

Aus dem
Department für Veterinärwissenschaften der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

angefertigt in der
präklinischen Forschung der Roche Diagnostics GmbH
Abteilungen: DMPK In Vivo Biology/Bioanalytics
(Betreuer: Dr. Lothar Kling)

Klinische Labordiagnostik und Pharmakokinetik humanisierter therapeutischer Antikörper in human FcRn transgenen Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Carsten Stein
aus
Landau in der Pfalz

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

In tiefempfundener Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Antikörper.....	3
2.1.1	Antikörperstruktur	3
2.1.2	Therapeutische Antikörper.....	6
2.2	Fc-Rezeptor neonatal (FcRn).....	9
2.2.1	Entdeckung und Benennung von FcRn.....	9
2.2.2	Struktur von FcRn	10
2.2.3	Funktionsweise von FcRn	11
2.2.4	Vorkommen und Aufgaben von FcRn in Verbindung mit IgG	14
2.2.4.1	Aufrechterhaltung des endogenen IgG-Spiegels.....	14
2.2.4.2	Antigenpräsentierende Zellen	15
2.2.4.3	IgG-Transport von der Mutter auf die Nachkommen	15
2.2.4.4	Blut-Hirn-Schranke	16
2.2.4.5	Niere	16
2.3	Auswahl des Tiermodells.....	17
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	Material.....	20
3.1.1	Mäuse	20
3.1.2	Antikörper	20
3.1.3	Primer.....	20
3.1.4	Technische Ausstattung.....	21
3.1.5	Spezielle Materialien für Zucht und Haltung von Mäusen	21
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	22
3.1.7	Reagenzien, Chemikalien und Medikamente.....	22
3.1.8	Kits	23
3.1.9	Software	23

3.2	Methoden.....	24
3.2.1	Mäuse	24
3.2.1.1	Haltung	26
3.2.1.2	Zucht.....	27
3.2.2	Genotypisierung	27
3.2.2.1	Gewebeentnahme	27
3.2.2.2	Isolierung genomischer DNA.....	28
3.2.2.3	Konzentrationsbestimmung der DNA	29
3.2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
3.2.2.5	Gelelektrophorese zum Nachweis der amplifizierten DNA.....	32
3.2.2.6	Auswertung der Genotypisierung.....	32
3.2.3	Phänotypisierung	33
3.2.3.1	Körperwachstum	33
3.2.3.2	Hämatologie und Klinische Chemie	34
3.2.3.2.1	Probengewinnung.....	34
3.2.3.2.2	Messung Hämatologie.....	35
3.2.3.2.3	Messung Klinische Chemie.....	36
3.2.3.2.3.1	Messungen am Olympus AU400	36
3.2.3.2.3.2	Maus-IgG ELISA	38
3.2.3.2.4	Daten und Statistik	40
3.2.4	Pharmakokinetik therapeutischer Antikörper.....	41
3.2.4.1	Versuchstiere	41
3.2.4.2	Auswahl der Test-Antikörper.....	41
3.2.4.2.1	Antikörper huMAb<P>	41
3.2.4.2.2	Antikörper huMAb<A>	42
3.2.4.2.3	Antikörper huMAb<I>	42
3.2.4.2.4	Antikörper huMAb<E>.....	42
3.2.4.2.5	Antikörper huMAb<C>.....	42
3.2.4.3	Behandlung.....	43
3.2.4.4	Probengewinnung.....	43
3.2.4.5	ELISA zur Quantifikation humaner Antikörper in murinen Seren	45
3.2.4.5.1	Testprinzip.....	45
3.2.4.5.2	Durchführung	45

