares synthetisches Zuckerpolymer der Dichte 1,077, wurde mit 10 ml der Blut-PBS-Mischung vorsichtig überschichtet. Dann wurde 30 min lang bei 1400 rpm mit freiem Auslauf zentrifugiert. Dabei sedimentieren die im Blut enthaltenen Zellen in Richtung der Blut-Ficoll-Grenzfläche. Bei Kontakt mit Ficoll aggregieren die Erythrozyten und sinken auf den Boden des Röhrchens. Polymorphkernige Zellen (Granulozyten) sinken auf Grund ihrer Dichte ebenfalls durch die Ficollschicht. Dagegen bilden die mononukleären Zellen wie Lymphozyten und Monozyten sowie Thrombozyten einen deutlich abgrenzbaren Ring auf der Oberfläche der Ficollschicht, die sie wegen ihrer zu geringen Dichte nicht passieren können. Diese so genannte Interphase entspricht zu 95% angereicherten mononukleären Zellen wie z.B. B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten. Diese konnten nun von

anderen Blutbestandteilen getrennt in ein frisches blue-cap-Röhrchen überführt werden. Es folgten zwei Waschschrte, bei denen durch Zugabe von PBS und anschließendes Zentrifugieren (gebremst, 5 Minuten bei 1400 rpm) Reste des Separationsmediums entfernt wurden.

2.3 Fluoreszenzmarkierung mit CFSE

Die klassischen Lymphozytenproliferationsassays wie die in den letzten 30 Jahren weitverbreitete ^3H -Thymidin-Methode detektieren den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen. Seit einigen Jahren werden zunehmend häufiger Fluoreszenzassays wie die CFSE-Methode zur Proliferationsmessung benutzt. Die von Lyons und Parish entwickelte Methode der Zellmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester) ist ein alternativer Proliferationsassay, der sensitiver als das ^3H -Thymidinverfahren ist [80; 58]. Anders als die ^3H -Thymidinmethode, welche zwar ein gutes Korrelat der T-Zellteilung darstellt, aber keine Information über den Subtyp der proliferierenden Zellen gibt, kann mit der CFSE-Methode die Proliferation von Zellsubpopulationen, z.B. CD4^+ -Zellen, direkt gemessen werden [82]. CFSE ist ein lipophiler Farbstoff, der in das Innere der Zellen diffundieren kann. Im Zellinneren wird der zunächst fluoreszenzlose Farbstoff durch Esterasen gespalten und kann nun in fluoreszierender Form irreversibel an die Amidbindungen intrazellulärer Moleküle binden. CFSE eignet sich zur Untersuchung der Zellproliferation, da sich die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes in den Zellen bei jeder Zellteilung halbiert. Anschließend kann in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, wie viele und welche Zellen sich wie häufig geteilt haben. In der vorliegenden Arbeit wurden die PBMNC mit einer CFSE-Konzentration von 625 pM markiert. Darauf folgte eine Inkubation über 10 Minuten bei einer Temperatur von 37° Grad Celsius im Wasserbad. Nicht in die Zellen aufgenommenes CFSE wurde danach durch einen Waschschrte mit Kulturmedium entfernt. Dann wurden die CFSE-markierten Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Es folgte eine Zellzählung mit der Neubauer-Kammer unter Zugabe von Trypanblau. Abbildung 2 zeigt schematisch die Arbeitsschrte des Assays.

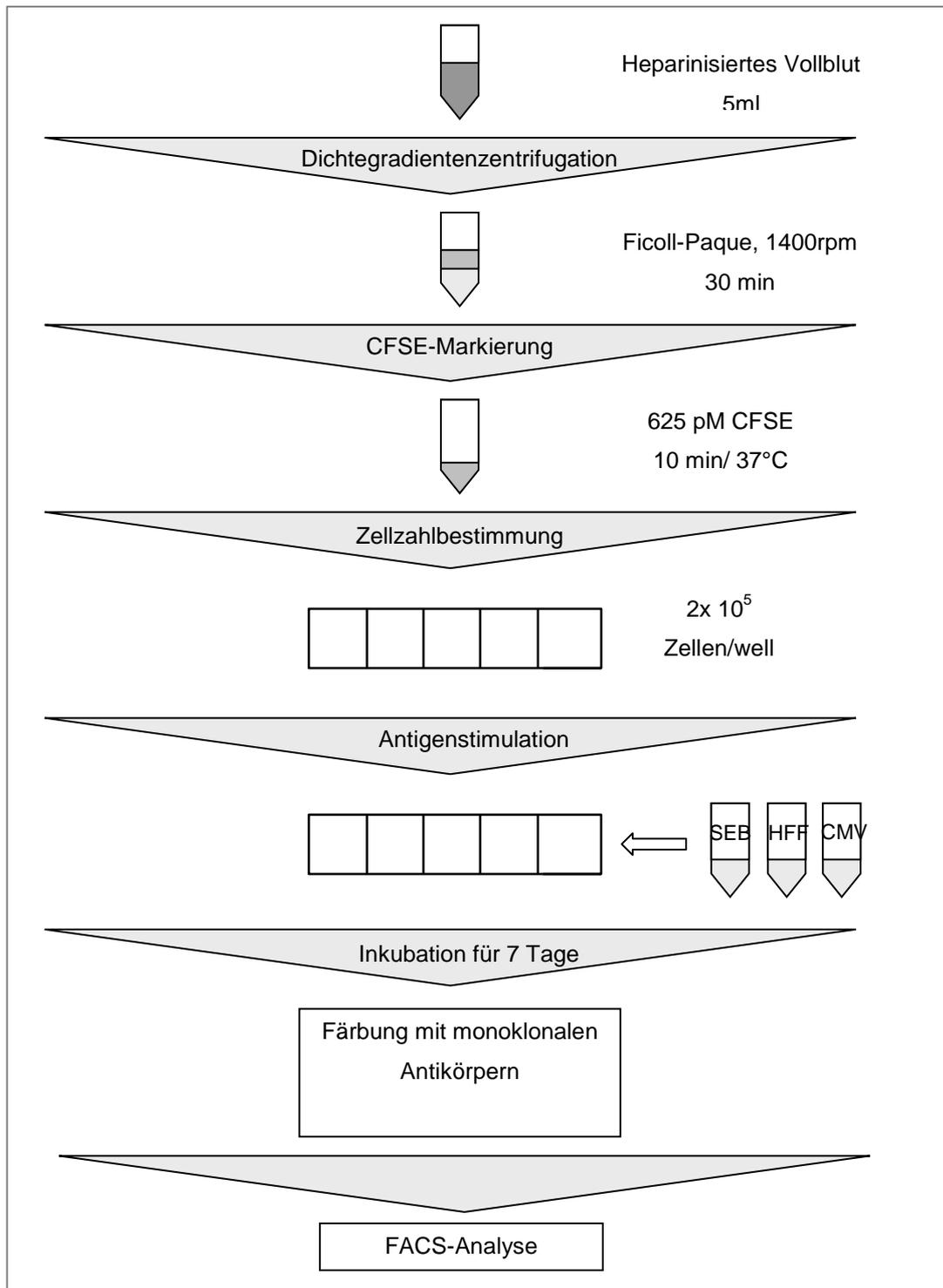


Abb. 2: Arbeitsschritte des CFSE-Proliferationsassays. CFSE: 5,6-Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester, SEB: Staphylokokkenterotoxin B, HFF: human foreskin fibroblast antigen, CMV: CMV-Antigen, FACS: flow cytometry assay

2.4 Stimulation der PBMC und Zugabe der Immunsuppressiva

Zur siebentägigen Kultivierung wurden die nun mit CFSE markierten peripheren mononukleären Zellen in Kulturmedium auf 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Je

Vertiefung wurden 2×10^5 CFSE-markierte lebende Zellen in einem Volumen von 200 μ l kultiviert. Die Zellen wurden in drei Gruppen jeweils mit dem Superantigen SEB (Staphylokokkenenterotoxin B), Cytomegalievirus-Antigen oder als Negativkontrolle mit HFF-Antigen (*human foreskin fibroblast*-Antigen) stimuliert. Je 5 μ l SEB wurden den Zellen in jeder Plattenvertiefung zugegeben. Damit lag eine Endkonzentration von 0,025 μ l je μ l Kulturansatz vor.

CMV-Antigen wurde zur spezifischen Stimulation von T-Zellen gewählt, da bei CMV-Seropositiven (50-80% der Bevölkerung von Industriestaaten) eine hohe Frequenz CMV-spezifischer Gedächtniszellen (ca. 1% aller CD4⁺-T-Zellen) zu finden ist. Daher ist die Untersuchung CMV-reaktiver Zellen besonders zur Erfassung der T-Zellfunktion geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurden 10 μ l je Zellansatz verwendet. Daneben wurden Kontrollen nur mit Medium und mit dem negativem Kontrollantigen HFF (je 10 μ l pro Zellansatz) mitgeführt. Die benutzten CMV- und HFF-Antigen-Lösungen waren aus AD169-infizierten und nicht infizierten HFF durch Glycinextraktion isoliert worden (Methode nach Waner et al. 1977). Die Antigene wurden aliquotiert bei -80° Grad Celsius gelagert und jeweils frisch aufgetaut.

Für die Untersuchung der Wirkung verschiedener MPA-Konzentrationen auf die Lymphozytenfunktion wurde PBMNC der vier freiwilligen Spender vor der Inkubation das Immunsuppressivum Mycophenolsäure hinzugefügt. Auf Grundlage der MPA-Natrium-Stammlösung (50mg/ml) wurden die Zellen den Konzentrationen 0,5 μ g MPA/ml Testansatz, 5 μ g/ml und 50 μ g/ml ausgesetzt.

Das Immunsuppressivum Cyclosporin A (Stammlösung 25mg/ml) diente als Kontrollmedikament. CsA wurde den ansonsten gleich präparierten Zellen statt der Mycophenolsäure bis zu den Konzentrationen 10ng/ml, 100ng/ml und 1000ng/ml zugegeben.

2.5 Kultivierung der Zellen und Oberflächenantigenmarkierung

Die Zellen wurden sieben Tage lang bei 37° Grad Celsius mit 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenantigenen. Dazu

wurden die Zellen mit an monoklonale Antikörper konjugierten Fluorochromen gefärbt. Um verschiedene T-Zellsubsets unterscheiden zu können und da sich die Farbstoffe auf Grund ihrer Emissionsspektren (PE mit einem Emissionsmaximum bei 576nm, APC mit einem Emissionsmaximum bei 660nm) gut miteinander kombinieren lassen, wurden Anti-CD4-PE-Antikörper sowie Anti-CD8-APC-Antikörper gewählt.

Tabelle 2: Zielantigene der fluorochrommarkierten Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Funktion/Spezifität des Antigens</u>
CD4	Phycoerycrin	Korezeptor für Major histocompatibility complex (MHC)-II-restringierte antigeninduzierte T-Zellaktivierung, Steuerung der T-B-Zell-Adhäsion unabhängig von der Antigenerkennung, Differenzierung im Thymusgewebe, T-Helfer-Zellen, Thymozytensubsets, Monozyten, Makrophagen, weitere
CD8	Allophycocyanin	Korezeptor für MHCI, zytotoxische T-Zellen, Subsets von Thymozyten

Es folgte ein Waschschrift mit FACS-Medium. In FACS-Rundbodenröhrchen überführten Zellen wurden je Probe jeweils 0,75µl anti-CD8-APC sowie 1µl anti-CD4-PE zugegeben. Es wurden jeweils 50µl anti-IgG-Blocking-Puffer hinzugefügt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Die Proben wurden für 30 Minuten im Thermomixer bei Raumtemperatur und in Dunkelheit belassen. Dann wurden ungebundene Antikörper durch Zentrifugation mit FACS-Medium entfernt und das Zellpellet in je 250 µl FACS-Medium resuspendiert. Die Röhrchen wurden auf Eis verbracht und umgehend der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt.

2.6 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

2.6.1 Grundlagen

Die Frequenz proliferierter oder proliferierender T-Lymphozyten wurde mit der Mehrkanal-Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*)

bestimmt. Diese Methode gestattet eine zügige Charakterisierung und Quantifizierung von Einzelzellen und größeren Zellpopulationen, wobei nach Laseranregung zellspezifische Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften registriert werden. Da die Mehrkanaldurchflusszytometrie eine multiparametrische Untersuchung erlaubt, lassen sich dabei beispielsweise auch verschiedene Lymphozytensubsets (z.B. CD4⁺ und CD8⁺) und spezifische T-Zellen einzeln untersuchen. Dies ermöglicht eine wenig zeitaufwändige Analyse antigenspezifischer T-Zell-Antworten.

Zu untersuchende Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom durch hydrodynamische Fokussierung, also durch Beschleunigung bei Eintritt in die konische Messküvette, einzeln an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeführt. Das *FACSCalibur*-Zytometer arbeitet mit einem luftgekühlten Argon-Ionen-Laser (erzeugt Licht der Wellenlänge 488nm) und einem He-Ne-Laser (emittiert Licht der Wellenlänge 635nm). Ein System von Linsen fokussiert das Laserlicht, bevor dieses die Zellen trifft. Passiert eine Zelle das Laserlicht, kommt es zu Streuung, Brechung oder Beugung des Lichtes. Das Streulicht wird mit Hilfe von Filtern und Linsen zu Detektoren gelenkt. Hier werden Forward Scatter (FSC, Vorwärtsstreuung, wird durch den Querschnitt beeinflusst und dient zur Bestimmung der Zellgröße) und Sideward Scatter (SSC, Streuung im 90°-Grad-Winkel zum einfallenden Licht, beeinflusst von Oberflächeneigenschaften, Granularität und Membranfaltung) registriert. Durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen können Zellpopulationen noch genauer analysiert werden. Bei Anregung durch das Laserlicht werden Elektronen des an der Zelle gebundenen Fluorochroms auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter Emission der zuvor gewonnenen Energie in Form von Photonen gelangen diese Elektronen dann wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück.

2.6.2 Datenauswertung

2.6.2.1 Grafische Darstellung der FACS-Daten

Die vom FACS-Gerät detektierten Lichtsignale wurden mit geeigneter Software (*CellQuest Pro*) ausgewertet. In der vorliegenden Untersuchung wurde die antigeninduzierte Proliferation der verschiedenen T-Lymphozyten-Subsets CD4⁺

und CD8⁺ gemessen. Die Klassifizierung der Zellen erfolgte mit einem Punktwolkenhistogramm in der so genannten „dot plot“-Darstellung. Die Messwerte wurden als „Events“ zweidimensional dargestellt, wobei jeweils 10000 CD4⁺-Zellen je Probe analysiert wurden. Es erfolgte eine Untersuchung nach Größe und Granularität. So ließen sich die verschiedenen Leukozytenpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) darstellen, zugleich konnten avitale Zellen „aussortiert“ werden. Nur die Population der vitalen Lymphozyten wurde in die weitere Untersuchung einbezogen. Nun konnten die Zellen in diesem Fenster über ihre Fluoreszenzeigenschaften näher klassifiziert werden. Es wurde eine Quadrantendarstellung gewählt (s. Abb. 3), die auch als Grundlage der statistischen Auswertung benutzt wurde. Hier wurde die Fluoreszenzintensität von CFSE und der verschiedenen Antikörper gegeneinander aufgetragen. Die Quadrantenstatistik veranschaulicht den prozentualen Anteil der verschiedenen Fluoreszenzsignale in den einzelnen Quadranten. Sie erlaubt eine Bestimmung von Zellen, die negativ, einfach positiv oder doppelt positiv für die untersuchten Eigenschaften sind. Das Färbemuster der verschiedenen Zellsubpopulationen wurde mit den Daten über SSC und FSC kombiniert. So konnte gezeigt werden, welche Zellen in der Probe vorhanden sind und zu welchem Prozentsatz.

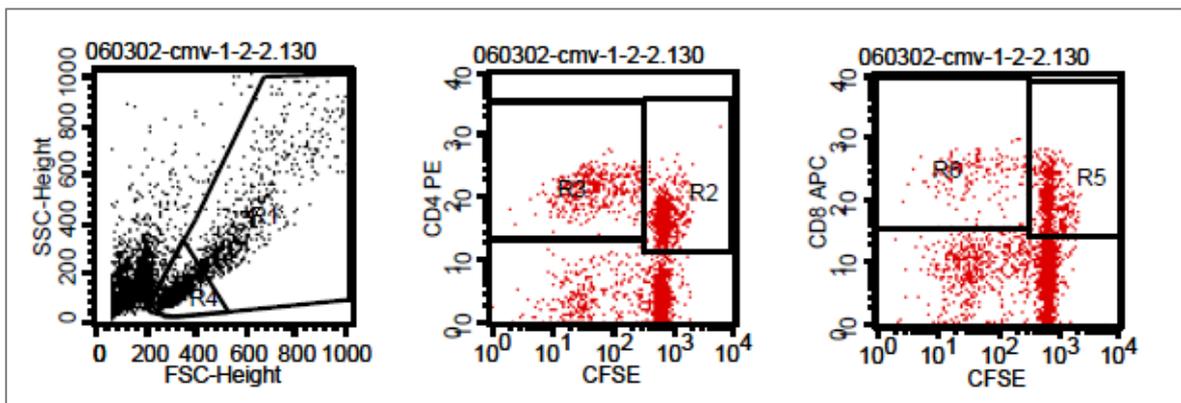


Abb. 3: Beispiel einer dot plot-Darstellung zur Auswertung der Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen mittels Durchflusszytometrie. SSC: Sideward Scatter, FSC: Forward Scatter, PE: Phycoerycrin, APC: Allophycocyanin, CFSE=5,6-Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester.

Die Abbildung des Streulichtdiagramms zeigt die Blastenregion R4. Es ist der CD4- bzw. CD8-Marker (y-Achse) gegen CFSE (x-Achse) aufgetragen. Durch das Setzen weiterer Regionen konnten proliferierende von nicht proliferierenden Zellen unterschieden werden. Teilt sich eine Zelle, wird der CFSE-Gehalt der Mutterzelle

auf die beiden Tochterzellen verteilt. Dementsprechend finden sich in den Darstellungen der FACS-Ergebnisse diejenigen Zellen, die sich nicht geteilt haben auf Grund ihrer Fluoreszenzdichte rechts auf der x-Achse. In der Quadrantendarstellung liegen die proliferierenden Zellen in den Regionen R3 für die CD4⁺-Zellen und in R6 für die CD8⁺-Zellen.

2.6.2.2 Berechnung der Zellteilungsindizes

Die gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel weiterverarbeitet. Der Zellteilungsindex CDI (cell division index) wurde jeweils für CD8⁺- und CD4⁺-Zellen getrennt berechnet. Dazu diente in Anlehnung an Mannering (2003) die folgende Formel:

$$CDI = \frac{\frac{\text{geteilte ZellenmitMed}}{(\text{geteilte ZellenmitMed} + \text{nicht geteilte ZellenmitMed})}}{\frac{\text{geteilte ZellenohneMed}}{(\text{geteilte ZellenohneMed} + \text{nicht geteilte ZellenohneMed})}}$$

Hier steht „ohneMed“ für die Zellen, die nicht mit einem Immunsuppressivum inkubiert wurden, „mitMed“ dagegen für die mit MPA oder CsA behandelten Zellen.

2.7 CD4⁺- und CD8⁺-Zellproliferation unter MMF- bzw. EC-MPS-Therapie

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Lymphozytenproliferation bei Patienten mit IgA-Nephritis unter MMF- bzw. EC-MPS-Erhaltungstherapie untersucht. Diese Patienten (n=7) waren Teilnehmer an einer in Kooperation mit der Sektion Nephrologie des Universitätsklinikums Ulm durchgeführten Studie zum Vergleich der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von MMF und EC-MPS. Bei den Patienten lag eine bioptisch gesicherte, progredient verlaufende IgA-Nephritis vor. Der progrediente Verlauf wurde bei einem Anstieg des Serumkreatinins um 25% innerhalb von mindestens drei Monaten bis höchstens drei Jahren diagnostiziert. Die Patienten hatten zuvor eine Induktionstherapie mit Cyclophosphamid- oder Steroidpulsen erhalten. Als Begleitmedikation nahmen die Patienten jeweils Prednisolon in einer niedrigen Dosis von maximal 5 mg täglich und einen ACE-

Hemmer bzw. ein Sartan ein, fakultativ war die Einnahme von Fischölpräparaten. Zudem bestand z.T. eine Komedikation mit Diuretika, Calcitriol, einem Statin, Protonenpumpenhemmern, einem Betablocker oder Allopurinol.

Voraussetzung für die Untersuchung war ein positives Votum der lokalen Ethikkommission und eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten. Ausschlusskriterien für die Studie waren ein Alter unter 18 Jahren, das Bestehen einer malignen Erkrankung, die Einnahme weiterer Immunsuppressiva und Schwangerschaft bzw. demnächst geplante Schwangerschaft. Auch die Einnahme von Colestyramin, magnesium- oder aluminiumhaltigen Antazida, Rifampicin, oralen Kontrazeptiva oder Ganciclovir bis 14 Tage vor Studienbeginn galt als Ausschlusskriterium.

Die Untersuchung zum Vergleich von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik wurde als randomisierte prospektive Crossoverstudie durchgeführt. Dabei wurde Mycophenolatmofetil in einer Dosis von 500mg (orale Gabe zweimal täglich, Cellcept®) mit EC-MPS in einer Dosis von 360mg (p.o. zweimal täglich, Myfortic®) verglichen. Um einen Steady State zu erreichen, nahmen die Patienten mindestens zwei Wochen lang die Medikation ein, bevor am Untersuchungstag Blut entnommen wurde. Im Verlauf wurden die Patienten dann auf das jeweils andere Präparat umgestellt, so dass jeder Patient einmal MMF und einmal EC-MPS erhielt. An jedem der beiden Untersuchungstage wurden je Patient insgesamt acht venöse Blutproben (jeweils 10ml, Antikoagulation mit Natriumheparinat) entnommen. Die erste Blutabnahme erfolgte vor der morgendlichen Medikamenteneinnahme (Zeitpunkt t_0), die weiteren folgten zu den Zeiten 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 und 12 Stunden nach Medikamenteneinnahme. 30 Minuten vor der morgendlichen Medikation wurde ein standardisiertes Frühstück serviert. Zur ergänzenden Bestimmung pharmakokinetischer Parameter wurde zu den acht Entnahmezeitpunkten je ein Serumröhrchen (10 ml) gefüllt. Das Serum wurde abzentrifugiert (30min, 1200g) und tiefgefroren. Die Bestimmung der Mycophenolsäure- und MPAG-Konzentration erfolgte mittels HPLC-Assay im Nephrologischen Labor der Charité Berlin, wohin die Proben gefroren verschickt wurden.

Zum Vergleich der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen pharmakodynamischen Parameter mit pharmakokinetischen Daten wurde ebenfalls im Nephrologischen

Labor der Charité die Aktivität der IMPDH mittels HPLC (high performance liquid chromatography) aus PBMNC bestimmt. Dazu wurde die Umwandlung von exogen zugeführtem Inosin-5'-Monophosphat in Xanthosin-5'-Monophosphat aus lysierten PBMNC chromatographisch gemessen (Methodik beschrieben von Glander et al. 2001).

Für den Proliferationsassay wurde die Isolierung der PBMNC wie in Abschnitt 3.2 beschrieben vorgenommen. Auch hier wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 2×10^5 in einem Volumen von 200 μ l je Plattenvertiefung eingestellt. Statt Spenderzellen fanden Patienten-PBMNC der verschiedenen Entnahmezeitpunkte Verwendung. Die Ansätze enthielten neben den in 100 μ l komplettem Kulturmedium suspendierten PBMNC 100 μ l des jeweiligen Serums zum definierten Entnahmezeitpunkt. Außerdem wurden Zellen mit MPA in den Konzentrationen 100ng/ml bzw. 500ng/ml und mit CsA in der Konzentration 1,25 μ g/ml sowie ein Ansatz ohne Immunsuppressivum kultiviert. Als Nährmedium diente bei diesen vier Ansätzen eine Mischung aus 95% Kulturmedium ohne FCS und 5% Serum des Zeitpunktes t_0 . Die Zellen wurden wiederum mit 10 μ l HFF-Ag, 10 μ l CMV-Ag oder 5 μ l SEB-Ag stimuliert.

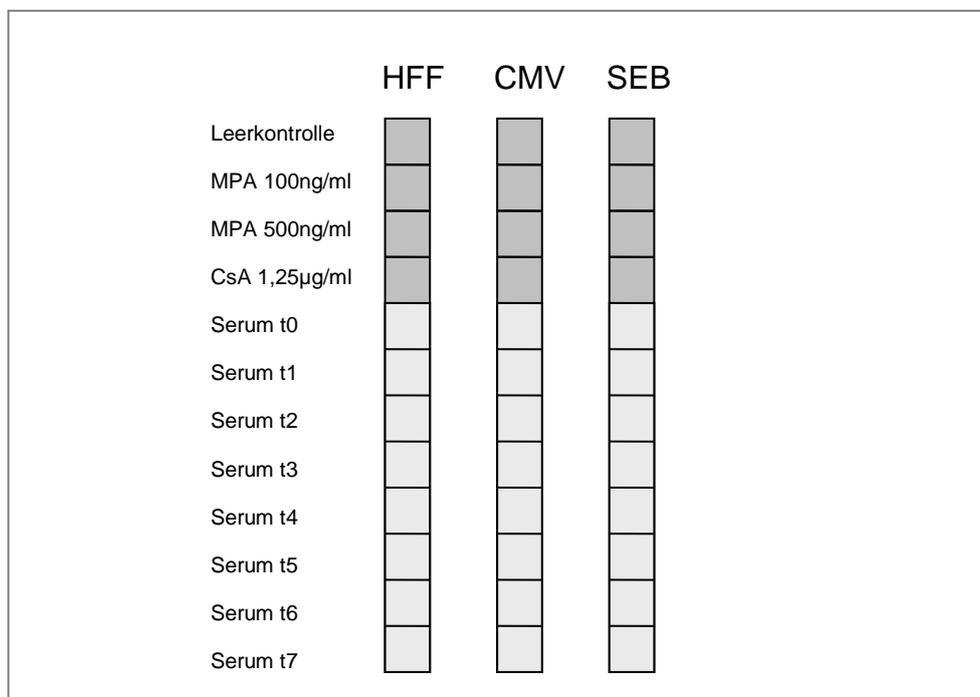


Abb. 4: Pipettierschema. MPA: Mycophenolsäure, CsA: Cyclosporin A, HFF: human foreskin fibroblast antigen, CMV: Cytomegalievirus-Antigen, SEB: Staphylokokkenenterotoxin B, t1-t7: Zeitpunkt der Blutabnahme

2.8 Proliferation heterologer Lymphozyten nach Zugabe von Patientenserum

Im dritten Teil der Arbeit wurden nun Spender-PBMNC (in der Folge auch als „*third party*“-Zellen bezeichnet) eines gesunden Freiwilligen (Blutgruppe 0, Rhesusfaktor positiv, CMV-seropositiv) mit Sera von Patienten aus der Crossoverstudie inkubiert. In der Folge wurde die Proliferationsaktivität bestimmt. Für diesen Versuchsteil wurden 40ml venöses Blut entnommen und wie bisher antikoaguliert. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte ebenfalls direkt nach der Abnahme, die Aufarbeitung geschah parallel zu der der Patientenzellen. Die Zellen wurden in einer Mischung aus 50% des jeweiligen Patientensersums und 50% komplettem Kulturmedium inkubiert. Vor Inkubation wurden die Zellen ebenfalls mit HFF-, CMV- und SEB-Antigen stimuliert, die Proliferationsmessung erfolgte erneut mit der FACS-Methode unter Nutzung von CFSE.

2.9 Statistische Methoden

Zur Beschreibung der Variablen dienen die Lagemaße Median, Minimum und Maximum sowie das 95%-Konfidenzintervall des Medians und die Spannweite. Die deskriptive Statistik wurde mit Hilfe der Software Microsoft™ Excel vorgenommen. Graphische Darstellungen wurden unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel bzw. mit GraphPad Prism 6 erstellt. Zur statistischen Testung fand die GraphPad Prism 6-Software Verwendung. Eine Normalverteilung der Daten lag nicht vor. Es wurde für unverbundene, nicht normalverteilte Stichproben der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Für verbundene, nicht normalverteilte Daten wurde der Wilcoxon-Vorzeichentest verwendet. Korrelationen wurden mit dem Spearman-Rangkorrelationstest untersucht. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Bei der Voruntersuchung mit insgesamt vier Spendern wurde auf eine statistische Analyse auf Grund der geringen Fallzahl verzichtet. Die Analyse der IC_{50} (Medikamentenkonzentration, die eine 50%ige Inhibition z.B. der Proliferation oder der Enzymaktivität erzielt) wurde mit Hilfe nichtlinearer Regressionsanalyse (Prism 6) durchgeführt. Es wurden nach Transformation der MPA-Konzentration x in $\log(x)$ sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurven angefertigt.

Das pharmakokinetische Maß der AUC wurde unter Verwendung der linearen Trapezregel mit der GraphPad Prism 6-Software ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 T-Zellproliferation unter dem Einfluss von MPA und CsA bei Gesunden

An PBMNC gesunder Freiwilliger (n=4) wurde untersucht, welchen Effekt in vitro zugegebene Mycophenolsäure und Cyclosporin A in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten haben. Dazu wurde die Lymphozytenproliferation nach Medikamentenzugabe mit dem im Abschnitt Methoden beschriebenen CFSE-Assay untersucht. Die Daten werden bei geringer Probandenzahl aufgeschlüsselt nach Einzelspendern wiedergegeben, auf eine weitere statistische Analyse wurde verzichtet.

3.1.1 T-Lymphozytenproliferation nach in vitro-Zugabe von Cyclosporin A

Die Spender-PBMNC wurden zunächst mit Cyclosporin A in den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml inkubiert, die Stimulation erfolgte mit dem Superantigen SEB. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen wurde mittels Durchflusszytometrie die CFSE-Reduktion zur Quantifizierung der Zellproliferation bestimmt. Daraus konnte dann der Zellteilungsindex CDI und in Relation zum Ausgangswert ohne Medikament die Proliferationsaktivität in Prozent ermittelt werden.

Die folgenden Grafiken zeigen in einer bivariaten Darstellung die Konzentration des Immunsuppressivums auf der x-Achse und die spezifische Proliferationsaktivität der Zellen auf der y-Achse.

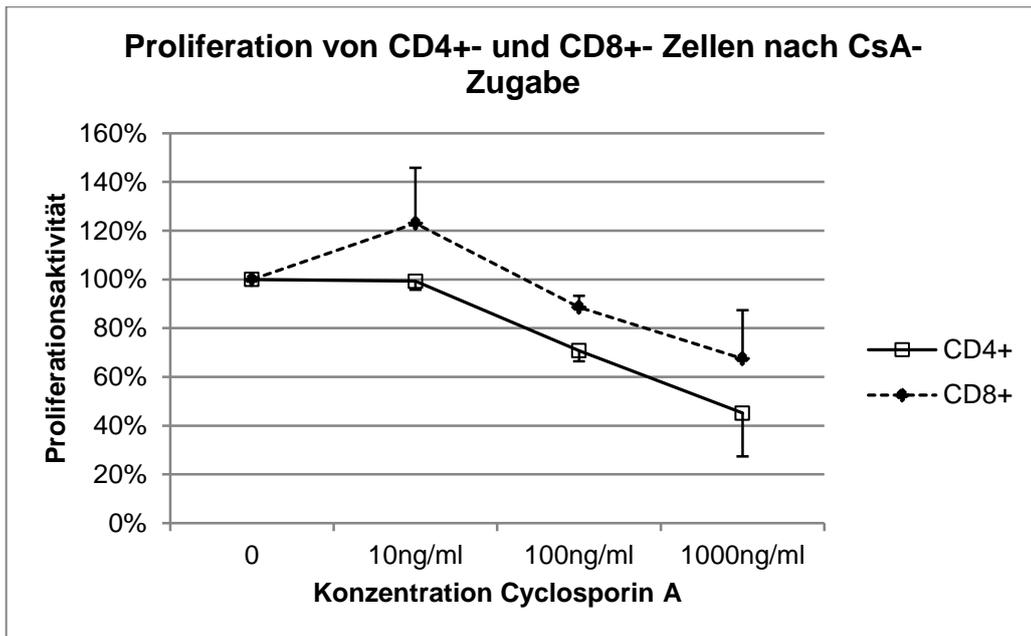


Abb. 5: Konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation durch Cyclosporin A (CsA) bei vier gesunden Spendern (Mittelwert und Standardabweichung). CD4: CD4-positive Zellen, CD8: CD8-positive Zellen.

Es war eine mit steigender Konzentration von Cyclosporin A zunehmende und dosisabhängige Hemmung der SEB-stimulierten CD4⁺-Zellproliferation zu beobachten. Die CD4⁺-Lymphozytenproliferation betrug nach Applikation von 10ng/ml CsA im Median noch 100% (Bereich 94-104%, 25%-Quartil 98%, 75%-Quartil 101%). Nach Zugabe von 100 ng/ml CsA sank die Proliferationsaktivität auf 72% (Median, 25%-Quartil 70%, 75%-Quartil 73%, Bereich 64-76%). Bei 1000 ng/ml betrug die Proliferation noch 42% (Median, 1. Quartil 40%, 3. Quartil 57%). Hier waren die Unterschiede – auch in der Grafik ablesbar - zwischen den vier untersuchten Personen deutlich größer mit einem Minimum von 16% und einem Maximum von 61%.

Die CD8⁺-Lymphozytenproliferation betrug bei einer CsA-Konzentration von 10 ng/ml im Median 111% (Bereich 109-162%, 25%-Quartil 109%, 75%-Quartil 125%). Erst bei Zugabe von 100 ng/ml CsA sank die Proliferation auf nun noch 90% (Median, 25%-Quartil 87%, 75%-Quartil 92%, Bereich 81-93%). Nach Applikation von 1000ng/ml waren noch 75% der Ausgangsaktivität zu verzeichnen (1. Quartil 59%, 3. Quartil 83%). Die interindividuellen Unterschiede waren hier erneut groß mit einer Spanne von 35-84% der Ausgangsaktivität.

3.1.2 T-Lymphozytenproliferation nach in vitro-Zugabe von Mycophenolsäure

Es konnte sowohl für CD4⁺- als auch für CD8⁺-Zellen bei den eingesetzten MPA-Konzentrationen eine effektive Proliferationshemmung beobachtet werden.

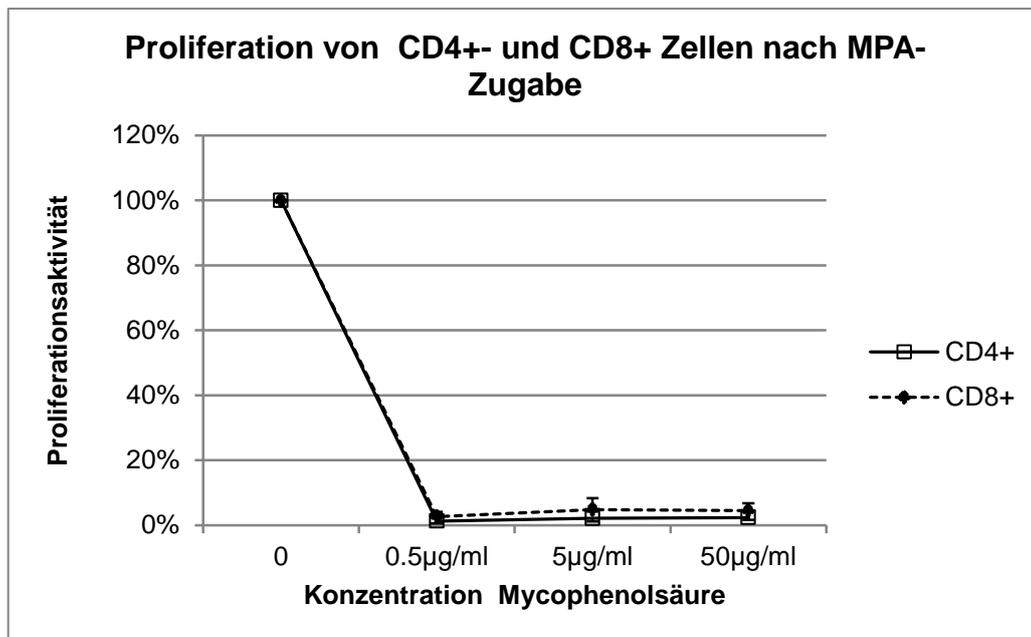


Abb. 6: Inhibierender Einfluss verschiedener Konzentrationen von Mycophenolsäure (MPA) auf die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten bei vier gesunden Spendern. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

Schon bei der geringsten eingesetzten, subtherapeutischen Konzentration von 0,5 µg MPA/ml Testansatz reduzierte sich die Proliferationsaktivität auf im Median 2% für CD4⁺-Zellen und auch für CD8⁺-Zellen (Bereich für CD4⁺ 0-2%, 1. Quartil 1%, 3. Quartil 2%, Bereich für CD8⁺ 1-5%, 1. Quartil 2%, 3. Quartil 3%).

Bei den beiden weiteren Konzentrationen wurde die Lymphozytenproliferation ähnlich stark gehemmt: In der Messung der CD4⁺-Proliferation sank die spezifische Aktivität auf 2% (Bereich 1-3%, 1. Quartil 1%, 3. Quartil 3%) bei 5 µg/ml und auf 3% bei 50 µg/ml (1. Quartil 2%, 3. Quartil 3%, Bereich 1-3%). Für beide T-Zell-Subtypen war das Ausmaß der Proliferationshemmung ähnlich, auch CD8⁺-Zellen wurden deutlich inhibiert, bei 5 µg/ml betrug die Proliferationsaktivität 3% (Median, Bereich 2-11%, 1. Quartil 2%, 3. Quartil 6%). Bei 50 µg/ml lagen noch 4% Aktivität vor (Bereich 2-8%, 1. Quartil 3%, 3. Quartil 5%).

Insgesamt konnte mit dem beschriebenen CFSE-gestützten Assay ein proliferationshemmender Effekt der Immunsuppressiva Mycophenolsäure und Cyclosporin A bei in vitro-Zugabe zu humanen Spender-PBMNC demonstriert werden. Die Proliferationshemmung war konzentrationsabhängig. Dies galt für beide untersuchten T-Zellsubtypen.