3.2.4.6	Pharmakokinetische Parameter und Statistik	48
3.2.4.6.1	Berechnung mit Softwareunterstützung	49
3.2.4.6.2	Vergleich von Verlaufskurven	49
3.2.4.6.3	Vergleichsdaten	49
3.2.4.6.3.1	Vergleichsdaten der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	50
3.2.4.6.3.2	Pharmakokinetische Vergleichsdaten von Primaten	52
4	ERGEBNISSE	53
4.1	Genotypisierung	53
4.1.1	Nachweis mFcRn-Gen	53
4.1.2	Nachweis mFcRn-Knock Out	53
4.1.3	Nachweis hFcRn-Knock In	54
4.2	Phänotypisierung.....	56
4.2.1	Körperwachstum	56
4.2.2	Hämatologie	59
4.2.2.1	Hämatologie C57BL/6J.....	59
4.2.2.2	Hämatologie mFcRn -/-.....	60
4.2.2.3	Hämatologie hFcRn(276) Tg +/+.....	60
4.2.2.4	Hämatologie hFcRn(32) Tg +/+.....	60
4.2.3	Klinische Chemie	63
4.2.3.1	Klinische Chemie C57BL/6J.....	63
4.2.3.2	Klinische Chemie mFcRn -/-.....	63
4.2.3.3	Klinische Chemie hFcRn(276) Tg +/+.....	64
4.2.3.4	Klinische Chemie hFcRn(32) Tg +/+.....	65
4.3	Pharmakokinetik therapeutischer Antikörper.....	70
4.3.1	Kurvenverlauf pharmakokinetischer Profile	70
4.3.2	Vergleich Serum versus Plasma.....	71
4.3.3	Geschlechtervergleich	73
4.3.4	Verteilungsvolumen	75
4.3.5	Clearance	76
4.3.6	Terminale Halbwertszeit	76
4.3.7	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve	77
4.3.8	Vergleich Maus versus Primat	78
4.3.9	Korrelation von <i>in vitro</i> mit <i>in vivo</i> Daten	81

5	DISKUSSION	82
5.1	Genotypisierung	82
5.2	Phänotypisierung.....	82
5.2.1	Körperwachstum	82
5.2.2	Hämatologie und Klinische Chemie	82
5.2.2.1	Vergleich Messwerte C57BL/6J und Literaturangaben für C57BL/6	82
5.2.2.2	Endogenes murines IgG	82
5.2.2.3	Albumin.....	82
5.2.2.4	C-reaktives Protein	82
5.2.2.5	Gesamteiweiß	82
5.2.2.6	Bilirubin	82
5.2.2.7	Lipide und Lipoproteine.....	82
5.2.2.8	Knochenstoffwechsel	82
5.2.2.9	Enzyme.....	82
5.2.2.10	Glukose.....	82
5.2.2.11	Harnpflichtige Substanzen	82
5.2.2.12	Elektrolyte	82
5.2.2.13	Eisenstoffwechsel.....	82
5.2.2.14	Rotes Blutbild.....	82
5.2.2.15	Thrombozyten	82
5.2.2.16	Leukozytenzahl	82
5.2.2.17	Fazit.....	82
5.3	Pharmakokinetik therapeutischer Antikörper.....	82
5.3.1	Kurvenverlauf pharmakokinetischer Profile	82
5.3.2	Vergleich Serum versus Plasma.....	82
5.3.3	Geschlechtervergleich	82
5.3.4	Pharmakokinetische Parameter	82
5.3.4.1	Verteilungsvolumen	82
5.3.4.2	Elimination	82
5.3.4.2.1	Clearance	82
5.3.4.2.2	Halbwertszeit.....	82
5.3.4.3	Exposition und Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve	82
5.3.4.4	Schwächen des Studiendesign und Auswertung	82

5.3.5	Vergleich Maus versus Primat	82
5.3.5.1	Einfluss der Körpergröße	82
5.3.5.2	Allometrische Skalierung.....	82
5.3.5.3	Speziespezifisches Verhalten	82
5.3.5.4	Immunogenität therapeutischer Antikörper	82
5.3.6	Korrelation von <i>in vitro</i> mit <i>in vivo</i> Daten	82
5.3.7	Fazit.....	82
6	ZUSAMMENFASSUNG	82
7	SUMMARY.....	82
8	LITERATURVERZEICHNIS	82
9	ANHANG	82
9.1	Tabellen.....	82
9.2	Danksagung	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Absorption
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC _{0-inf}	Area Under the Curve 0 h - infinity (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve 0 Stunden bis unendlich)
AUC ₆₇₂	Area Under the Curve 0 – 672 h Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve 0 bis 672 Stunden
b ₂ m	beta-2-Mikroglobulin
B6	Maus-Inzuchtstamm C57BL/6J
Bili	Bilirubin
c	Concentration (Konzentration)
Ca ⁺⁺	Kalziumion
CDR	Complementarity Determining Region (hypervariable Region von Immunglobulinen)
CH	Constant Heavy (Konstante Domäne der schweren Antikörperkette)
Chol	Cholesterin
CK	Creatinkinase
CL	Constant Light (Konstante Domäne der leichten Antikörperkette)
Cl	Clearance
Cl ⁻	Chloridion
Crea	Creatinin
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonuclein Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylenediaminetetra Acetic (Ethylenediamintetraessigsäure)
engl.	englisch
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
Fab	Fragment of Antigen Binding (Antigenbindendes Antikörperfragment nach Papain-Spaltung)
Fc	Fragment crystallizing (Antikörperfragment nach Papain-Spaltung)
FcRn	Fragment crystallizing Receptor neonatal (neonataler Fc-Rezeptor)