Um den Effekt weiterer als der bisher verwendeten MPA-Konzentrationen auf die Proliferation von T-Zellen zu prüfen, wurden anschließend PBMNC eines einzelnen freiwilligen Spenders (Blutgruppe 0, CMV-seropositiv) insgesamt elf verschiedenen Mycophenolsäurekonzentrationen ausgesetzt. Die antigenspezifische Stimulation erfolgte mit dem Recallantigen CMV, während zur polyklonalen Stimulation SEB eingesetzt wurde. Die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-positiven Zellen wurde auch hier in vitro dosisabhängig durch Mycophenolsäure inhibiert. Der beschriebene Zusammenhang zwischen Mycophenolsäurekonzentration und Lymphozytenproliferation bezogen auf den Ausgangswert ohne Immunsuppressivum ist in Abb. 7 als sigmoidale E_{max}-Kurve mit logarithmischer Aufteilung der x-Achse dargestellt:

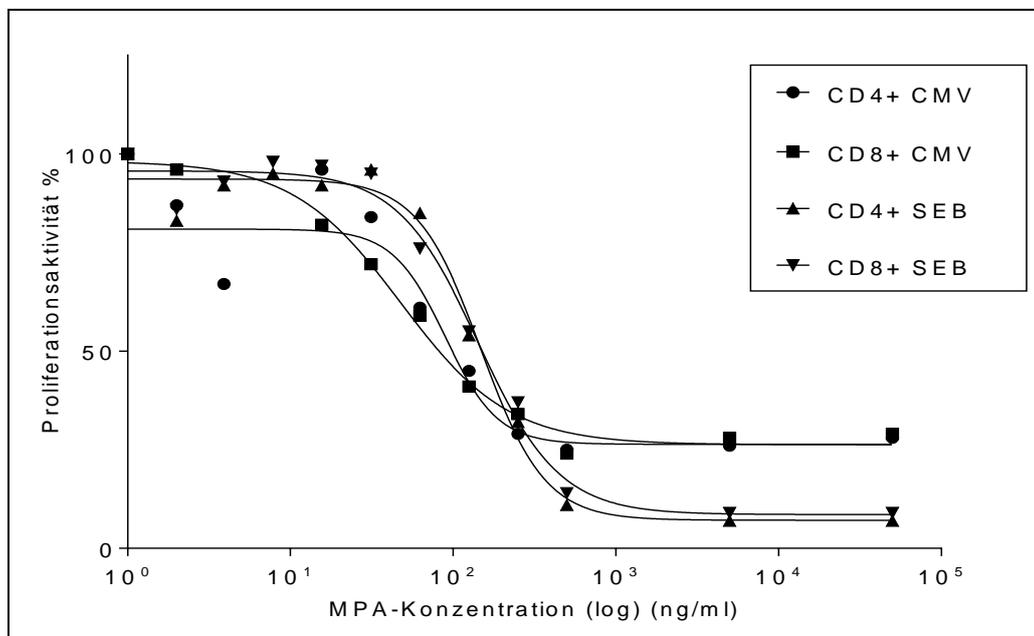


Abb. 7: Modulation der T-Zellproliferation durch Mycophenolsäure (MPA)-in-vitro-Zugabe, Darstellung als sigmoidale E_{max}-Kurve. CD4+ CMV: CD4-positive Zellen nach Stimulation mit CMV (Cytomegalievirusantigen), CD8+ SEB: CD8-positive Zellen nach Stimulation mit Staphylokokkenenterotoxin B

Mittels nichtlinearer Regressionsanalyse wurde die IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) bestimmt, also diejenige Medikamentenkonzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition der T-Zellproliferation beobachtet wurde.

Die IC_{50} nach Stimulation mit SEB lag für $CD4^+$ -Zellen bei 148.4 ng/ml (95%-Konfidenzintervall 116,4-189,2 ng/ml) sowie bei 142.8 ng/ml für $CD8^+$ -Zellen (95%-Konfidenzintervall 108,9-187,1 ng/ml).

Nach Stimulation mit dem Recallantigen CMV betrug die IC_{50} 89,3 ng/ml für $CD4^+$ -Zellen (95%-Konfidenzintervall 34-228 ng/ml) und 47,6 ng/ml für $CD8^+$ -Zellen (95%-Konfidenzintervall 35,5-63,9 ng/ml).

3.2 Pharmakokinetik und -dynamik der Mycophenolsäure bei IgA-Nephritis

Im folgenden Teil der Arbeit wurde geprüft, wie die Proliferation von T-Zellen bei Patienten mit IgA-Nephritis unter MMF- bzw. EC-MPS-Therapie beeinflusst wird.

Es wurden PBMNC von insgesamt sieben Patienten mit progredienter IgA-Nephritis und MPA-Monotherapie in dem in Abschnitt 2.7 beschriebenen Crossoverdesign untersucht. Bei den Patienten handelte es sich um sechs Männer und eine Frau, der Altersmedian betrug 47 Jahre (Altersspanne 41 bis 78 Jahre). Das Serumkreatinin lag im Median bei 321 $\mu\text{mol/l}$ (Minimum 188 $\mu\text{mol/l}$, Maximum 487 $\mu\text{mol/l}$).

Bei drei Patienten wurde bei der MMF-Medikation eine Dosisreduktion wegen gastrointestinaler Beschwerden vorgenommen. Diesen Patienten wurde morgens und abends je 250 mg MMF statt 500 mg zweimal täglich verabreicht. Da ein Vergleich der Effektorzellproliferation mit der jeweiligen MPA-Plasmakonzentration weiterhin möglich war, gingen die betroffenen Probanden ebenfalls in die Untersuchung der pharmakodynamischen Parameter mit ein.

Bei der Therapie mit EC-MPS war bei keinem Patienten eine Dosisreduktion notwendig, so dass alle Patienten zweimal täglich 360 mg EC-MPS erhielten.

PBMNC der Patienten wurden aus Vollblut zu den Zeitpunkten t_0 (=vor Einnahme der morgendlichen Dosis) und dann 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 und 12 Stunden nach Medikamenteneinnahme isoliert.

Neben der T-Zellproliferation wurden zu jedem Zeitpunkt die Konzentrationen von MPA und MPAG und die IMPDH-Aktivität untersucht.

Daneben wurden PBMNC zum Zeitpunkt t_0 mit jeweils 100 ng/ml MPA, 500 ng/ml MPA und 1,25 μ g/ml CsA inkubiert.

3.2.1 Konzentrations-Zeit-Profile der Mycophenolsäure im Plasma

Bei der Bestimmung der Mycophenolsäurekonzentration nach EC-MPS- bzw. MMF-Einnahme fiel eine große interindividuelle Variabilität zwischen den verschiedenen Probanden auf. Es werden in der Abbildung 8 für die Phase der MMF-Einnahme nur die vier Patienten mit voller Dosis von zweimal 500 mg Mycophenolatmofetil gezeigt, während in Abb. 9 die MPA-Konzentrationen aller sieben Patienten mit EC-MPS-Einnahme dargestellt sind.

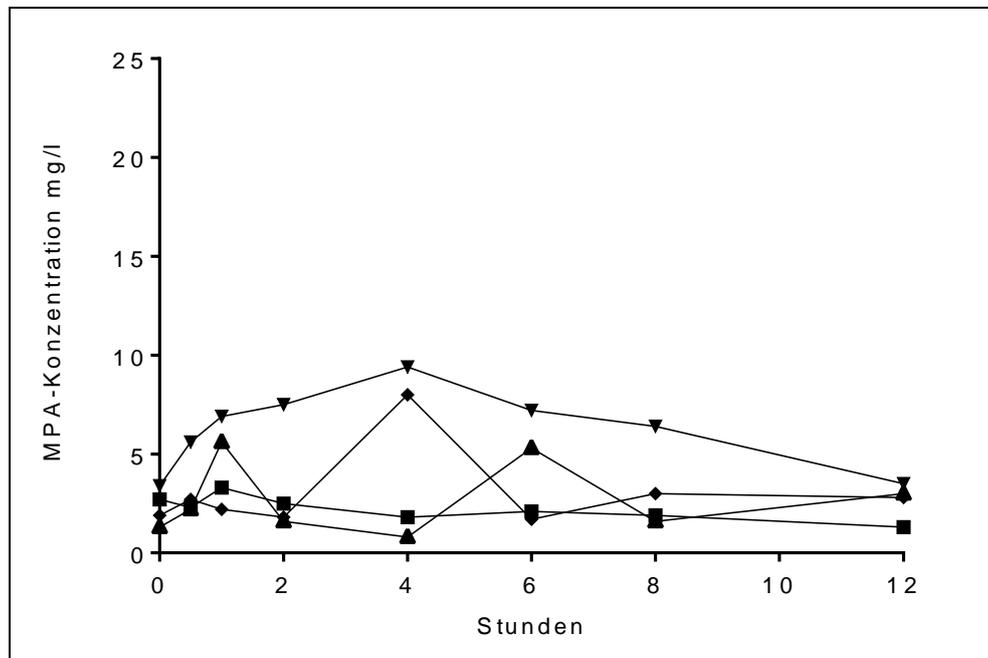


Abb. 8: Mycophenolsäure- (MPA-)Konzentration nach Einnahme von 500 mg Mycophenolatmofetil 2x täglich. Die Symbole ▲, ▼ etc. stehen für jeweils einen Patienten.

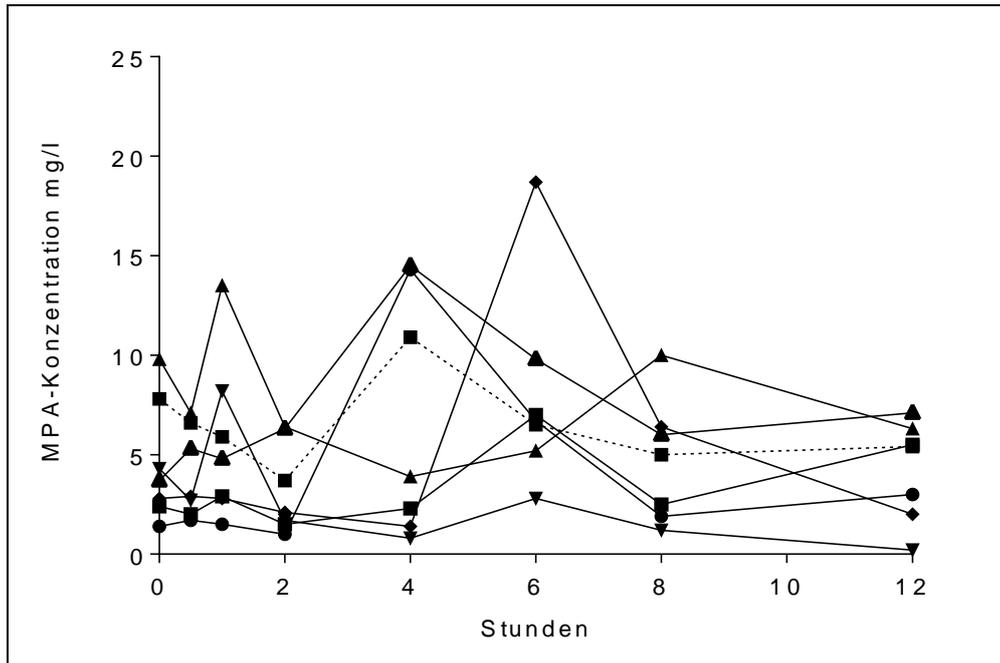


Abb. 9: Konzentrations-Zeit-Profile der einzelnen Patienten nach Einnahme von enteric coated-Mycophenolsäure. MPA: Mycophenolsäure. Jeder Patient wird durch ein Symbol wie ▼, ■ repräsentiert.

Den Median der MPA-Konzentration nach voller Dosis von MMF und EC-MPS zeigt Abb. 10. Es sind zwei Konzentrationsmaxima zu erkennen, einmal nach einer Stunde und erneut verzögert nach vier Stunden für die MMF-Phase bzw. sechs Stunden für die EC-MPS-Phase. Dieser zweite Konzentrationspeak wird durch den enterohepatischen Kreislauf hervorgerufen. Auffallend sind die höheren Werte für die Phase der EC-MPS-Einnahme insbesondere zu den Zeitpunkten ab vier Stunden nach Einnahme.

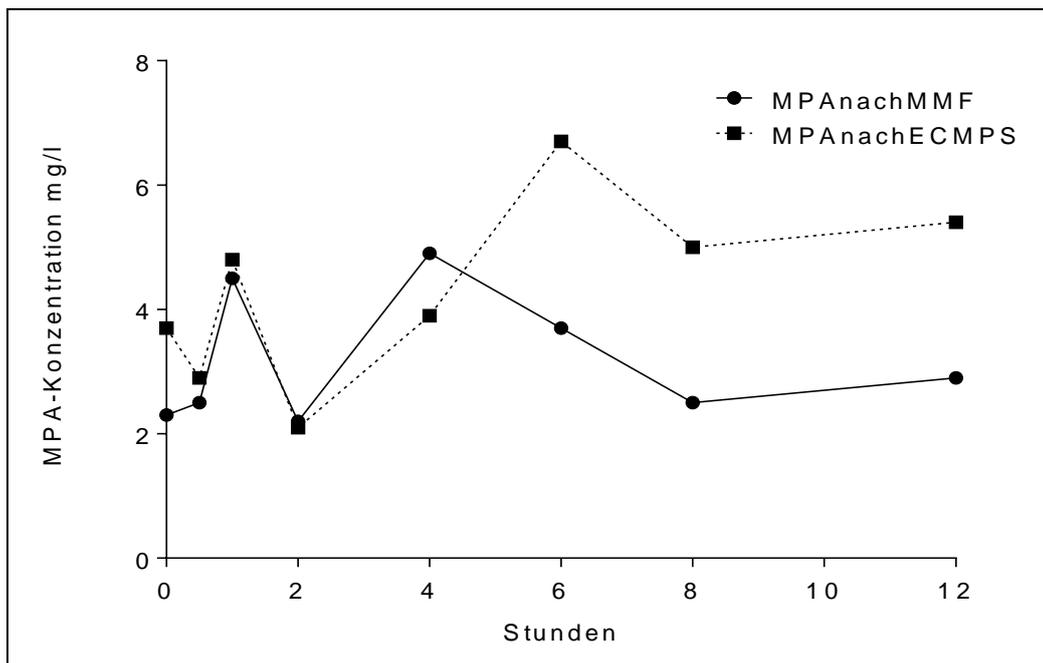


Abb. 10: Median der MPA-Konzentration für die EC-MPS- und MMF-Phase. MPA: Mycophenolsäure, EC-MPS: enteric coated-Mycophenolsäure, MMF: Mycophenolatmofetil

Die verschiedenen pharmakokinetischen Parameter nach MMF- und EC-MPS-Gabe sind in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Tabelle 3: Pharmakokinetik von Mycophenolatmofetil (MMF) und enteric coated-Mycophenolsäure (EC-MPS): angegeben ist der jeweilige Median der Mycophenolsäure-Konzentration C sowie das 1. und 3. Quartil (in Klammern) zu den verschiedenen ,Abnahmezeitpunkten. AUC: area under time-concentration curve, t_{max}/t_{min}: Zeitpunkt der maximalen/minimalen Konzentration, c_{max}/c_{min}: maximale/minimale Konzentration

	MMF	EC-MPS
C _{0h}	2,3 mg/l (1,8 / 2,9 mg/l)	3,7 mg/l (2,6 / 6,1 mg/l)
C _{0,5h}	2,5 mg/l (2,3 / 3,4 mg/l)	2,9 mg/l (2,4 / 6,1 mg/l)
C _{1h}	4,5 mg/l (3,5 / 5,9 mg/l)	4,8 mg/l (2,9 / 7,1 mg/l)
C _{2h}	2,2 mg/l (1,8 / 3,8 mg/l)	2,1 mg/l (1,6 / 5,0 mg/l)
C _{4h}	4,9 mg/l (1,6 / 8,4 mg/l)	3,9 mg/l (1,9 / 12,6 mg/l)
C _{6h}	3,7 mg/l (2,0 / 5,8 mg/l)	6,7 mg/l (5,9 / 8,4 mg/l)
C _{8h}	2,5 mg/l (2,8 / 3,9 mg/l)	5 mg/l (2,2 / 6,2 mg/l)
C _{12h}	2,9 mg/l (2,4 / 3,1 mg/l)	5,4 mg/l (2,5 / 5,9 mg/l)
AUC _{12h}	35,6 mg*h/l (25,8 / 69,66 mg*h/l)	70,8 mg*h/l (43,1 / 86,5 mg*h/l)
t _{max} (h)	2,5 h (1,0 / 4,0 h)	4 h (2,5 / 5h)

t_{\min} (h)	5 h (3 / 7,5 h)	2 h (2 / 4h)
c_{\max} mg/l	6,8 mg/l (5,0 / 8,4 mg/l)	13,5 mg/l (9,6 / 14,4 mg/l)
c_{\min} mg/l	1,75 mg/l (1,2 / 2,1 mg/l)	1,5 mg/l (1,2 / 3,7 mg/l)

Die MPA-Konzentration reichte in der Phase der MMF-Einnahme von 0,8 bis 9,4 mg/l mit einem Medianwert über alle Messzeitpunkte von 2,7 mg/l, während der Median der MPA-Konzentration nach EC-MPS-Einnahme mit 4,5 mg/l signifikant höher ausfiel (Bereich 0,8-24,5 mg/l, $p=0,001$).

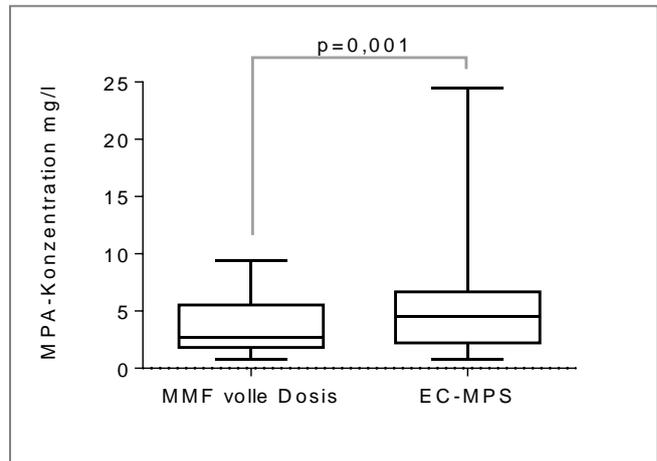


Abb. 11: Median und Spannweite der MPA (Mycophenolsäure)-Konzentration für beide Einnahmephasen. MMF: Mycophenolatmofetil, EC-MPS: enteric coated-Mycophenolsäure

Die maximalen Konzentrationen c_{\max} waren nach Einnahme von EC-MPS ebenfalls signifikant höher, Median 13,5 mg/l vs. 6,8 mg/l nach MMF, $p=0,04$.

Auch für die AUC_{12h} ergaben sich für die Phase der EC-MPS-Einnahme tendenziell höhere Werte als für die MMF-full-dose-Gruppe (Median 70,8 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ bzw. 35,6 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$). Der Unterschied war allerdings nicht signifikant.

Nach EC-MPS-Einnahme wurde die maximale MPA-Konzentration nach vier Stunden erreicht (Median, Bereich 1-6h) und war damit später zu verzeichnen als die maximale MPA-Konzentration nach MMF-Einnahme (Median 2,5 Stunden, Bereich 1-4h), ein signifikanter Unterschied bestand aber nicht. Ein späteres Konzentrationsmaximum für EC-MPS wäre mit der verzögerten Resorptionskinetik des Präparates gut vereinbar. Auch die niedrigsten Konzentrationen wurden zu interindividuell unterschiedlichen Zeitpunkten detektiert: Unter MMF-Therapie nach 5 Stunden (Median, 0-12h), nach EC-MPS-Einnahme 2 Stunden nach der morgendlichen Einnahme (Bereich 0-12h) (kein signifikanter Unterschied).

3.2.2 Verlauf der MPAG-Konzentration

Zu jedem Zeitpunkt wurde auch die Konzentration des biologisch inaktiven Metaboliten Mycophenolsäureglucuronid bestimmt. Hier fanden sich nach MMF niedrigere Konzentrationen als nach EC-MPS.

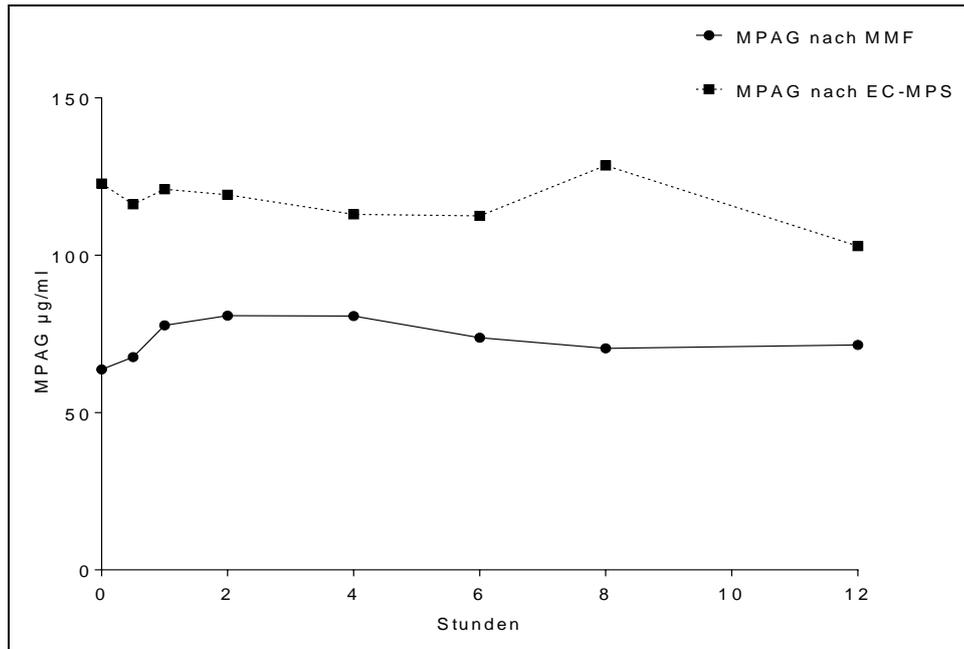


Abb. 12: Konzentrations-Zeitprofil der MPAG-Konzentration (jeweils Median, n=11). MPAG: Mycophenolsäureglucuronid, MMF: Mycophenolatmofetil, EC-MPS: enteric coated-Mycophenolsäure

Die maximale MPAG-Konzentration c_{max} wurde 2,5 Stunden (MMF) bzw. 4 Stunden (EC-MPS) nach Einnahme bestimmt, ein signifikanter Unterschied bestand zwischen den beiden Einnahmephasen nicht. Die nach EC-MPS-Einnahme gemessenen MPAG-Konzentrationen waren signifikant höher als die nach MMF-Einnahme (Median 114,7 mg/l, Bereich 36,2-225,3 mg/l vs. 70,9 mg/l, Bereich 32,4-111,4 mg/l, $p < 0,0001$).

Tabelle 4: Pharmakokinetik von Mycophenolsäureglucuronid MPAG. Median der MPAG-Konzentration mit 1. und 3. Quartil nach Einnahme von Mycophenolatmofetil MMF und enteric coated-Mycophenolsäure EC-MPS, C=Zeitpunkt nach Einnahme, AUC: area under time-concentration curve, t_{max}/t_{min}: Zeitpunkt der maximalen/minimalen Konzentration, c_{max}/c_{min}: maximale/minimale Konzentration

	MMF	EC-MPS
C _{0h}	63,7 mg/l (50,4 / 78,4 mg/l)	122,8 mg/l (74,2 / 134,7 mg/l)
C _{0,5h}	67,6 mg/l (52,3 / 84,3 mg/l)	116,2 mg/l (74,1 / 129,5 mg/l)
C _{1h}	77,7 mg/l (62,4 / 90,8 mg/l)	121,0 mg/l (86,9 / 139,9 mg/l)
C _{2h}	80,8 mg/l (65,6 / 93,8 mg/l)	119,2 mg/l (70,6 / 139,7 mg/l)
C _{4h}	80,7 mg/l (68,3 / 97,0 mg/l)	113,0 mg/l (77,5 / 139,5 mg/l)
C _{6h}	73,8 mg/l (68,8 / 85,2 mg/l)	112,5 mg/l (99,8 / 134,5 mg/l)
C _{8h}	70,4 mg/l (67,8 / 80,7 mg/l)	128,5 mg/l (79,9 / 143,6 mg/l)
C _{12h}	71,5 mg/l (54,8 / 89,5 mg/l)	102,9 mg/l (82,2 / 113,9mg/l)
AUC _{12h}	848 mg*h/l (711 / 1129 mg*h/l)	1466 mg*h/l (954 / 1628 mg*h/l)
t _{max} (h)	2,5 h (1,0 / 4,0 h)	4,0 h (2,0 / 5,0h)
t _{min} (h)	6,0 h (5,5 / 6,0 h)	1,0 h (0,3 / 5,0h)
c _{max} mg/l	92,4 mg/l (85,6 / 97,7 mg/l)	135,6 mg/l (104,9 / 151,1 mg/l)
c _{min} mg/l	55,7 mg/l (49,9 / 74,2 mg/l)	112,5 mg/l (65,6 / 121,9 mg/l)

Die AUC_{12h} von MPAG war nach EC-MPS höher als nach MMF (1370 µg*h/ml für EC-MPS vs. 896 µg*h/ml für MMF). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Pharmaka detektiert.

3.2.3 IMPDH-Aktivität im untersuchten Patientenkollektiv

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurde extern auch eine Bestimmung der Aktivität des Enzyms IMPDH vorgenommen, wobei die Menge an produziertem 5'-Xanthosinmonophosphat (XMP) chromatographisch ermittelt wurde. Abbildung 13 zeigt die Aktivität des Mycophenolsäure-Zielenzym im zeitlichen Verlauf.

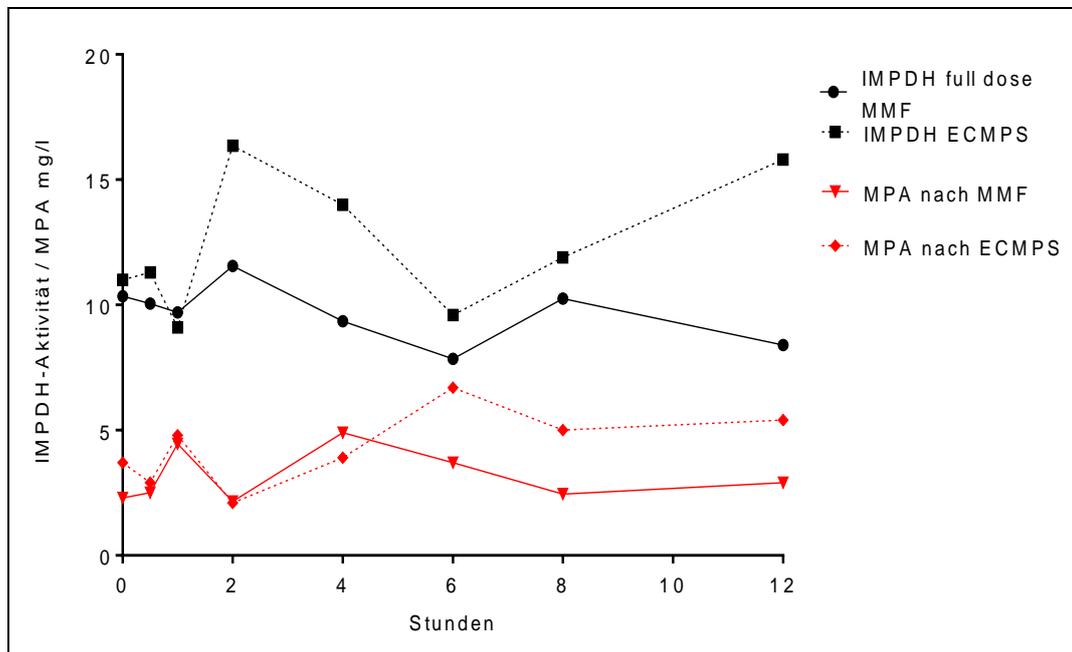


Abb. 13: Aktivitäts-Zeitprofil der IMPDH nach MPA-Einnahme. IMPDH:

Inosinmonophosphatdehydrogenase, MPA: Mycophenolsäure, EC-MPS: enteric coated-Mycophenolsäure, MMF: Mycophenolatmofetil.

Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Einnahmephasen ermittelt werden (Aktivität nach MMF-Einnahme 10,3 nmol/(mg Protein*h), nach EC-MPS 12,7 nmol/(mg Protein*h) (Median, 95%-KI 8-11,5 nmol/(mg Protein*h) vs. 10,0 – 14,7 nmol/(mg Protein*h)).

Der Zeitpunkt der minimalen Aktivität der IMPDH beim jeweiligen Patienten wurde im Median 6 Stunden (1. Quartil 4h, 3. Quartil 6h) nach MMF-Einnahme und ebenfalls 6 Stunden nach EC-MPS-Einnahme gemessen (25%-Quartil 1h, 75%-Quartil 6h).

T_{max} fand sich zwei Stunden nach MMF-Einnahme (Median, 25%-Quartil 1h, 75%-Quartil 4h) und ebenso zwei Stunden nach EC-MPS-Einnahme (25%-Quartil 2h, 75%-Quartil 6h). Es konnten zwischen den beiden Studienphasen auch für t_{max} und t_{min} keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

3.3 Proliferation von Patientenlymphozyten

Die T-Lymphozytenproliferation im zeitlichen Verlauf nach Einnahme des Immunsuppressivums ist beispielhaft für einen der sieben Patienten in Abbildung 14 dargestellt. In der Grafik ist die Proliferationsaktivität in % bezogen auf die Kontrolle ohne Immunsuppressivum aufgeführt.

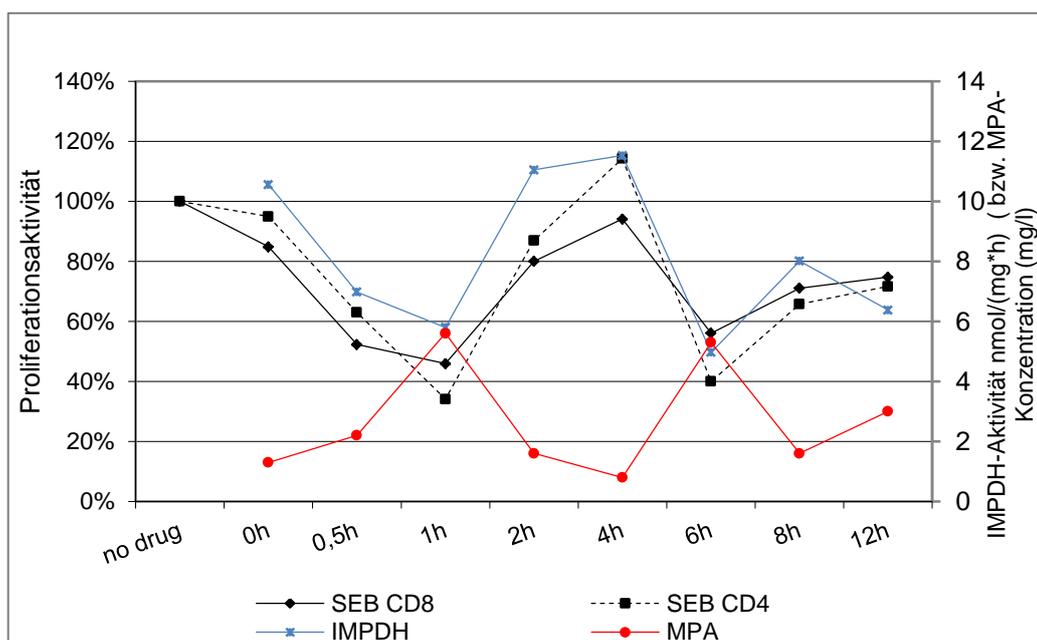


Abb. 14: Pat. 2, Phase 2, Einnahme von Mycophenolatmofetil, mit Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) stimulierte Zellen. IMPDH: Inosinmonophosphatdehydrogenase, MPA: Mycophenolsäure.

Es zeigte sich ein interindividuell und für die verschiedenen Antigene variabler Verlauf der Lymphozytenproliferation. Abb. 14 zeigt exemplarisch, dass eine hohe Proliferationsaktivität und IMPDH-Aktivität bei niedrigen Mycophenolsäurespiegeln auftrat. Die zwei MPA-Konzentrationsspitzen sind gut erkennbar.

Betrachtet man die Mediane aller Patienten, fiel nach Einnahme von MMF die Proliferation von SEB-stimulierten CD4⁺- und CD8⁺-Zellen nach zwei Stunden auf ein Minimum, es wurden hier noch 39% bzw. 59% der Ausgangsproliferation ohne Immunsuppressivum erreicht. Die Spannweite lag hier bei 24-138% für CD4⁺- und

33-155% für CD8⁺-Zellen, es bestanden große interindividuelle Unterschiede (CD4⁺: 1. Quartil 35%, 3. Quartil 44%, CD8⁺: 1. Quartil 51%, 3. Quartil 80%).

CMV-stimulierte CD8⁺Zellen unter MMF-Therapie zeigten ein Proliferationsminimum mit 66% (Median) schon nach einer halben Stunde (Bereich 24-137%, 1. Quartil 48%, 3. Quartil 89%). Nach vier Stunden wurden mit 69% ähnliche Werte beobachtet (1. Quartil 48%, 3. Quartil 136%). Die CMV-stimulierte Proliferationsaktivität von CD4⁺-Zellen war bereits zum Zeitpunkt t₀ am geringsten (Median 73%, 1. Quartil 64%, 3. Quartil 128%).

Während der EC-MPS-Therapie fiel die Lymphozytenproliferation von SEB-stimulierten CD8⁺-Zellen insbesondere nach 6 Stunden deutlich ab, es wurden noch 56% der Ausgangsproliferationsaktivität erreicht (Bereich 30-84%, 1. Quartil 54%, 3. Quartil 77%). Die CD4⁺-Zellen zeigten eine Reduktion der SEB-stimulierten Proliferation am deutlichsten 4 bzw. 6h nach morgendlicher Einnahme von EC-MPS (nach 4h: Median 50%, Bereich 2-186%, 1. Quartil 11%, 3. Quartil 82%, nach 6h Median 52%, Bereich 13-155%, 1. Quartil 33%, 3. Quartil 85%).

CMV-stimulierte CD4⁺-Zellen zeigten ein Minimum an Proliferation nach 4 h (Median 51%, Bereich 27-139%, 1. Quartil 39%, 3. Quartil 111%). CMV-reaktive CD8⁺-Zellen zeigten mit 64% der Ausgangsproliferation das Minimum nach 6 Stunden (auch hier große Range der individuellen Werte von 17-161%, 1. Quartil 42%, 3. Quartil 95%)

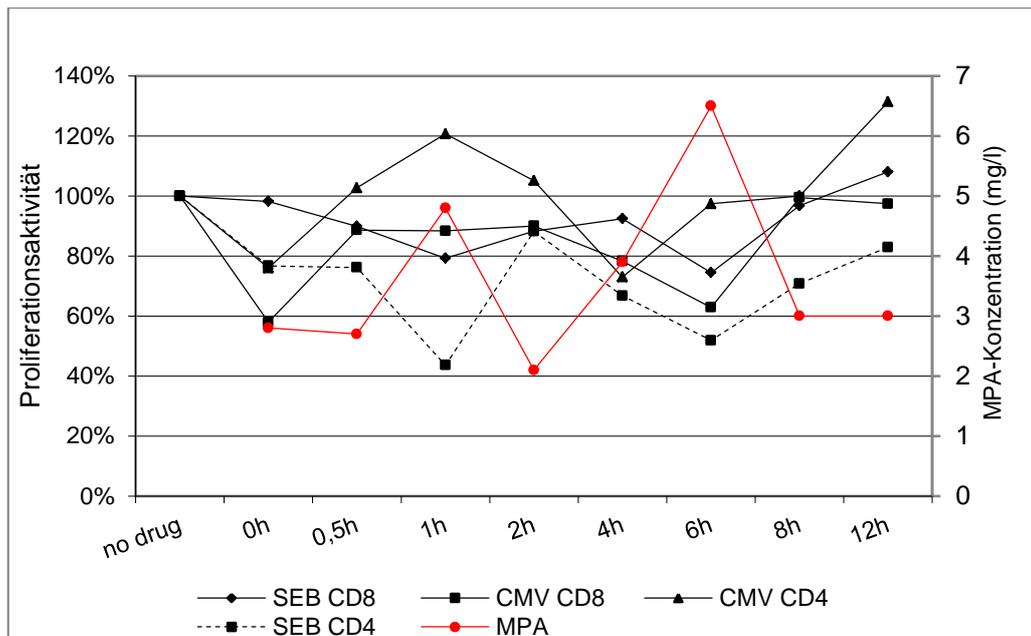


Abb. 15: Kinetik der mitogenstimulierten Proliferation von Lymphozyten (alle Patienten, beide Phasen). Dargestellt ist jeweils der Median der Proliferationsaktivität und der Mycophenolsäure (MPA)-Konzentration. SEB: Staphylokokkenenterotoxin B, CMV: Cytomegalievirusantigen.

Betrachtet man die Proliferation beider Phasen zusammengenommen (s. Abbildung 15), so fiel die Zellteilungsfähigkeit von SEB-stimulierten CD8⁺-Zellen insbesondere nach 1 und 6 Stunden deutlich ab, so dass nach einer Stunde im Median noch 79% der Proliferationsaktivität im Vergleich zur Proliferation ohne Medikation gemessen wurde (breiter Bereich 9-149%, 1. Quartil 66%, 3. Quartil 102%). Das Minimum wurde nach 6 Stunden mit einem Median von 74% erreicht (Bereich 30-268%, 1. Quartil 56%, 3. Quartil 131%). Nach diesem Zeitpunkt stieg die Lymphozytenproliferation wieder an, nach 8 Stunden wurden mit einem Median von 97% wieder Ausgangswerte erreicht.

Für die Subpopulation der CD4⁺-Zellen findet sich ein Proliferationsminimum bereits zum Zeitpunkt 1h, hier beträgt die SEB-stimulierte Zellproliferation im Median nur 44% derer ohne Immunsuppressivum, die Range ist hier 19-136% und spiegelt die hohen interindividuellen Unterschiede wieder (1. Quartil 37%, 3. Quartil 96%). Ein weiteres Proliferationsminimum findet sich auch hier zum Zeitpunkt 6 Stunden mit 52% der Ausgangsaktivität. Danach kommt es ebenso zügig wieder zu einem Ansteigen der Proliferation, nach 12 h werden 96% erreicht.