Fe	Eisen
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Gluc	Glucose (Glukose)
h	Hour (Stunde)
HDL	High-density Lipoprotein-Cholesterin
hFcRn	human Fragment crystallizing Receptor neonatal (humaner neonataler Fc-Rezeptor)
HGB	Hämoglobin
hIgG	humanes Immunglobulin Gamma
HS	Harnsäure
huMAb	humanisierter bzw. humaner monoklonaler Antikörper
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin Gamma
ISE	Ionen-selektive Elektrode
i.v.	intravenös
K ⁺	Kaliumion
k _a	Assoziationskonstante der SPR-Messung
k _d	Dissoziationskonstante der SPR-Messung
K _D	Gleichgewichtskonstante der SPR-Messung
KO	Knock Out (Gen-Deaktivierung)
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low-density Lipoprotein-Cholesterin
mAk	monoklonaler Antikörper
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin (Mittleres Korpuskuläres Hämoglobin)
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration)
MCV	Mean Corpuscular Volume (Mittleres Korpuskuläres Volumen)
mFcRn	murin Fragment crystallizing Receptor neonatal (muriner neonataler Fc-Rezeptor)
Mg ⁺⁺	Magnesiumion
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
mIgG	Murines Immunglobulin Gamma
MPV	Mean Platelet Volume (Mittleres Thrombozytenvolumen)
MW	Mittelwert (arithmetisches Mittel)
n	Anzahl
Na ⁺	Natriumion

NEFA	Not Esterified Fatty Acids (Freie Fettsäuren)
OD	Optische Dichte
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PCV	Packed Cell Volume (Hämatokrit)
Phos	anorganisches Phosphat
PLT	Platelets (Thrombozytenzahl)
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RBC	Red Blood Cell Count (Erythrozytenzahl)
RDW	Red Blood Cell Distribution Width (Erythrozytenverteilungsbreite)
RETI	Retikulozytenzahl
rpm	Rounds per Minute (Umdrehungen)
RU	Relative Response Units
S1	Verdünnungspuffer mit 1 % Serum
SD	Standard Deviation (Standardabweichung des Mittelwerts)
SEM	Standard Error of Mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie)
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TG	Triglyceride
Tg	Transgen
TMDD	Target-Mediated Drug Disposition (Zielstruktur-vermittelte Medikamenten-Disposition)
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor Alpha
TP	Total Protein (Gesamteiweiß)
U	Unit
UIBC	Unsaturated Iron-Binding Capacity (Ungesättigte Eisenbindungskapazität)
Urea	Harnstoff
VH	Variable Heavy (Variable Domäne der schweren Antikörperkette)
VL	Variabel Light (Variable Domäne der leichten Antikörperkette)
VP	Verdünnungspuffer
V _{ss}	Volume of Distribution at Steady-State (Verteilungsvolumen im Gleichgewicht)
WBC	White Blood Cell Count (Leukozytenzahl)
WP	Waschpuffer
WT	Wildtyp

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Struktur von IgG	5
Abbildung 2: Formen modifizierter Antikörper und deren Fragmente	7
Abbildung 3: Schematische Struktur von FcRn.....	10
Abbildung 4: Mechanismus des IgG-Recyclings durch FcRn.....	13
Abbildung 5: hFcRn-Anzahl der transgenen Mäuse.....	25
Abbildung 6: ELISA-Prinzip zum Nachweis von murinem IgG.....	38
Abbildung 7: Exemplarisches Blutentnahmeschema.....	44
Abbildung 8: ELISA-Prinzip zum Nachweis von humanem IgG	45
Abbildung 9: Mikrotiterplattenbelegung	47
Abbildung 10: Typische ELISA-Standardkurve.....	48
Abbildung 11: Schematische Kurve einer SPR-Messung	51
Abbildung 12: Elektrophoresegele der Genotypisierung.....	55
Abbildung 13: Körperwachstum im Vergleich der Mauslinien.....	58
Abbildung 14: Hämatologie.....	61
Abbildung 15: Einzelmesswerte von Transferrin	64
Abbildung 16: Endogenes murines IgG.....	65
Abbildung 17: Klinische Chemie.....	66 - 67
Abbildung 18: Pharmakokinetisches Profil von huMAb<E>	70
Abbildung 19: Vergleich Serum versus Plasma	72
Abbildung 20: Geschlechtervergleich bei huMAb<P>	73
Abbildung 21: Verteilungsvolumina von huMAb<P> und huMAb<A>	75
Abbildung 22: Clearance und terminale Halbwertszeit von huMAb<I>.....	76
Abbildung 23: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurven von huMAb<I>	77
Abbildung 24: Pharmakokinetische Profile 1	79
Abbildung 25: Pharmakokinetische Profile 2	80
Abbildung 26: Schematische Kurve der biphasischen Clearance von IgG	104

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Klassen und Subklassen von Immunglobulinen	3
Tabelle 2: Isotypen der leichten Kette von IgG im Speziesvergleich.....	4
Tabelle 3: Nomenklatur der Mauslinien	24
Tabelle 4: Klimatische Haltungsbedingungen	26
Tabelle 5: Primer zum Nachweis des mFcRn-Gens und mFcRn-Knock Outs	30
Tabelle 6: Primer zum Nachweis des hFcRn-Knock Ins	30
Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemischs	31
Tabelle 8: Thermo-Cycler-Programm.....	31
Tabelle 9: Auswertung der Genotypisierung	32
Tabelle 10: Hämatologische Parameter	35
Tabelle 11: Klinisch-chemische Parameter	37
Tabelle 12: Auswahlkriterien der therapeutischen Antikörper	43
Tabelle 13: Puffer für hIgG-ELISA	46
Tabelle 14: Vergleichsdaten Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie.....	52
Tabelle 15: Mittleres Körperwachstum und Analyse der Wachstumskurven	57
Tabelle 16: Messwerte der Hämatologie	62
Tabelle 17: Messwerte des endogenen murinen IgGs	68
Tabelle 18: Messwerte der Klinischen Chemie	68
Tabelle 19: Signifikanz der Geschlechtsunterschiede	74
Tabelle 20: Korrelation von in vitro mit in vivo Daten	81
Tabelle 21: Durchschnittliche Gewichte der Mauslinien.....	131 - 133
Tabelle 22: Vergleichsdaten der Hämatologie von C57BL/6 aus der Literatur	134
Tabelle 23: Qualität der Vergleichsdaten der Hämatologie von C57BL/6.....	134
Tabelle 24: Vergleichsdaten Klinische Chemie von C57BL/6 aus der Literatur	135
Tabelle 25: Qualität der Vergleichsdaten der Klinischen Chemie von C57BL/6.....	136
Tabelle 26: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<P> 10 mg/kg	137
Tabelle 27: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<P> 2,5 mg/kg	138
Tabelle 28: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<A> 10 mg/kg.....	139
Tabelle 29: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<A> 2,5 mg/kg.....	140
Tabelle 30: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<I> 10 mg/kg	141
Tabelle 31: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<E> 10 mg/kg	142
Tabelle 32: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<C> 10 mg/kg.....	143

1 EINLEITUNG

Präklinische Tests zur Beurteilung der Pharmakokinetik humanisierter therapeutischer Antikörper werden üblicherweise an Mäusen durchgeführt. Konventionelle Nagetiermodelle spiegeln aber nicht die Pharmakokinetik im Menschen wider, da der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn), der eine wichtige Rolle bei der Regulation der Homöostase von Immunglobulin Gamma (IgG) spielt, speziesspezifische Unterschiede in der IgG-Bindung zeigt (Ober *et al.* 2001; Datta-Mannan *et al.* 2007a; Roopenian *et al.* 2010).

Aus diesem Grund stellen Mäuse mit modifiziertem FcRn ein wichtiges pharmakologisches Modell bei der Erforschung therapeutischer Antikörper dar. Es wird propagiert, dass Mäuse, denen murines FcRn fehlt und die transgenes humanes FcRn exprimieren, ein vielversprechendes murines Modell sind, um Pharmakokinetiken von therapeutischen humanen IgGs in Primaten vorherzusagen (Roopenian *et al.* 2003; Roopenian *et al.* 2010; Petkova *et al.* 2006).