3.4 Proliferation von Spenderlymphozyten nach Inkubation mit Patientensera

Hier wurden Spenderzellen mit Patientenserum verschiedener Untersuchungszeitpunkte inkubiert. Die weitere Analyse der Proliferationsaktivität erfolgte analog der Untersuchung der patienteneigenen Zellen. Die folgende Grafik zeigt ein Beispiel der insgesamt vierzehn Einzeluntersuchungen.

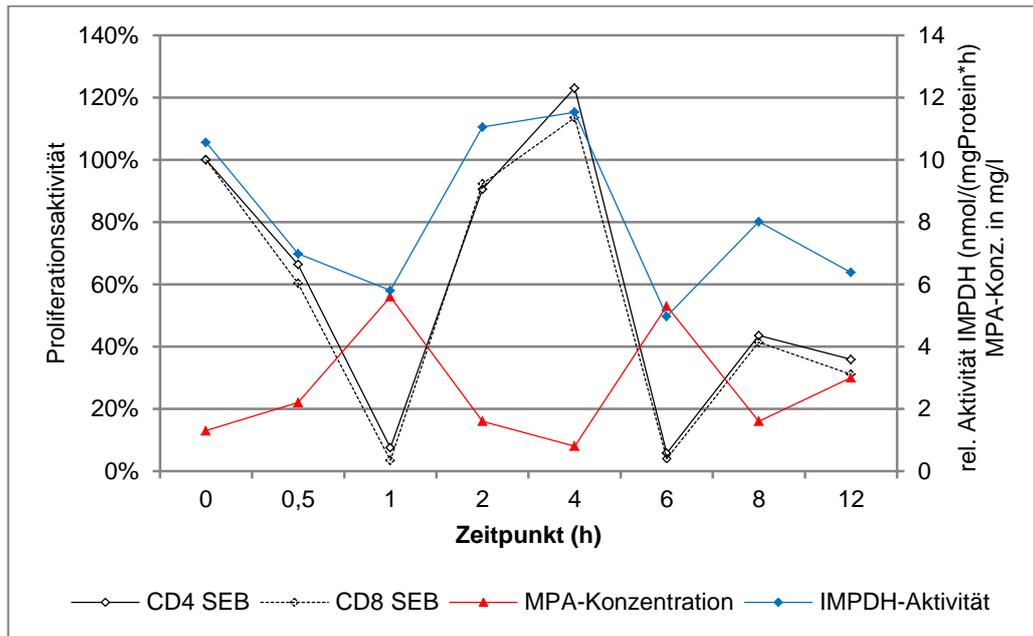


Abb. 16: Pat. 2, Phase 2, Mycophenolatmofetileinnahme, Proliferation von SEB-stimulierten Spenderlymphozyten. SEB: Staphylokokkenenterotoxin B, MPA: Mycophenolsäure, IMPDH: Inosinmonophosphatdehydrogenase.

Die Abbildung 17 auf der folgenden Seite zeigt den Median der Proliferationsaktivität für jedes Antigen sowie den Median der MPA-Konzentration.

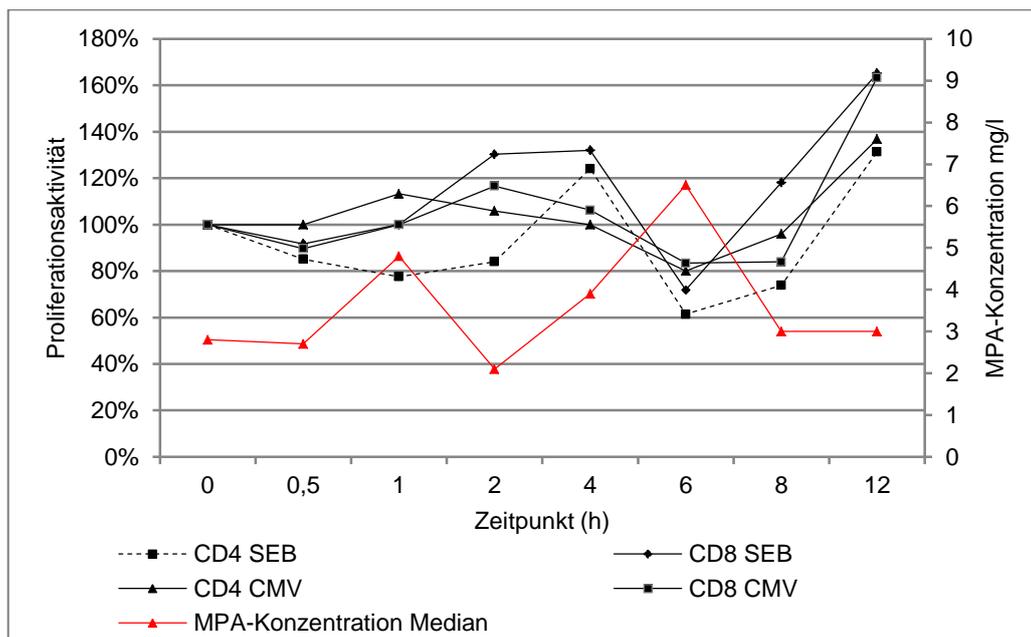


Abb. 17: Median der Proliferationsaktivität, Spenderlymphozyten mit Patientenserum. SEB: Staphylokokkenenterotoxin B, CMV: Cytomegalievirusantigen, MPA: Mycophenolsäure.

Es zeigt sich ein Minimum der Proliferationsaktivität nach 6 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Zellteilungsaktivität noch 61% (CD4⁺ SEB, 1./3.Quartil 19%/142%), 72% (CD8⁺ SEB, 1./3.Quartil 12%/161%), 80% (CD4⁺ CMV, 1./3. Quartil 50%/191%) bzw. 83% (CD8⁺ CMV, 1./3. Quartil 42%/119%).

Das Maximum wird nach 12 Stunden erreicht mit 131% (CD4⁺ SEB, 1./3. Quartil 60%/251%), 158% (CD8⁺ SEB, 1./3. Quartil 49%/388%), 137% (CD4⁺ CMV, 1./3. Quartil 68%/172%), 163% (CD8⁺ CMV, 1./3. Quartil 60%/238%). Erneut scheint ein inverses Verhältnis zwischen MPA-Konzentration und Proliferationsaktivität vorzuliegen.

3.5 Korrelation von Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Betrachtet man die Grafiken, die die MPA-Konzentration und funktionale Parameter wie die Lymphozytenproliferation und die IMPDH-Aktivität zeigen scheinen sich häufig hohe Proliferationsaktivitäten und IMPDH-Aktivitäten bei niedrigen MPA-Spiegeln zu finden und umgekehrt. Die statistische Testung dieser

Zusammenhänge erfolgte bei nicht normal verteilten Daten mit der Spearman'schen Rangkorrelationsanalyse.

3.5.1 Korrelation von MPA-Konzentration und AUC_{12h}

Keine signifikante Korrelation wurde zwischen den Konzentrationen c_0 und c_{max} oder c_{12h} und der AUC_{12h} bei MMF-Einnahme sowie bei EC-MPS-Gabe ermittelt. Dagegen bestand ein signifikanter hoher Korrelationskoeffizient für AUC_{12h} und der MPA-Konzentration 2 Stunden nach EC-MPS-Einnahme ($r_s=0,82$, $p=0,03$) sowie der MPA-Konzentration 8 Stunden nach EC-MPS ($r_s=0,78$, $p=0,04$).

3.5.2 Korrelation von MPA und IMPDH-Aktivität und IMPDH-Aktivität und Zellproliferation

Für IMPDH-Enzymaktivität und Mycophenolsäurekonzentration ergab sich eine signifikante negative Korrelation ($r_s = -0,45$, $p < 0,0001$).

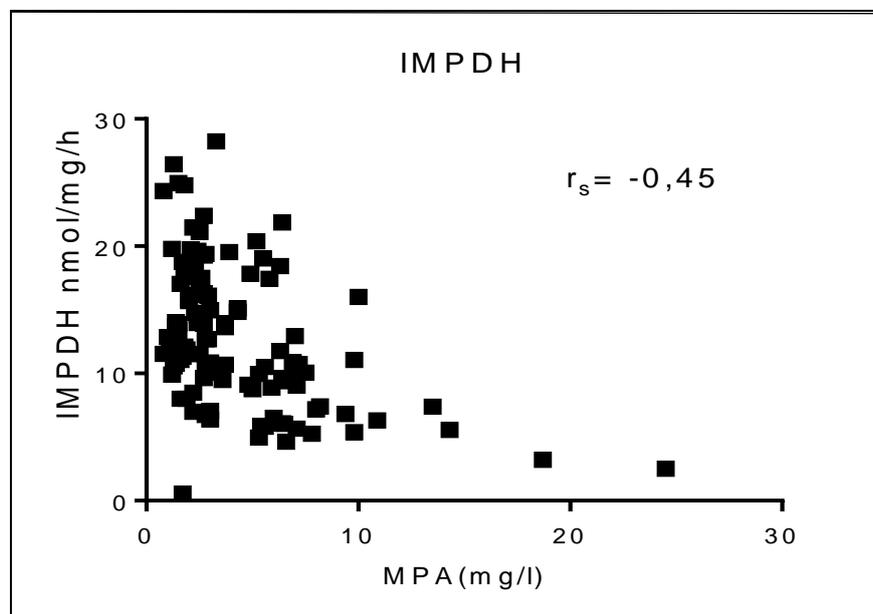


Abb. 18: Assoziation zwischen Aktivität der Inosinmonophosphatdehydrogenase IMPDH und der Mycophenolsäurekonzentration MPA

Deutlicher ausgeprägt war die Korrelation von IMPDH-Aktivität und Maximalkonzentration c_{max} von Mycophenolsäure ($r_s=-0,80$, $p=0,0008$).

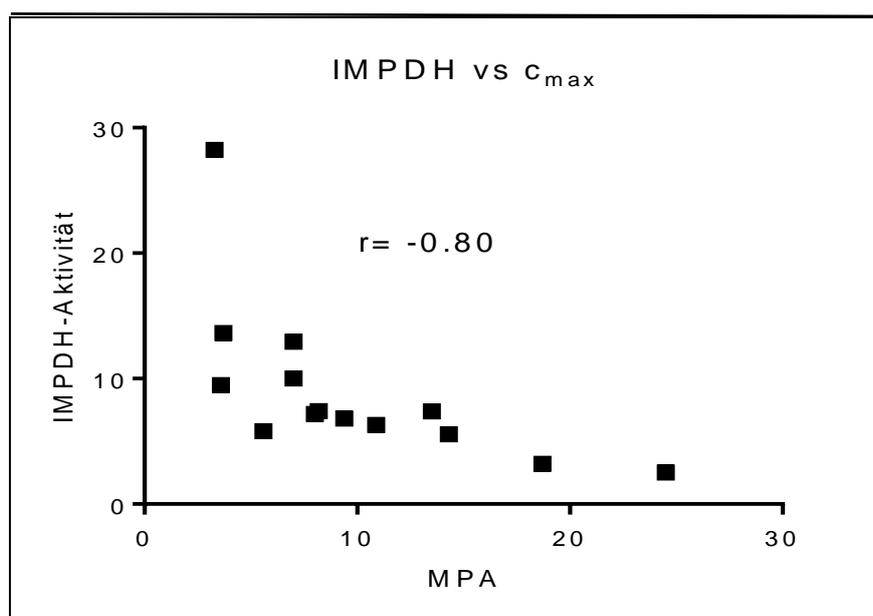


Abb. 19: Assoziation zwischen der Aktivität von IMPDH und der Maximalkonzentration c_{max} der Mycophenolsäure (MPA). IMPDH: Inosinmonophosphatdehydrogenase.

3.5.3 Assoziation von MPA-Konzentration, IMPDH-Aktivität und Proliferationsaktivität von Patientenlymphozyten

Hier wurde ebenfalls der Korrelationskoeffizient nach Spearman ermittelt. Eine signifikante negative Korrelation wurde ermittelt zwischen MPA-Konzentration und der spezifischen Aktivität von CD8-positiven CMV-reaktiven Zellen ($r=-0,33$, $p=0,0017^{**}$) sowie eine signifikante ($p=0,01$) negative ($r= - 0,25$) Korrelation zwischen MPA-Konzentration und der Proliferationsaktivität für CD8+-SEB-stimulierte Zellen der Patienten.

Für die übrigen untersuchten Zellpopulationen ergab sich zwischen der Mycophenolsäurekonzentration und dem Zellteilungsindex der untersuchten Patientenzellen keine signifikante Korrelation.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse von IMPDH-Aktivität und Proliferation von Patientenlymphozyten zeigt die Tabelle 5:

Tabelle 5: Assoziation zwischen der Inosinmonophosphatdehydrogenaseaktivität (IMPDH) und der Proliferation patienteneigener Zellen. SEB: Staphylokokkenenterotoxin B, CMV: Cytomegalievirusantigen.

vs. IMPDH-Aktivität	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s	Signifikanzniveau p
CD4 ⁺ SEB	0,28	p=0,005
CD8 ⁺ SEB	0,24	p=0,01
CD4 ⁺ CMV	0,16	n.s.
CD8 ⁺ CMV	0,38	p=0,003

Keine signifikante Korrelation wurde zwischen dem aus praktischen Gründen oft genutzten Talspiegel c_0 , der maximalen MPA-Konzentration sowie den Konzentrationen zwei und 12 Stunden nach Einnahme und der Zellproliferation gefunden.

3.5.4 Korrelation von MPA-Konzentration, IMPDH-Aktivität und Proliferationsaktivität von Spenderlymphozyten

Die Untersuchung zur Assoziation von Mycophenolsäurekonzentration und Zellteilungsindex ergab jeweils eine negative Korrelation, welche für SEB-stimulierte Zellen ausgeprägter war als für CMV-reaktive Lymphozyten (p jeweils <0,0001, ****). Die jeweiligen Korrelationskoeffizienten für die verschiedenen analysierten Zellsubtypen finden sich in der Grafik 20. In Tabelle 6 sind die Korrelationskoeffizienten für den Zusammenhang zwischen IMPDH-Aktivität und Spenderlymphozytenproliferation aufgeführt.

Tabelle 6: Korrelation von Inosinmonophosphatdehydrogenase- (IMPDH-) Enzymaktivität und Proliferation von Spenderlymphozyten. SEB: Staphylokokkenenterotoxin B, CMV: Cytomegalievirusantigen.

vs. IMPDH-Aktivität	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient r_s	Signifikanzniveau p
CD4 ⁺ SEB	0,31	p=0,0007
CD8 ⁺ SEB	0,32	p=0,0005
CD4 ⁺ CMV	0,40	p<0,0001
CD8 ⁺ CMV	0,38	p<0,0001

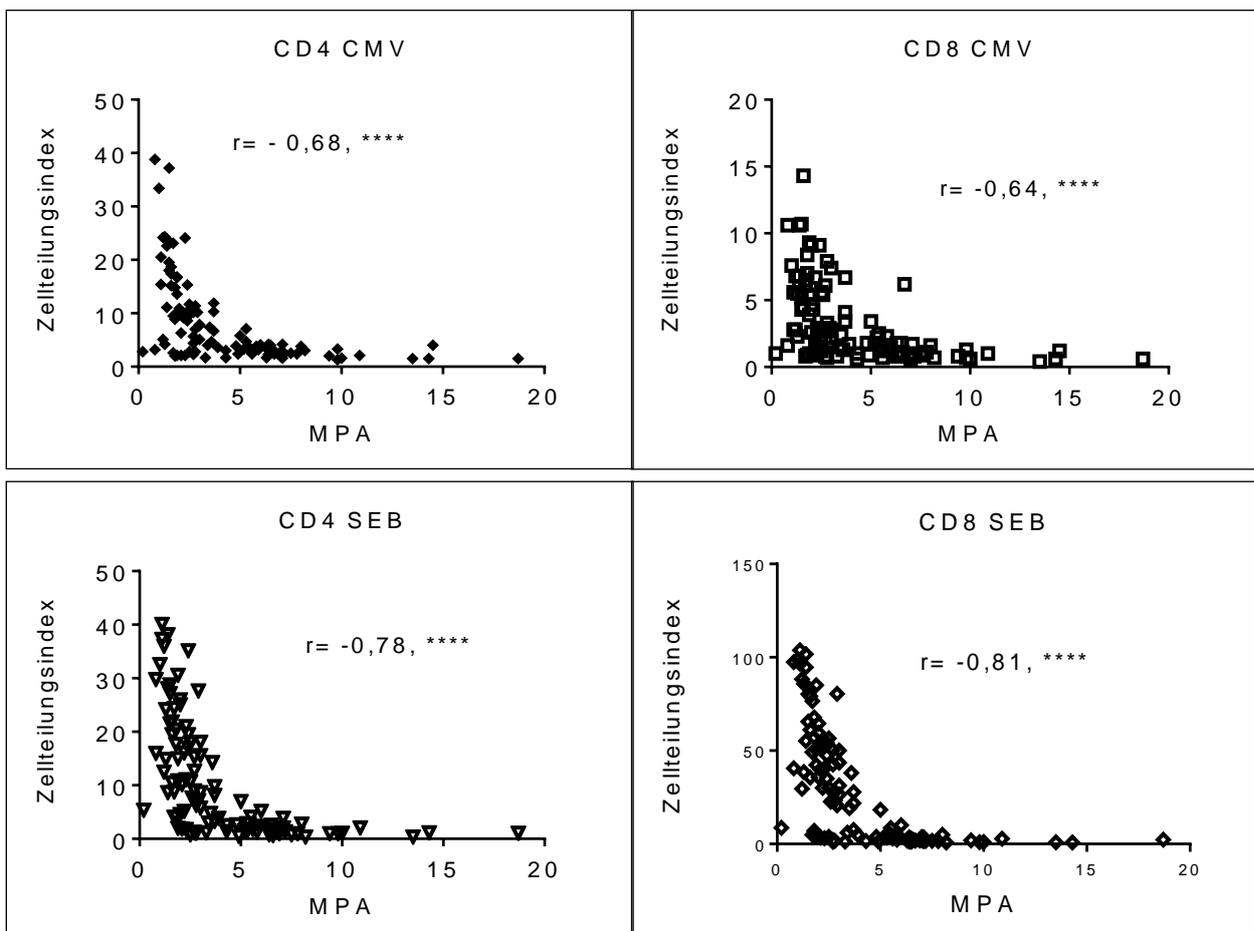


Abb. 20: Assoziation zwischen Proliferation von Spenderlymphozyten und der Mycophenolsäurekonzentration im Patientenplasma. MPA: Mycophenolsäure, CMV: Cytomegalievirus, SEB: Staphylokokkenenterotoxin B. p<0,0001, symbolisiert durch ****.

4.5.5 Assoziation von MPAG-Plasmakonzentration mit MPA-Konzentration und IMPDH-Aktivität sowie T-Zellproliferation

Die Konzentrationen von Mycophenolsäure und dem inaktiven MPA-Glucuronid zeigten einen schwachen Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient r_s betrug 0,23, $p=0,012$.

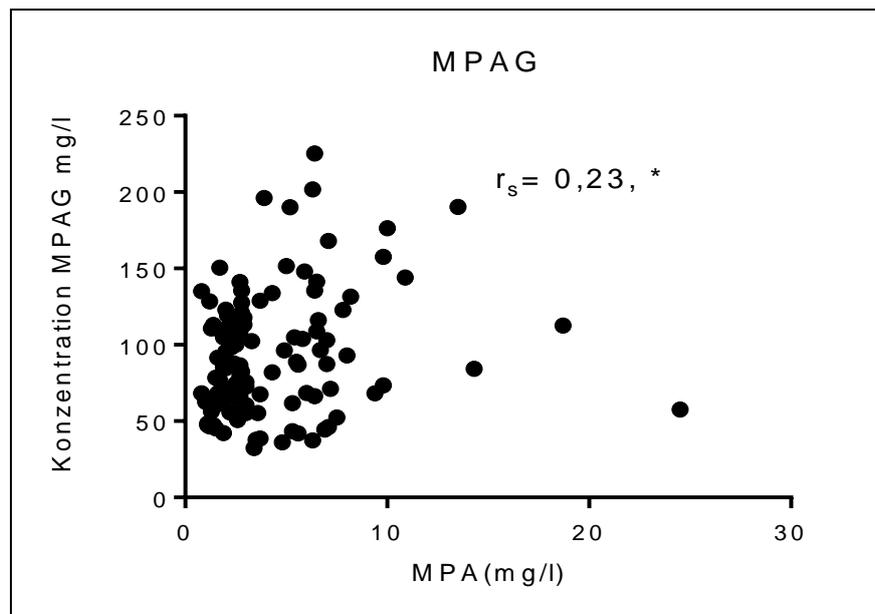


Abb. 21: Korrelation zwischen der Konzentration von Mycophenolsäureglucuronid (MPAG) und Mycophenolsäure (MPA). $p < 0,05$ (*).

Zwischen dem Metaboliten MPAG und der IMPDH-Aktivität fand sich ein negativer Korrelationskoeffizient von $r_s = -0,23$, $p < 0,01$ (keine Grafik abgebildet). Mit der T-Zellproliferation war die MPAG-Konzentration nicht signifikant korreliert.

3.6 Bestimmung der IC_{50}

Die IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) für IMPDH-Aktivität und Proliferationsaktivität wurde mittels nichtlinearer Regressionsanalyse untersucht (Tabelle 7). Die IC_{50} für die Enzymaktivität war dabei signifikant höher als die der Lymphozytenproliferation ($p=0,0069$ vs. SEB-stimulierte $CD4^+$ -Zellen, $p=0,0048$ vs. SEB-stimulierte $CD8^+$ -Zellen, $p=0,0105$ vs. CMV-reaktive $CD4^+$ -Zellen und $p=0,0041$ vs. CMV-reaktive $CD8^+$ -Zellen, Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 7: Mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Mycophenolsäure (MPA) für die Zellproliferation und die IMPDH-Enzymaktivität.

IMPDH: Inosinmonophosphatdehydrogenase, SEB: Staphylokokkenenterotoxin B, CMV: Cytomegalievirusantigen.

	IC_{50} MPA (mg/l) Median (Bereich)
Proliferation nach Stimulation mit SEB	
CD4+ -Zellen	2.4 (1.6 – 6.7)
CD8+ -Zellen	2.2 (1.6 – 2.8)
Proliferation nach Stimulation mit CMV-Antigen	
CD4+ -Zellen	2.2 (0.9 – 4.8)
CD8+ -Zellen	1.6 (0.5 – 5.4)
IMPDH-Aktivität	7.3 (3.0 - 11.0)

4. Diskussion

Die Mycophenolsäure entsteht im Körper als aktiver Metabolit von MMF und EC-MPS. Ihre Wirkung entfaltet die Mycophenolsäure über eine reversible IMPDH-Hemmung, woraufhin die Guanosinnukleotidbiosynthese in B- und T-Lymphozyten beeinträchtigt wird und die Proliferation dieser Zellen inhibiert wird.

Bekannt ist eine um etwa den Faktor 10 variable Pharmakokinetik nach Nierentransplantation [102; 100] sowie nach Leber- und Herztransplantation [100]. Auch Veröffentlichungen von Wollenberg et al. (1998), Sanquer et al. (1998) und Aw et al. (2003) berichten von einer hohen inter- und intraindividuellen Variabilität in der Pharmakokinetik des Wirkstoffes. Zudem sind Veränderungen der Pharmakokinetik bei längerem Einsatz beobachtet worden [109]. Eine Komedikation mit anderen Immunsuppressiva wie Calcineurininhibitoren, aber auch Protonenpumpenhemmern oder Steroiden nimmt ebenso Einfluss auf das pharmakologische Verhalten der Mycophenolsäure wie eine Hypalbuminämie, da MPA eine hohe Eiweißbindung aufweist [77]. Eine eingeschränkte renale Funktion führt zu einer Verdrängung von MPA aus der Plasmabindung durch erhöhte Konzentrationen von MPAG, welches bei Niereninsuffizienz kumuliert [Kuypers et al. 2010].

Bei Transplantierten wurde gezeigt, dass ein therapeutisches Drug Monitoring der MPA-Therapie den Outcome verbessern kann [76], und erste Untersuchungen zum TDM bei Monotherapie wurden bereits veröffentlicht [77; 84].

Ein routinemäßiges TDM ist jedoch bisher für die Mycophenolsäure nicht etabliert. Die meisten Untersuchungen zur Pharmakodynamik der Mycophenolsäure wurden in der Vergangenheit bei Transplantierten bzw. mit den bei Transplantationen verwendeten Dosen von MMF durchgeführt. Zur Therapie mit EC-MPS und zum Einsatz als Monotherapie, bei anderen Krankheitsentitäten und in geringerer Dosis gibt es nur eine beschränkte Anzahl von Studien.

Wie Yatscoff et al. (1998) und Dambrin et al. (2000) betonen, stellt die MPA-Konzentration im Blut nur einen mäßig prädiktiven Surrogatmarker der tatsächlichen Immunsuppression dar. Dies gilt insbesondere für Kombinationstherapien mit verschiedenen Immunsuppressiva. Da T-Lymphozyten

bei der Regulation von Immunantworten eine zentrale Rolle spielen, kann die Untersuchung der T-Zellfunktion in Anwesenheit von Immunsuppressiva wichtige Informationen über die Effektivität der Therapie bieten.

Der in der klinischen Routine relativ einfach zu messende Talspiegel bildet wegen der pharmakokinetischen Eigenheiten der Mycophenolsäure mit einer kurzen Eliminationshalbwertszeit (unter zwei Stunden) und einer langen Rezirkulationshalbwertszeit (etwa 15 Stunden) den tatsächlichen Effekt häufig nicht genau genug ab (Johnson et al. 1999). Betrachtet man die Korrelation der Predosekonzentration von MPA, der C_{\min} oder der C_{12h} mit Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen, ist die Studienlage nicht einheitlich. Studien, die keine belastbare Korrelation zeigten, überwiegen [54; 72; 35].

4.1 Unterschiedliche Pharmakokinetik nach EC-MPS und MMF

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mycophenolsäurekonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten nach morgendlicher Einnahme im Steady State bestimmt. In der Literatur sind für die MPA-Konzentration nach Einnahme von bei Transplantationen üblichen Dosen (meist 1000 mg b.i.d.) typische Konzentrations-Zeit-Profile mit einer initialen Maximalkonzentration nach ein bis zwei Stunden und einem zweiten Maximum nach sechs bis acht Stunden beschrieben. Das zweite Maximum ist durch den enterohepatischen Kreislauf bedingt, wobei im Dünndarm MPAG wieder deglucuronidiert und erneut wirksam wird (Staatz et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit waren die Konzentrations-Zeit-Profile variabel. Es zeigte sich ein komplexer zweigipfliger Kurvenverlauf mit einer langsamem Resorption und einem deutlichen zweiten Konzentrationsmaximum. Eine geringer ausgeprägte initiale Konzentrationsspitze nach ein bis zwei Stunden wurde bereits bei Patienten mit Niereninsuffizienz beschrieben [62; 102].

J. Klupp berichtet in seiner Habilitationsschrift von 2002 von Untersuchungen an transplantierten Lewisratten, bei denen erst nach Gabe höherer oraler Dosen von MMF (20 mg/kg) der typische frühe und steile Konzentrationsanstieg auftrat, während der Peak bei geringeren Dosen ausblieb.

Die im Vergleich zur „Transplantationsdosis“ niedrige Dosis in der vorliegenden Untersuchung sowie die bereits deutlich eingeschränkte Nierenfunktion der Patienten mit einer GFR um 30 ml/min könnte ein möglicher Grund für die beobachtete Veränderung der Kinetik sein.

Da EC-MPS im sauren Milieu des Magens nicht löslich ist und erst im alkalischen Dünndarmmilieu aufgenommen wird, tritt verschiedenen Untersuchungen zu Folge die maximale Konzentration t_{max} später auf als bei MMF, was die Daten dieser Studie bestätigten: Der Median der t_{max} lag bei 2,5 h für MMF und bei 4 h für EC-MPS. Damit wurden die Maximalkonzentrationen später erreicht als in der Literatur beschrieben: Einer Untersuchung von Budde et al. zu Folge (2004) wurde eine t_{max} von 30 min nach MMF und von 90 min nach EC-MPS bei Nierentransplantierten mit begleitender Tacrolimustherapie gemessen. Eine weitere Arbeit berichtet von einer t_{max} nach 720 mg EC-MPS von im Mittel 2,4 h mit einer großen Spannweite von 1,0-5,0 Stunden [Perry et al. 2007], während der Spitzenspiegel in der Untersuchung von Staatz et al. bei Transplantierten 1-2 h nach oraler MMF-Einnahme auftrat [102].

Die nach EC-MPS-Einnahme gemessenen MPA-Konzentrationen waren insgesamt mit einem Median von 4,5 mg/l signifikant höher als die nach MMF mit 2,7 mg/l ($p < 0,0001$).

Auch die c_{max} war nach EC-MPS mit 13,5 mg/l signifikant höher (vs. 6,8 mg/l nach MMF, $p = 0,04$). Dies entspricht Ergebnissen von Teixeira et al. (2001) und Perry et al. (2007), die nach äquimolaren Dosen von MMF und EC-MPS eine höhere c_{max} für EC-MPS feststellten. Die c_{min} unterschied sich laut diesen Autoren zwischen den beiden Präparaten nicht, was hier bestätigt werden konnte.

Die c_0 waren in der vorliegenden Arbeit für MMF etwas niedriger (Median 2,3 mg/l) als für die äquimolare Dosis von EC-MPS (3,7 mg/l), ohne dass ein signifikanter Unterschied bestand. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Budde et al. (2007), in denen eine signifikant höhere Talkonzentration in der EC-MPS-Therapie beobachtet wurde.

Auffallend war, dass trotz niedrigerer Dosen die in der Transplantationsmedizin empfohlenen Talspiegel im therapeutischen Bereich von 1,0-3,5 mg/l MPA bei der

MMF-Therapie erreicht wurden. Auch hier könnte ein möglicher Faktor die bereits deutlich eingeschränkte Nierenfunktion der Probanden sein.

Für die IgA-Nephritis existieren keine validierten Empfehlungen zum Talspiegel.

Für die Lupusnephritis wurde eine Prädosiskonzentration für MPA von 3,5-4,5 mg/l vorgeschlagen [Neumann et al. 2003, Jones et al. 2009].

In der vorliegenden Studie war die Spannweite für die c_{\max} , die t_{\max} und den zweiten Peak bei beiden Medikamenten groß. Auf die hohe interindividuelle Variabilität bei den MPA-Konzentrationen wird von zahlreichen Autoren hingewiesen. Die Messung von Einzelspiegeln erscheint somit zur Beurteilung der gesamten MPA-Exposition insbesondere nach EC-MPS-Administration problematisch.

Untersuchungen zur Wertigkeit der AUC (hier liegen mehrere größere Multicenterstudien vor) zeigten bei Nierentransplantierten einen Zusammenhang zwischen der Höhe der AUC_{12h} und bioptisch gesicherten Abstoßungsreaktionen [54; 56; 79; 108]. In einer Arbeit zur Lupusnephritis wurde eine signifikante positive Korrelation von MPA-AUC und Therapieansprechen ermittelt [77].

Bisher konnte kein sicherer Zusammenhang zwischen AUC oder Talspiegel von MPA und unerwünschten Arzneimittelwirkungen nachgewiesen werden.

Eine 12h-AUC gilt momentan als Goldstandard in der Evaluation der MPA-Therapie. Da die AUC-Bestimmung jedoch sehr aufwändig ist, wurden aus Praktikabilitätsgründen inzwischen verkürzte AUC-Protokolle vorgeschlagen.

Beim hier untersuchten Patientengut war der Median der AUC für EC-MPS höher, ohne dass statistische Signifikanz vorlag. Dieses Ergebnis wird ebenfalls durch die Studien von Teixeira und Perry sowie durch eine Arbeit von Budde et al. von 2007 gestützt, die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede detektierten [89; 105; 24].

Staatz et al. berichten von einer bis um das Zehnfache interindividuell variierenden AUC, während in dieser Arbeit eine Variabilität von bis zu dem 4,5fachen für die AUC von EC-MPS und dem 3fachen bei MMF beobachtet wurde [102]. Anders als in einer Arbeit von de Winter et al. bei Nierentransplantierten, die zweimal 1000 mg MMF erhielten [36] konnte in der vorliegenden Arbeit mit niedrigeren Dosen keine signifikante Korrelation zwischen der Prädosiskonzentration und der AUC_{12h}

gefunden werden, und zwar weder für EC-MPS noch für MMF. Allerdings war die Korrelation in der beschriebenen Arbeit nur schwach.

Auch der Maximalspiegel von MPA korrelierte in der vorliegenden Untersuchung nicht mit der AUC_{12h} . Eine signifikante Korrelation wurde hier zwischen c2h und c8h nach EC-MPS-Einnahme und der AUC gesehen.

Im Gegensatz zum Transplantationssetting existieren für den Einsatz bei Autoimmunerkrankungen bis dato keine gesicherten Empfehlungen zur Höhe der AUC_{12h} . Nach MMF-Einnahme berichten Lertdumrongluk et al. bei asiatischen Patienten mit schwerer Lupusnephritis von einer signifikanten Korrelation zwischen MPA-Plasmakonzentration und AUC. Ein verbessertes Therapieansprechen bei aktiver Lupusnephritis lag zudem bei einer AUC von >45 mg h/l vor [77].

In dieser Arbeit bei IgA-Nephritis wurde eine AUC über 45 mg h/l bei sechs von sieben mit EC- MPS therapierten Patienten und bei einem von vier mit voller Dosis von MMF behandelten Patienten ermittelt. Bei Transplantierten wird eine AUC_{12h} von 30-60 mg*h/l angestrebt, um das Risiko einer akuten Abstoßung zu minimieren und gleichzeitig die Toxizität gering zu halten [102]. Für Patienten nach Nierentransplantation unter Kombinationstherapie mit CsA und MMF wurde in prospektiven Studien gezeigt, dass das Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion durch eine MPA-Exposition von mindestens 30-40 mg x h/l (AUC_{12h}) verringert werden kann [76]. Dieser auf die IgA-Nephritis nur bedingt übertragbare Zielbereich wurde von sechs von sieben Patienten in der EC-MPS-Phase und drei von vier Patienten in der MMF-Phase erreicht, obwohl die Einzeldosen im Transplantationssetting meist deutlich höher sind. Jedoch wird bei Transplantationen mit Kombinationen verschiedener Immunsuppressiva behandelt. Es ist beispielsweise bekannt, dass eine gleichzeitige Einnahme von Cyclosporin A in den enterohepatischen Kreislauf der Mycophenolsäure eingreift und daher eine bis um 30% erniedrigte MPA-Gesamtexposition bewirken kann [102].

Die t_{max} des Metaboliten MPAG entsprach für beide Phasen der t_{max} der MPA-Konzentration. Auch die MPAG-Konzentration war über alle Zeitpunkte während der Einnahme von EC-MPS signifikant höher.

4.2 Beeinflussung der IMPDH-Aktivität

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung der IMPDH-Aktivität nach EC-MPS und nach MMF wurde nicht gefunden. Ein erstes Konzentrationsminimum fand sich nach einer Stunde, die maximale Inhibition der IMPDH-Aktivität trat bei EC-MPS- und MMF-Therapie nach 6 Stunden (Median) auf. Die maximale Aktivitätshemmung der IMPDH trat zum selben Zeitpunkt auf wie der Median der Maximalkonzentration von MPA, wobei die Werte der verschiedenen Patienten stark streuten: in der EC-MPS-Gruppe betrug die Spannweite 1-12 Stunden. Verschiedene Autoren berichten von einem früheren Nadir nach ein bis zwei Stunden, so fanden Glander et al. bei Nierentransplantierten eine maximale Inhibition kurz nach der morgendlichen Medikamenteneinnahme [50]. Eine große interindividuelle Variabilität der IMPDH-Aktivität ist in der Literatur bereits beschrieben [29; 110].

4.3 Veränderung der Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten

Um die Lymphozytenproliferation unter Einwirkung von Immunsuppressiva zu untersuchen, wurde die Proliferationsaktivität von T-Zellen gesunder Menschen unter Einfluss von in vitro zugegebener Mycophenolsäure und Cyclosporin A bestimmt. Cyclosporin A wurde als Prototyp eines T-Zell-wirksamen Medikamentes gewählt.

Im Rahmen dieser in vitro-Tests wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der mit fluoreszenzbasierter Messung mit CFSE bestimmten Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen demonstriert, wobei der CFSE-Assay in der vorliegenden Promotionsarbeit für diese Untersuchung etabliert wurde. Dabei wurde die Proliferation durch die CsA-Konzentrationen 100 ng/ml und 1000 ng/ml bei allen vier Spendern dosisabhängig unterdrückt. Nach Nierentransplantation liegen die empfohlenen Talspiegel in der Erhaltungsphase bei 100-350 ng/ml [87]. Auch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen werden Talspiegel um 100 ng/ml angestrebt. In diesem Konzentrationsbereich wurde in der vorliegenden Arbeit eine mediane Hemmung der SEB-stimulierten Proliferation von 28% bei CD4⁺-

Zellen und 10% bei CD8⁺-Zellen beobachtet. Im Bereich der angestrebten Spitzenspiegel (empfohlen werden 700-1400 ng/ml, Oellerich et al. 1995), hier also bei 1000 ng/ml sank die Proliferation im Median um 58% (CD4⁺-Zellen) bzw. 25% (CD8⁺-Zellen). CsA wirkt als ein Hemmer der IL2-Synthese, wobei bei vermindertem IL-2 vorwiegend CD4⁺-Zellen nicht aktiviert werden bzw. aktivierte Zellen nicht proliferieren.

Die im klinischen Einsatz subtherapeutische Konzentration von 10 ng CsA/ml Testansatz blieb für beide T-Zellsubsets ohne relevanten inhibierenden Effekt.

Bei einer oralen Therapie mit MMF liegt die angestrebte Talkonzentration je nach Indikation und Kotherapie um die 1,5-3 mg/l [100]. Spitzenspiegel bewegen sich um 10-40 mg/l. Nach Applikation von Mycophenolsäure in vitro fand sich bei der subtherapeutischen Konzentration von 0,5 mg/l bereits eine nahezu vollständige Proliferationshemmung sowohl für CD4⁺- als auch für CD8⁺-Lymphozyten.

In der Untersuchung von patienteneigenen Lymphozyten unter oraler immunsuppressiver Therapie waren erneut deutliche Unterschiede zwischen den Patienten zu verzeichnen. Proliferationsminima fanden sich nach ein und vier bis sechs Stunden, wobei die EC-MPS-Gruppe ein späteres Proliferationsminimum aufwies.