Um zu klären, ob human FcRn-transgene Mäuse ein geeignetes Nagetiermodell zur Beurteilung des pharmakokinetischen Verhaltens von therapeutischen IgGs darstellen, wurde das pharmakokinetische Verhalten von strukturell und funktionell sehr unterschiedlichen humanisierten Antikörpern in drei unterschiedlichen FcRn-modifizierten Mauslinien untersucht und verglichen.

Zusätzlich sollten die Ergebnisse mit Daten von Primaten verglichen werden, um der Hypothese nachzugehen, dass human FcRn-transgene Mäuse geeignet sind, Pharmakokinetiken in Primaten vorherzusagen, und so der Einsatz von Primaten in der pharmazeutischen Forschung verringert werden kann.

Antikörper, die *in vitro* eine erhöhte Affinität zu humanem FcRn besitzen, zeigen in human FcRn-transgenen Mäusen häufig ein verändertes pharmakokinetisches Verhalten (Kim *et al.* 1994; Ghetie *et al.* 1997; Medesan *et al.* 1998; Hinton *et al.* 2004; Hinton *et al.* 2006; Petkova *et al.* 2006). Die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie ist eine *in vitro* Methode, die eine Echtzeitmessung der Wechselwirkung eines gelösten Antikörpers mit immobilisiertem FcRn erlaubt. Deshalb wurde mit einer Korrelationsanalyse geprüft, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen pharmakokinetischen Daten von Mäusen und Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie-Messungen besteht.

Trotz ihres häufigen Einsatzes in der medizinischen Forschung finden sich in der Literatur nur vereinzelt phänotypische Daten dieser FcRn-modifizierten Mäuse, die zudem aufgrund unterschiedlicher Messmethoden oft nicht als Vergleichswerte herangezogen werden können. Um genetischbedingte Unterschiede der Mauslinien von versuchsbedingten unterscheiden zu können, wurden die Tiere hinsichtlich Hämatologie, klinischer Chemie und Körperwachstum phänotypisiert.

Da die eingesetzten Mäuse optisch nicht zu unterscheiden sind, bedurfte es einer sicheren Methode, mit der es möglich ist, die Mauslinien zu differenzieren. Zu diesem Zwecke wurde eine Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion und anschließender Gelelektrophorese etabliert.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Antikörper

2.1.1 Antikörperstruktur

Die Entschlüsselung der molekularen Struktur von Antikörpern erfolgte bereits 1969 durch Edelman (Edelman *et al.* 1969). Für Säugetiere wurden fünf Isotypen von Immunglobulinen (Ig) definiert (Raghavan and Bjorkman, 1996). Die Typisierung erfolgte aufgrund struktureller Unterschiede in den schweren Polypeptidketten der Antikörper (Reff and Heard, 2001). Sie werden als Immunglobulin Alpha (IgA), Delta (IgD), Epsilon (IgE), Gamma (IgG) und My (IgM) bezeichnet (Lobo *et al.* 2004). Die unterschiedlichen Subklassen wurden durch subklassenspezifische Antiseren definiert. Sie besitzen biochemische und funktionelle Unterschiede. Die Subklassen sind bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich ausgeprägt (Tab. 1).

Tabelle 1: Klassen und Subklassen von Immunglobulinen

Spezies	Klasse				
Mensch	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	IgA1, IgA2	IgM1, IgM2	IgE	IgD
Maus	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3	IgA1, IgA2	IgM	IgE	IgD

Quelle: Loeb and Quimby, 1989

Der mengenmäßig häufigste Antikörperisotyp ist IgG; er hat beim Menschen einen Anteil von ca. 85 % im Serum (Morell *et al.* 1972). Auch die meisten therapeutischen Antikörper sind vom IgG-Isotyp (Lobo *et al.* 2004; Mould and Green, 2010). Aus diesem Grund wird sich der folgende Text primär auf IgG beziehen (siehe auch Abb. 1).

Bei IgG-Antikörpern handelt es sich um Y-förmige Glykoproteine, die im Serum als Monomere vorliegen. Die funktionelle Basis besteht aus zwei identischen schweren Polypeptid-Ketten und zwei identischen leichten Polypeptid-Ketten (Lobo *et al.* 2004). Die leichten Ketten bestehen aus zwei strukturellen Domänen, der konstanten Domäne und der variablen Domäne. Sie werden klassifiziert in Kappa- oder Lambda-Typ. Diese Klassifizierung beruht auf Determinanten in den konstanten Zonen (Loeb and Quimby, 1989). Die Isotypen sind bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich verteilt (Tab. 2).

Tabelle 2: Isotypen der leichten Kette von IgG im Speziesvergleich

Spezies	Isotyp	
Mensch	70 % Kappa	30 % Lambda
Rhesusaffe	50 % Kappa	50 % Lambda
Maus	95 % Kappa	5 % Lambda

Quelle: Loeb and Quimby, 1989

Jede schwere Kette ist aus drei konstanten (CH1, CH2, CH3) und einer variablen Domäne (VH) aufgebaut (Reff and Heard, 2001). Disulfidbrücken verbinden die beiden schweren Ketten kovalent untereinander sowie die schweren Ketten mit den leichten Ketten. Auch innerhalb der Domänen finden sich Disulfidbrücken, die die Tertiärstruktur stabilisieren (Lobo *et al.* 2004). Die Maus besitzt zwischen den schweren Ketten drei, der Mensch hingegen zwei bis 15 solche Verbindungen (Loeb and Quimby, 1989).

Die Verbindung zwischen CH1 und CH2 wird als „Hinge Region“ bezeichnet; sie stattet die Immunglobuline mit einer hohen Flexibilität aus (Reff and Heard, 2001).

Die variablen Regionen der schweren und leichten Kette sind für die Bindung des Antigens verantwortlich. Drei hypervariable Regionen existieren in jeder variablen leichten und variablen schweren Kette. Sie werden als „Complementarity Determining Regions“ (CDRs) bezeichnet. Wenn die variablen leichten und variablen schweren Ketten kovalent und nicht kovalent verbunden sind, bilden die CDRs eine Bindungsoberfläche für den Kontakt mit dem Antigen (Edelman *et al.* 1969). Jedes IgG-Molekül ist bivalent und hat daher die Fähigkeit, zwei gleiche Antigene zu binden, eines an jedem Arm (Reff and Heard, 2001). Die schweren konstanten Domänen, vor allem die CH2 und CH3, sind in die Bindung von Nicht-Antigenen involviert. Diese Regionen binden z.B. Fc-Rezeptoren und Komplement (Reff and Heard, 2001).

IgG enthält einige Histidinreste an der CH2-CH3 Domäne, dem Interface des Fc-Fragments. Durch diese Histidinreste kann die pH-Abhängigkeit der Bindung von IgG mit FcRn erklärt werden (Raghavan *et al.* 1994). Eine effiziente Bindung kommt nur bei saurem pH < 6,5 und nicht bei neutralem pH > 7,0 zustande (Reff and Heard, 2001; Popov *et al.* 1996).

Das IgG-Molekül besitzt eine ungefähre Masse von 150 kDa. Jede schwere Kette besteht aus ca. 445 Aminosäuren (55 kDa) und jede leichte Kette aus ca. 215 Aminosäuren (24 kDa). An die schweren Ketten ist je ein Oligosaccharid über Asparagin gebunden (Reff and Heard, 2001).

Antikörper lassen sich durch Proteinasen in funktionelle Untereinheiten spalten. Nach Spaltung durch Papain oberhalb der Disulfidbrücken beider schwerer Ketten entstehen zwei identische Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Die Fab-Fragmente sind nach der Spaltung immer noch in der Lage, Antigen zu binden. Pepsin spaltet unterhalb der Disulfidbrücken, wodurch die „Hinge Region“ erhalten bleibt, und ein sogenanntes F(ab)₂-Fragment entsteht. Zusätzlich spaltet Pepsin das Fc-Fragment zwischen CH2 und CH3. (Loeb and Quimby, 1989).