Die Proliferationsmessung von mit Patientenserum inkubierten Spenderzellen wies keine signifikanten Unterschiede zwischen EC-MPS- und MMF-Phase auf. Die maximale Inhibition der Lymphozytenproliferation fand sich erneut nach sechs Stunden.

Die Korrelation zwischen Proliferationsaktivität und pharmakokinetischen Parametern wird in Abschnitt 4.5 besprochen.

4.4 Vergleich der IC₅₀

Die IC₅₀ betrug in vitro 0,14 mg/l für die SEB-stimulierten Lymphozyten beider Subsets, während die IC₅₀ der CMV-reaktiven Lymphozyten mit 0,089 mg/l bzw. 0,047 mg/l für CD4⁺ bzw. CD8⁺-Zellen niedriger war. Gummert et al. ermittelten

eine IC_{50} von 0,18 mg/l für die Proliferation von 3H -markierten Rattenlymphozyten *in vitro* [52].

Dagegen wurde die T-Zell-Proliferation von *ex vivo* untersuchten Lymphozyten erst bei höheren MPA-Konzentrationen inhibiert, die IC_{50} betrug zwischen 1,6 und 2,4 mg/l. Dass die IC_{50} nach *in vitro*-Zugabe deutlich geringer ist als im Rahmen der *ex vivo*-Untersuchung, kann zum Teil dadurch erklärt werden, dass der freie Anteil von MPA der pharmakologische wirksame ist und Mycophenolsäure im Plasma zu ca. 97% an Albumin gebunden ist [37]. Für die Hemmung der IMPDH-Aktivität in der *ex vivo*-Untersuchung lag die IC_{50} mit 7,3 mg/l (Median) signifikant höher als für die T-Zellproliferation. Die IC_{50} der T-Zellproliferation lag im Bereich empfohlener Talspiegel, während eine 50%ige Hemmung der IMPDH-Aktivität durch Talspiegel nicht erzielt werden konnte.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass möglicherweise die Lymphozytenproliferation schon bei geringer Reduktion der IMPDH-Aktivität inhibiert wird oder gar eine IMPDH-unabhängige Proliferationshemmung eine Rolle spielt. Diese Hypothese bedarf allerdings der genaueren Prüfung an einem größeren Probandenkollektiv.

Die Tatsache, dass die IC_{50} der IMPDH-Aktivität höher war, steht im Widerspruch zu Daten von Kamar et al. (2009), die für die IC_{50} von im Vollblutassay gemessener T-Zellproliferation und IMPDH-Aktivität keine signifikanten Unterschiede ermittelten (IC_{50} 1,55 mg/l vs. 1,6 mg/l). Langman et al. fanden bereits 1996 eine IC_{50} der IMPDH-Aktivität bei Gesunden von 2,0 bis 5,0 mg/l, und Budde et al. bestimmten eine IC_{50} von 3,5-4 mg/l bzw. 4,5-6 mg/l [23; 24]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch methodische Eigenheiten der Proliferations- und Enzymaktivitätsmessung bedingt sein, allerdings spielt möglicherweise auch die Tatsache eine Rolle, dass anders als in der vorliegenden Arbeit bei der Untersuchung von Kamar et al. kein Steady State herrschte, sondern die MMF-Therapie erst einen Tag zuvor begonnen worden war. Bremer et al. (2008) berichten von einer Induktion der IMPDH-Expression in Retikulozyten unter MPA-Therapie. Deren Relevanz für die Langzeittherapie mit MPA-Präparaten ist jedoch bisher nicht gesichert.

4.5 Assoziation von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Obwohl in der vorliegenden Arbeit signifikante negative Korrelationen zwischen IMPDH-Aktivität und Gesamtkonzentration von MPA sowie IMPDH und MPAG-Konzentration bestanden, handelte es sich jedoch nur um schwache Zusammenhänge. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen AUC und IMPDH ermittelt werden. Rother et al. (2012) berichten ebenfalls von einer inversen Korrelation von mittels HPLC bestimmter IMPDH-Aktivität und MPA-Konzentration bei nierentransplantierten Kindern, bei Erwachsenen beobachteten u.a. Staats et al. (2007), Albrecht et al. (2000) und Vethe et al. (2006) entsprechende Assoziationen. Zwischen der Vollblutaktivität von IMPDH und dem klinischen immunsuppressiven Effekt wurde bisher noch kein eindeutiger Zusammenhang festgestellt.

Zwischen dem inaktiven Metaboliten MPAG und der wirksamen Muttersubstanz MPA wurde in dieser Arbeit ein schwacher, signifikanter Zusammenhang ermittelt.

Wie erwartet ging eine niedrige IMPDH-Aktivität mit einer niedrigeren Proliferationsaktivität einher. Allerdings war bei CMV-reaktiven CD4⁺-Patientenzellen keine signifikante Korrelation zu verzeichnen. Bei hoher IMPDH-Aktivität ist eine große Variabilität der stimulationsabhängigen Proliferation bekannt. Höhere signifikante Korrelationskoeffizienten wurden für den Zusammenhang IMPDH-Aktivität und Spenderlymphozytenproliferation beobachtet, aber auch hier war die Korrelation nur mäßig.

Ein negativer Zusammenhang bestand zwischen c_{max} von MPA und IMPDH-Aktivität mit einem Rangkorrelationskoeffizienten von $r_s = -0,80$.

Die höchste Korrelation unter den pharmakodynamischen Markern zeigten SEB-reaktive CD4⁺- und CD8⁺-third party-Lymphozyten mit der MPA-Konzentration. Auch die Arbeitsgruppe von Gummert berichtet, dass die durchflusszytometrisch gemessene Lymphozytenproliferation durch MPA unterdrückt wurde und dieser Effekt mit den Plasmaspiegeln hoch negativ korreliert war [53].

Wiederholte Experimente haben die antiproliferative Wirkung von MPA auf T-Lymphozyten in vitro und in vivo im Tiermodell bestätigt. Wie auch für

herztransplantierte Ratten beschrieben (12; 53; 69], konnte in der vorliegenden Arbeit eine negative Korrelation zwischen MPA-Konzentration und T-Zellproliferation bei Patienten und bei Spenderlymphozyten beobachtet werden. In ebendiesen Untersuchungen am Rattenmodell lag zudem noch eine Assoziation zwischen histologischer Abstoßungsreaktion und T-Zellproliferation vor. Kamar et al. zeigten bei dialysepflichtigen Patienten kurz vor Erhalt eines Nierentransplantates eine negative Korrelation zwischen MPA-Spiegel und T-Zellproliferation im Vollblutassay sowie der T-Zell-Aktivierung (Marker dafür waren CD71 und CD25) [65].

Brunet et al. bestimmten 2006 die Proliferationsrate einer immortalisierten T-Lymphoblastoiden-Zelllinie nach Inkubation mit MPA aus Serum lebertransplantiertes Patienten. Die Prädosiskonzentration c_0 korrelierte signifikant negativ ($r -0,766$) mit der Zellproliferation. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Das unterstreicht die Tatsache, dass die Prädosisspiegel keinen idealen Marker zum Monitoring der mycophenolsäurehaltigen Therapie darstellen.

4.6 Schlussfolgerung

Die Messung der Lymphozytenproliferation ist anders als die Bestimmung der IMPDH-Aktivität oder die Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen dazu geeignet, die Funktion der Zielzellen von MMF zu untersuchen. Die Quantifizierung der proliferativen Antwort ist dabei ein vielversprechender Ansatz, um die Wirkung von Immunsuppressiva besser nachvollziehen oder vorhersagen zu können und Informationen über die Wirkungsweise zu erhalten. Insbesondere Patienten mit einer immunsuppressiven Kombinationstherapie, bei der verschiedene Medikamente auf die Effektorzellen einwirken, könnten von einem pharmakodynamischen Monitoring mit Lymphozytenfunktionstests profitieren. Die Mycophenolsäure wurde in der vorliegenden Arbeit für die in vitro- und ex vivo-Untersuchungen genutzt, der Einsatz des CFSE-Testsystems kann jedoch auf andere Immunsuppressiva ausgedehnt werden. In der vorliegenden Arbeit trat für alle Lymphozytensubsets eine deutliche Proliferationshemmung zum selben

Zeitpunkt auf wie die Maximalkonzentrationen von Mycophenolsäure. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Lymphozytenproliferation direkt und eindeutig mit der Höhe der MPA-Konzentration im Plasma zusammenhing: die Korrelation war höher als die der IMPDH-Aktivität mit der Medikamentenkonzentration. Insgesamt bestand eine deutliche interindividuelle Variabilität der proliferativen Antwort nach Medikamentenapplikation, sofern dies bei geringer Probandenzahl zu bestimmen war. Die Proliferationshemmung von SEB- und CMV-reaktiven Zellen durch Mycophenolsäure war vergleichbar, so dass in zukünftigen Untersuchungen ein Assay mit nur einem Antigen ausreichend wäre. Die Proliferation von SEB-stimulierten T-Lymphozyten zeigte die beste Korrelation mit den MPA-Konzentrationen und ist nicht vom serologischen Status des Probanden bezüglich CMV abhängig.

Sinnvoll wären weitere Untersuchungen, die prüfen, wie die Proliferationsaktivität mit einem klinischen Ansprechen auf eine MPA-Monotherapie sowie mit dem Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen assoziiert ist.

Eine Besonderheit der vorliegenden Arbeit ist die Tatsache, dass die eingeschlossenen Patienten eine deutliche Einschränkung der GFR mit 20-35 ml/min aufwiesen. Auch wurde die freie Fraktion von MPA nicht gemessen, die bei Niereninsuffizienz ansteigt und Studienergebnissen von Nowak und Shaw zu Folge mit der Proliferationsaktivität hoch korreliert war [85]. Ein erniedrigter Blut-pH z.B. im Rahmen einer metabolischen Azidose bei Niereninsuffizienz kann über die Erhöhung des Anteils an fMPA ebenso zu einer veränderten Pharmakokinetik führen, wie Kaplan et al. 1999 beobachteten. Dies und die Monotherapie mit einer geringeren Dosis von MMF bzw. EC-MPS könnte die Abweichungen zu pharmakokinetischen Studien der Vergangenheit erklären. Serumalbuminkonzentration und Hämoglobinwerte, die bei Patienten mit IgA-Nephritis durchaus verändert sein können und bekanntlich Einflüsse auf Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der MPA ausüben, wurden in dieser Untersuchung nicht bestimmt. Ein Einfluss der Komedikation ist nicht auszuschließen, wobei von der niedrig dosierten Steroidgabe wahrscheinlich kein größerer Störeffekt zu erwarten war: Eine Studie berichtet von einer Reduktion der MPA-Exposition nur bei hohen Dosen [26].

Die vorliegenden Ergebnisse entstanden im Rahmen einer Pilotstudie. Die geringe Probandenzahl schränkt die Aussagekraft der Untersuchung deutlich ein. Zudem wurde die intraindividuelle Variabilität der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter nicht untersucht, dies wäre aber eine Voraussetzung für die regelhafte Anwendung des verwendeten Testsystems.

5. Zusammenfassung

Die Proliferation von T-Lymphozyten ist ein zentraler Vorgang in der Pathogenese von Transplantatrejektionen und verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Um die T-Zellproliferation in dieser Situation unterdrücken zu können, werden diverse Immunsuppressiva, darunter auch Mycophenolatmofetil, eingesetzt. Zur Evaluation der Therapie bietet sich eine Ermittlung der Art und des Ausmaßes der T-Lymphozytenproliferation an. Dies gilt umso mehr, da die Mycophenolsäure (MPA) über eine komplexe und individuell variable Pharmakokinetik gekennzeichnet ist, wie auch die vorliegende Arbeit bestätigte. Neben in vitro-Testungen zur Proliferationsmodulation durch Mycophenolsäure und Cyclosporin A erfolgte eine Untersuchung der T-Lymphozytenproliferation bei insgesamt sieben Patienten mit IgA-Nephritis während einer Monotherapie mit Mycophenolatmofetil bzw. enteric coated- Mycophenolsäure. Außer der Konzentration von Mycophenolsäure und Mycophenolsäureglukuronid wurde bei diesen Patienten die Aktivität des Enzyms Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH) sowie die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten mit einem auf der CFSE-(5,6-Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester)-Methode basierenden nichtradioaktiven Assay ermittelt, um das individuelle immunologische Ansprechen auf die Therapie zu prüfen. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Der in der Arbeit etablierte durchflusszytometrische Lymphozytenproliferationstest nach Markierung mit CFSE bildete eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen durch Mycophenolsäure und Cyclosporin A ab. In vitro waren zur Proliferationshemmung deutlich niedrigere Konzentrationen nötig, was u.a. auf die hohe Eiweißbindung von Mycophenolsäure in vivo zurückgeführt werden kann.
- Die beiden Mycophenolsäureformulierungen Mycophenolatmofetil und Natriummycophenolat unterschieden sich bei äquimolaren Dosierungen im pharmakokinetischen Verhalten und können nicht ohne weiteres als bioäquivalent angesehen werden. Während der Einnahme von enteric

coated-Natriummycophenolat wurden signifikant höhere Mycophenolsäurekonzentrationen im Plasma erzielt.

- Die IMPDH-Aktivität wurde im Vergleich zur Proliferation von T-Zellen erst von höheren Mycophenolsäurekonzentrationen inhibiert. Dabei lag die IC_{50} für die T-Zellproliferation im Bereich der Tal- bzw. niedrigsten Konzentrationen von MPA.
- Die Proliferation von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Lymphozyten unterschied sich nach Stimulation mit dem Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) und dem CMV-Recallantigen nicht. Daher erscheint in Zukunft die Testung mit SEB ausreichend, die unabhängig vom CMV-Serostatus einsetzbar ist.
- Zwischen MPA-Konzentration und Proliferation von SEB-stimulierten $CD4^+$ - sowie $CD8^+$ -Zellen bestand eine hohe Korrelation.

Wegen der geringen Zahl von untersuchten Individuen sind diese Resultate in der Aussagekraft eingeschränkt. Dennoch legen die Ergebnisse der Untersuchung nahe, dass die T-Zellproliferationsbestimmung das Monitoring einer Therapie mit Mycophenolsäurepräparaten verbessern könnte, da so die pharmakokinetische und pharmakodynamische Variabilität beim Einzelnen in einer Untersuchung berücksichtigt werden können. Die ermittelten pharmakokinetischen Parameter, aber auch die Proliferation von T-Zellen wiesen eine hohe interindividuelle Variabilität auf, was die Behandlung mit fixen Dosierungen in Frage stellt. Auf Grund der hohen Korrelation von Mycophenolsäurekonzentration und Proliferation können beide Marker zur Überwachung einer Monotherapie äquivalent eingesetzt werden. Dagegen ist die Proliferationsmessung bei Patienten mit immunsuppressiver Kombinationstherapie überlegen, da hier pharmakokinetische Parameter die tatsächliche Immunsuppression nur unzureichend widerspiegeln.

6. Literaturverzeichnis

1. Abramson S, Miller RG, Phillips RA: The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med.* 145: 1567-1579 (1977)
2. Albrecht W, Storck M, Pfetsch E, Martin W, Abendroth D: Development and application of a high- performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells. *Ther Drug Monit.* 22: 283-294 (2000)
3. Allison AC, Eugui EM: Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 80 (2 Suppl): S181-190 (2005)
4. Atcheson BA, Taylor PJ, Mudge DW, Johnson DW, Hawley CM, Campbell SB, Isbel NM, Pillans PI, Tett SE: Mycophenolic acid pharmacokinetics and related outcomes early after renal transplant. *Br J Clin Pharmacol.* 9: 71–80 (2005)
5. Aw MM, Brown N, Itsuka T, Gonde CE, Adams JE, Heaton ND, Tredger JM, Mieli-Vergani G, Dhawan A: Mycophenolic acid pharmacokinetics in pediatric liver transplant recipients. *Liver Transplant* 9: 383-388 (2003)
6. Ballardie FW, Roberts IS: Controlled prospective trial of prednisolone and cytotoxics in progressive IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 13: 142-148 (2002)
7. Barratt J, Smith AC, Feehally J: Pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Nephrol.* 24: 197-217 (2004)
8. Barratt J, Feehally J: IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 16: 2088-2097 (2005)
9. Barratt J, Feehally J: Treatment of IgA nephropathy. *Kidney Int.* 69: 1934-1938 (2006)
10. Barratt J, Smith AC, Feehally J: The pathogenic role of IgA1 O-linked glycosylation in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 12: 275-284 (2007)

11. Barten MJ, Gummert JF, van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE: Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro. *J Immunol Methods* 253: 95-112 (2001)
12. Barten MJ, van Gelder T, Gummert JF, Boeke K, Shorthouse R, Billingham ME, Morris RE: Pharmacodynamics of mycophenolate mofetil after heart transplantation: New mechanisms of action and correlations with histologic severity of graft rejection. *Am J Transplant.* 2: 719-732 (2002)
13. Behrend M, Lueck R, Pichlmayr R: Mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide trough levels after renal transplantation. *Transplant Proc.* 29:2936-2938 (1997)
14. Berger J, Hinglais N: Les dépôts intercapillaires d'IgA-IgG. *J Urol Nephrol.* 74: 694-695 (1968)
15. Bergner R, Hoffmann M, Brass H, Uppenkamp M: Therapy of IgA nephropathy with mycophenolate mofetil - report of 3 cases. *Clin Nephrol.* 61: 207-212 (2004)
16. Berthoux F, Mohey H, Laurent B, Mariat C, Afiani A, Thibaudin L: Predicting the risk for dialysis or death in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 22: 752-761 (2011)
17. Bjorkman PJ: MCH restriction in three dimensions. A view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 89: 167-170 (1997)
18. Böyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 97: 22-89 (1968)
19. Borrows R, Chusney G, Loucaidou M., James A, Lee J, Tromp JV, Owen J, Cairns T, Griffith M, Hakim N, McLean A, Palmer A, Papalois V, Taube D: Mycophenolic acid 12-h trough level monitoring in renal transplantation: association with acute rejection and toxicity. *Am J Transplant.* 6: 121-128 (2006)
20. Bremer S, Mandla R, Vethe NT, Rasmussen I, Rootewelt H, Line PD, Midtvedt K, Bergan S: Expression of IMPDH1 and IMPDH2 after

- transplantation and initiation of immunosuppression. *Transplantation* 85: 55-61 (2008)
21. Brewin TB, Cole MP, Jones CT, Platt DS, Todd ID: Mycophenolic acid (NSC-129185): preliminary clinical trials. *Cancer Chemother Rep.* 56: 83-87 (1972)
 22. Brunet M, Cirera I, Martorell J, Vidal E, Millan O, Jimenez O, Rojo I, Londono MC, Rimola A: Sequential determination of pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in liver transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Transplantation* 81: 541-546 (2006)
 23. Budde K, Glander P, Grohmann J, Bauer S, Hambach P, Hepburn H, Mai I, Sandau K, Fischer W, Neumayer HH: Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of mycophenolate mofetil and enteric-coated mycophenolate sodium in maintenance renal transplant patients with tacrolimus as basic immunosuppression. *Transplantation* 78: 459-460 (2004)
 24. Budde K, Glander P, Krämer BK, Fischer W, Hoffmann U, Bauer S, Grohmann J, Neumayer HH, Arns W: Conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium in maintenance renal transplant recipients receiving tacrolimus: clinical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic outcomes. *Transplantation* 83: 417-424 (2007)
 25. Bullingham RES, Monroe S, Nicolls A, Hale M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacology* 36: 315-324 (1996)
 26. Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Gotti E, Remuzzi G. Glucocorticoids interfere with mycophenolate mofetil bioavailability in kidney transplantation. *Kidney Int* 62: 1060-1067 (2002)
 27. Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, Berthoux F, Bonsib S, Brujin JA, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator S, Emma F, Ferrario F, Fervenza FC, Florqzin S, Fogo A, Geddes CC, Groene HJ, Haas M, Herzenberg AM, Hill PA, Hogg RJ, Hsu SI, Jennette JC, Joh K, Julian BA, Kawamura T, Lai FM, Leung CB, Li LS, Li PK, Liu ZH, Mackinnon B, Mezzano S, Schena FP, Tomino Y, Walker PD, Wang H, Weening JJ, Yoshikawa N, Zhang H: *The Oxford*

- classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney Int.* 76: 534-545 (2009)
28. Chen A, Chen WP, Sheu LF, Lin CY: Pathogenesis of IgA nephropathy: in vitro activation of human mesangial cells by IgA immune complex leads to cytokine secretion. *J Pathol.* 173: 119-126 (1994)
 29. Chiarelli LR, Molinaro M, Libetta C, Tinelli C, Cosmai L, Valentini G, Dal Canton A, Regazzi M: Inosine monophosphate dehydrogenase variability in renal transplant patients on long-term mycophenolate mofetil therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 69: 38–50 (2010)
 30. Choi MJ, Eustace JA, Gimenez LF, Atta MG, Scheel PJ, Sothinathan R, Briggs WA: Mycophenolate mofetil treatment for primary glomerular diseases. *Kidney Int* 61:1098-1114 (2002)
 31. Dambrin C, Klupp J, Morris RE: Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Curr Opin Immunol.* 12: 557-562 (2000)
 32. D'Amico G: Influence of clinical and histological features on actuarial renal survival in adult patients with idiopathic IgA nephropathy, membranous nephropathy, and membranoproliferative glomerulonephritis: survey of the recent literature. *Am J Kidney Dis.* 20: 315-323 (1992)
 33. D'Amico G, Ragni A, Gandini E, Fellin G: Typical and atypical natural history of IgA nephropathy in adult patients. *Contrib Nephrol.* 104: 6-13 (1993)
 34. D'Amico G: Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome. *Semin Nephrol.* 24: 179-196 (2004)
 35. DeNofrio D, Loh E, Kao A, Korecka M, Pickering FW, Craig KA, Shaw LM: Mycophenolic acid concentrations are associated with cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant.* 19:1071-1076 (2000)
 36. De Winter BC, van Gelder T, Glander P, Cattaneo D, Tedesco-Silva H, Neumann I, Hilbrands L, van Hest RM, Pescovitz MD, Budde K, Mathot RA. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid: A comparison between enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 47: 827-838 (2008)
 37. De Winter BC, van Gelder T, Sombogaard F, Shaw LM, van Hest RM, Mathot RA: Pharmacokinetic role of protein binding of mycophenolic acid

- and its glucuronide metabolite in renal transplant recipients. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn.* 36: 541-564 (2009)
38. Doherty PC, Zinkernagel RM, Ramshaw IA: Specificity and development of cytotoxic thymus-derived lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *J Immunol.* 112: 1548-1552 (1974)
 39. Donadio JV, Grande JP: IgA nephropathy. *N Engl J Med.* 347: 738-748 (2002)
 40. Donadio JV, Grande JP. The role of fish oil/omega-3 fatty acids in the treatment of IgA nephropathy. *Semin Nephrol.* 24: 225-243 (2004)
 41. El Karoui K, Hill GS, Karras A, Moulonguet L, Caudwell V, Loupy A, Bruneval P, Jacquot C, Nochy D: Focal segmental glomerulosclerosis plays a major role in the progression of IgA nephropathy. II. Light microscopic and clinical studies. *Kidney Int.* 79: 643-654 (2011)
 42. Floege J, Feehally J: IgA nephropathy: recent developments. *J Am Soc Nephrol.* 11: 2395-2403 (2000)
 43. Floege J, Eitner F: Current therapy for IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 22: 1785-1794 (2011)
 44. Franklin TJ, Cook JM: The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J.* 113: 515-524 (1969)
 45. Frisch G, Lin J, Rosenstock J, Markowitz G, D'Agati V, Radhakrishnan J, Preddie D, Crew J, Valeri A, Appel G: Mycophenolate mofetil (MMF) vs placebo in patients with moderately advanced IgA nephropathy: A double-blind randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant.* 20: 2139–2145 (2005)
 46. Fulton B, Markham A: Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 51: 278-298 (1996)
 47. Galla JH: IgA nephropathy. *Kidney Int.* 47: 377-387 (1995)
 48. Geddes CC, Rauta V, Gronhagen-Riska C, Bartosik LP, Jardine AG, Ibels LS, Pei Y, Cattran DC: A tricontinental view of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 18: 1541-1548 (2003)
 49. Glander P, Braun KP, Hambach P, Bauer S, Mai I, Roots I, Waiser J, Fritsche L, Neumayer HH, Budde K: Non-radioactive determination of

- inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clin Biochem.* 34:543-549 (2001)
50. Glander P, Sommerer C, Arns W, Ariabatar T, Kramer S, Vogel EM, Shipkova M, Fischer W, Zeier M, Budde K: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intensified versus standard dosing of mycophenolate sodium in renal transplant patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 5: 503–511 (2010)
 51. Gosio B: Recherche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. Contributo all'etiologia della pellagra. *Rivista d'Igiene Sanita Pubbl.* 7: 825-849 (1896)
 52. Gummert JF, Barten M, Sherwood S, van Gelder T, Morris RE: Pharmacodynamics of immunosuppression by mycophenolic acid: Inhibition of both lymphocyte proliferation and activation correlates with pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther.* 291: 1100-1112 (1999)
 53. Gummert JF, Barten MJ, van Gelder T, Billingham ME, Morris RE: Pharmacodynamics of mycophenolic acid in heart allograft recipients: Correlation of lymphocyte proliferation and activation with pharmacokinetics and graft histology. *Transplantation* 70: 1038-1049 (2000)
 54. Hale MD, Nicolls AJ, Bullingham RES, Hene R, Hoitsma A, Squifflet JP, Weimar W, Vanrenterghem Y, Woude von der FJ, Verpooten GA: The pharmacokinetic and pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther,* 64: 672-683 (1998)
 55. Halloran PF: Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 352: 2715-2729 (2004)
 56. Hazzan M, Labalette M, Copin MC, Glowacki F, Provot F, Pruvot FR, Noël C: Predictive factors of acute rejection after early cyclosporine withdrawal in renal transplant recipients who receive mycophenolate mofetil: results from a prospective, randomized trial. *J Am Soc Nephrol.* 16: 2509-2516 (2005)
 57. Ho AD, Maruyama M, Maghazachi A, Mason JR, Glück S, Corringham RE: Soluble CD4, soluble CD8, soluble CD25, lymphopoietic recovery, and endogenous cytokines after high-dose chemotherapy and blood stem cell transplantation. *Blood* 84: 3550-3557 (1994)

58. Hoffmeister B, Kiecker F, Tesfa L, Volk DH, Picker LJ, Kern F: Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods* 29: 270-281 (2003)
59. Holdorf AD, Kanagawa O, Shaw AS: CD28 and T cell co-stimulation. *Rev Immunogenet.* 2: 175-184 (2000)
60. Holt DW: Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs in kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 11: 657-663 (2002)
61. Jain A, Venkataramanan R, Hamad IS, et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid after mycophenolat mofetil administration in liver transplant patients treated with tacrolimus. *J Clin Pharmacol.* 41: 268-276 (2001)
62. Jeong H, Kaplan B: Therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2: 184-191 (2007)
63. Johnson A, Rigby R, Taylor PJ, Jones C, Allen J, Franzen K, Falk M, Nicol D: The kinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in adult kidney transplant recipients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 66: 492–500 (1999)
64. Johnston A, He X, Holt DW: Bioequivalence of enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil: a meta-analysis of three studies in stable renal transplant recipients. *Transplantation* 82: 1413-1418 (2006)
65. Kamar N, Glander P, Noltin J, Böhler T, Hambach P, Liefeldt L, Rostaing L, Neumayer HH, Budde K: Pharmacodynamic evaluation of the first dose of mycophenolate mofetil before kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 4: 936-942 (2009)
66. Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Friedman G, Mulgaonkar S, Gruber S, Korecka M, Brayman KL, Shaw LM: The effect of renal insufficiency on mycophenolic acid protein binding. *J Clin Pharmacol.* 39: 715-720 (1999)
67. Kirklin JK, Bourge RC, Naftel DC, Morrow WR, Deierhoi MH, Kauffman RS, White-Williams C, Nomberg RI, Holman WL, Smith DC Jr: Treatment of recurrent heart rejection with mycophenolate mofetil (RS-61443): initial clinical experience. *J Heart Lung Transplant.* 13: 444-450 (1994)
68. Klupp J: Untersuchungen zum Einfluss von Mycophenolat Mofetil auf die Transplantat-Vaskulopathie nach allogener Aorten-Transplantation im

- Primaten-Modell. Habilitationsschrift, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät – Universitätsklinikum Charité (2002)
69. Klupp J, van Gelder T, Dambrin C, Regieli JJ, Boeke K, Billingham ME, Morris RE: Sustained suppression of peripheral blood immune functions by treatment with mycophenolate mofetil correlates with reduced severity of cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 23: 334-351 (2004)
 70. König R: Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol*. 14: 75-83 (2002)
 71. Kuypers DR, Vanrenterghem Y, Squifflet JP, Mourad M, Abramowicz D, Oellerich M, Armstrong V, Shipkova M, Daems J: Twelve-month evaluation of the clinical pharmacokinetics of total and free mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in renal allograft recipients on low dose tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit*. 25: 609-622 (2003)
 72. Kuypers DR, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, Tönshoff B, Holt DW, Chapman J, van Gelder T: Consensus Report on Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 5: 341-358 (2010)
 73. Lai KN, Lai FM, Li PK, Vallance-Owen J: Cyclosporin treatment of IgA nephropathy: a short term controlled trial. *Br Med J. (Clin Res Ed)* 295: 1165-1168 (1987)
 74. Lai KN: Pathogenesis of IgA nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 20: 275-283 (2012)
 75. Langman LJ, LeGatt DF, Halloran PF, Yatscoff RW: Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients. *Transplantation* 62: 666– 672 (1996)
 76. Le Meur Y, Büchler M, Thierry A, Caillard S, Villemain F, Lavaud S, Etienne I, Westeel PF, de Ligny BH, Rostaing L, Thervet E, Szelag JC, Rérolle JP, Rousseau A, Touchard G, Marquet P. Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am J Transplant*. 7: 2496-2503 (2007)

77. Lertdumrongluk P, Somparn P, Wonngarm K, Opas T, Somratai V, Yingyos A: Pharmacokinetics of mycophenolic acid in severe lupus nephritis. *Kidney Int.* 78: 389-395 (2010)
 78. Locatelli F, Pozzi M, Del Vecchio L, Pozzi C: Advanced IgA nephropathy: to treat or not to treat? *Nephron Clin Pract.* 93: 119-121 (2003)
 79. Lu XY, Huang HF, Sheng-Tu JZ, Li J: Pharmacokinetics of mycophenolic acid in Chinese kidney transplant patients. *J Zhejiang Univ Sci. B* 9: 885-891 (2005)
 80. Lyons AB, Parish CR: Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunolog Methods* 171: 131-137 (1994)
 81. Maes BD, Oyen R, Claes K, Evenepoel P, Kuypers D, Vanwalleghem J, Van Damme B, Vanrenterghem YF: Mycophenolate mofetil in IgA nephropathy: Results of a 3-year prospective placebo-controlled randomized study. *Kidney Int.* 65: 1842–1849 (2004)
 82. Mannering SI, Morris JS, Jensen KP, Purcell AW, Honeyman MC, van Endert PM, Harrison LC: A sensitive method for detecting proliferation of rare autoantigen-specific human T-cells. *J Immunol Methods* 283: 173-183 (2003)
- McDiarmid SV: Mycophenolate mofetil in liver transplantation. *Clin Transplant.* 10: 140-145 (1996)
83. Neumann I, Fuhrmann H, Kanzler M, Fang IF, Jaeger A, Graf H, Bayer P, Kovarik J: Pharmacokinetics of enteric-coated mycophenolate sodium: comparative study in patients with autoimmune disease and renal allograft. *Expert Opin Pharmacother.* 9: 879-886 (2008)
 84. Nowak I, Shaw LM: Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clin Chem.* 41: 1011-1017 (1995)
 85. Nowack R, Birck R, Van der Woude FJ: Mycophenolate mofetil for systemic vasculitis and IgA nephropathy. *Lancet* 349: 744 (1997)
 86. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K, Wonigeit K et al: Lake Louise Consensus Conference on cyclosporine monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit.* 17: 642-654 (1995)

87. O'Garra A: Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8: 275-283 (1998)
88. Perry TW, Christians U, Trotter JF, Bendrick-Pearl J: Pharmacokinetics of enteric-coated mycophenolate sodium in stable liver transplant recipients. *Clin Transplant*. 21: 413-416 (2007)
89. Pozzi C, Manno C, Passerini P, Strippoli GF, Lupo A, Stratta P, Cagnoli L: Immunosuppressive and non-immunosuppressive agents for patients with IgA nephropathy: guideline from the Italian Society of Nephrology. *G Ital Nefrol*. 24 Suppl 37: 30-49 (2007)
90. Quéméneur L, Flacher M, Gerland M, Ffrench M, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N: Mycophenolic acid inhibits IL-2-dependent T cell proliferation, but not IL-2-dependent survival and sensitization to apoptosis. *J Immunol*. 169: 2747-2755 (2002)
91. Radhakrishnan J, Catran DC: The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide)lines - application to the individual patient. *Kidney Int*. 82: 840-856 (2012)
92. Rasche FM, Klotz CH, Czock D, Karges W, Muche R, Jehle PM, Mertz A, Keller F. Cyclophosphamide pulse therapy in advanced progressive IgA nephropathy. *Nephron Clin Pract*. 93: c131-136 (2003)
93. Reich HN, Troyanov S, Scholey JW, Catran DC; Toronto Glomerulonephritis Registry: Remission of proteinuria improves prognosis in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 18: 3177-3183 (2007)
94. Roland M, Barbet C, Painteaud G, Magdelaine-Beuzelin C, Diot E, Halimi JM, Lebranchu Y, Nivet H, Büchler M: Mycophenolate mofetil in participants with systemic lupus erythematosus: a prospective pharmacokinetic study. *Lupus* 8: 441-447 (2009)
95. Rother A, Glander P, Vitt E, Czock D, von Ahsen N, Armstrong VW, Oellerich M, Budde K, Feneberg R, Tönshoff B, Weber LT: Inosine monophosphate dehydrogenase activity in paediatrics: age-related regulation and response to mycophenolic acid. *Eur J Clin Pharmacol*. 68: 913-922 (2012)
96. Sanquer S, Breil M, Baron C, Dhamane D, Astier A, Lang P. Trough blood concentrations in long-term treatment with mycophenolate mofetil. *Lancet* 351: 1557 (1998)

97. Schaier M, Scholl C, Scharpf D, Hug F, Bönisch-Schmidt S, Dikow R, Schmitt WH, Schwenger V, Zeier M, Sommerer C: Proton pump inhibitors interfere with the immunosuppressive potency of mycophenolate mofetil. *Rheumatology* 49: 2061-2067 (2010)
98. Schöll U, Wastl U, Risler T, Braun N, Grabensee B, Heering P, Schollmeyer P, Zäuner I, Stein G, Fünfstück R, Keller F. The "point of no return" and the rate of progression in the natural history of IgA nephritis. *Clin Nephrol.* 52: 285-292 (1999)
99. Shaw LM, Kaplan B, Denofrio D, Korecka M, Brayman KL: Pharmacokinetics and concentration-control investigations of mycophenolic acid in adults after transplantation. *Ther Drug Monit.* 22: 14-19 (2000)
100. Shaw LM, Korecka M, Venkatamaranan R, Goldberg L, Bloom R, Brayman KR: Mycophenolic acid pharmacodynamics and pharmacokinetics provide a basis for rational monitoring strategies. *Am J Transplant.* 3: 534-542 (2003)
101. Staatz CE, Tett SE: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 46: 13-58 (2007)
102. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, Wyatt RJ, Scolari F, Mestecky J, Gharavi AG, Julian BA: The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 22: 1795-1803 (2011)
103. Tang S, Leung JC, Chan LY, Lui YH, Tang CS, Kan CH, Ho YW, Lai KN: Mycophenolate mofetil alleviates persistent proteinuria in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 68: 802–812 (2005)
104. Teixeira R, Papatheodoridis GV, Burroughs AK: Management of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *J Viral Hepat.* 8: 159-168 (2001)
105. Tumlin JA, Lohavichan V, Hennigar R: Crescentic, proliferative IgA nephropathy: clinical and histological response to methylprednisolone and intravenous cyclophosphamide. *Nephrol Dial Transplant.* 18: 1321-1329 (2003)
106. Van der Boog PJ, van Kooten C, van Seggelen A, Mallat M, Klar-Mohamad N, de Fijter JW, Daha MR: An increased polymeric IgA level is

- not a prognostic marker for progressive IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 19: 2487-2493 (2004)
107. Van Gelder T, Hilbrands LB, Vanrenterghem Y, Weimar W, de Fijter JW, Squifflet JP, Hené RJ, Verpooten GA, Navarro MT, Hale MD, Nicholls AJ: A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 68: 261-266 (1999)
108. Van Hest RM, van Gelder T, Bouw R, Goggin T, Gordon R, Mamelok RD, Mathot RA: Time-dependent clearance of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 63: 741-752 (2007)
109. Vethe NT, Bergan S. Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in CD4⁺-cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy. *Ther Drug Monit.* 28: 608-613 (2006)
110. Wallemacq PE: Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs: Where are we? *Clin Chem Lab Med.* 42: 1204-1211 (2004)
111. Waner JL, Budnick JE: Blastogenic response of human lymphocytes to human cytomegalovirus. *Clin Exp Immunol.* 30: 44-49 (1977)
112. Wang W, Hedstrom L: Kinetic mechanism of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II: random addition of substrates and ordered release of products. *Biochemistry* 36: 8479-8483 (1997)
113. Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, Wagner N, Schütz E, Mehls O, Zimmerhackl LB, Oellerich M, Tönshoff B: The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for total and free mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients: a report of the German study group on mycophenolate mofetil therapy. *J Am Soc Nephrol.* 13: 759-768 (2002)
114. Wollenberg K, Krumme B, Pisarski P, Schollmeyer P, Kirste G: Pharmacokinetics of mycophenolic acid in the early period after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 30: 4090-4091 (1998)
115. Wyatt RJ, Julian BA: IgA nephropathy. *N Engl J Med.* 368: 2402-2414 (2013)
116. Xu G, Tu W, Jiang D, Xu C: Mycophenolate mofetil treatment for IgA nephropathy: a meta-analysis. *Am J Nephrol.* 29: 362-367 (2009)

117. Yatscoff RW, Aspeslet LJ: The monitoring of immunosuppressive drugs: a pharmacodynamics approach. *Ther Drug Monit.* 20: 459-463 (1998)

Danksagung

aus Gründen des Datenschutzes entfernt

Lebenslauf

aus Gründen des Datenschutzes entfernt