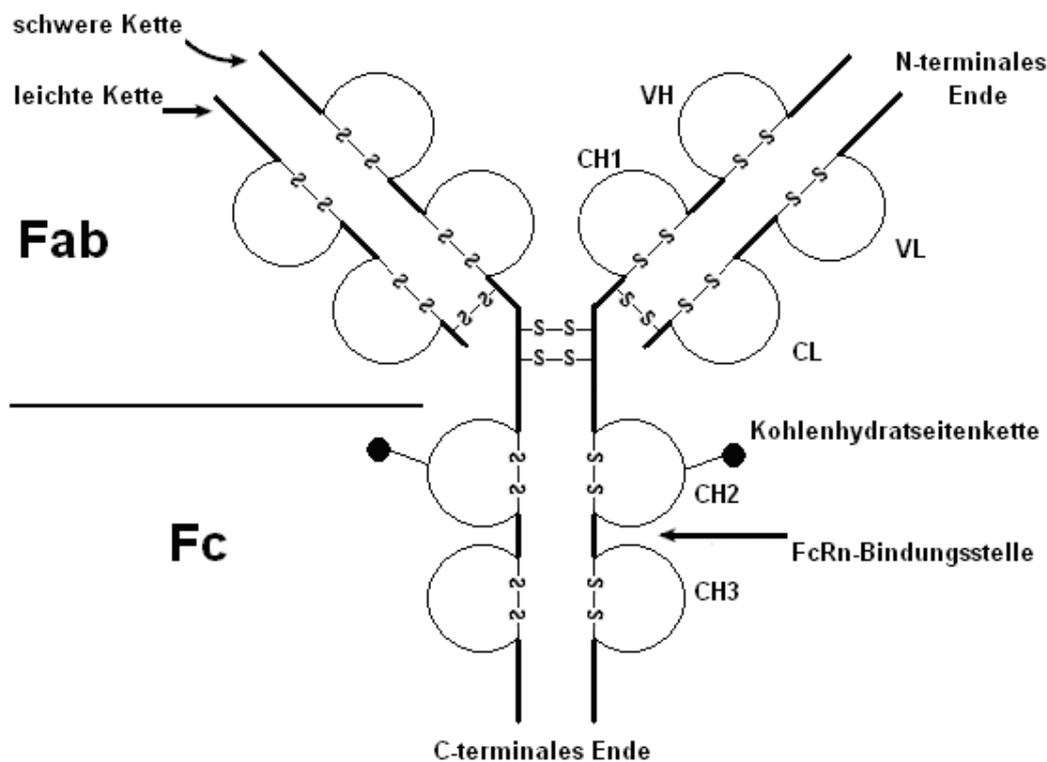


Abbildung 1: Schematische Struktur von IgG

IgG besteht aus zwei identischen schweren Ketten, die kovalent mit zwei leichten Ketten durch Disulfidbrücken (S-S) verbunden sind. Jede Kette besteht aus konstanten und variablen strukturellen Domänen. Die schweren Ketten bestehen aus drei Domänen (CH1, CH2, CH3) und einer variablen Domäne (VH). Die assoziierte leichte Kette besteht aus einer konstanten (CL) und einer variablen Domäne (VL). Die variable Domäne der schweren Kette (VH) und der leichten Kette (VL) besitzen je drei hypervariable Regionen (CDRs), die für die Antigenbindung verantwortlich sind. Mit Papain kann das Molekül über der „Hinge Region“ in zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment gespalten werden. Das Fc-Fragment ist in der Lage FcRn zu binden (Sesarman *et al.* 2010).

2.1.2 Therapeutische Antikörper

Viele klassische Pharmaka besitzen unspezifische Wirkungen auf gesunde Gewebe. Aus diesem Grund wird nach Substanzen gesucht, die gezielt kranke Gewebe oder krankheitsauslösende Agentien bekämpfen und gesunde Gewebe verschonen. Da Antikörper sehr selektiv für ihr Antigen sind, besteht die Hoffnung, dass monoklonale Antikörper dies leisten können. Zusätzlich werden therapeutische Antikörper oft gegen Antigene eingesetzt, die von kranken Geweben wie z.B. Tumoren überexprimiert werden.

Die ersten hochaffinen Antikörper, die für die Immuntherapie vorgesehen waren, wurden in Mäusen generiert. Große Quantitäten an individuellen, hochaffinen Antikörpern wurden das erste Mal verfügbar durch die Hybridomtechnologie (Kohler and Milstein, 1975). Bei dieser Technologie werden Antikörperproduzierende B-Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert, woraus unsterbliche Antikörperproduzierende Zellen entstehen, sogenannte Hybridome. Diese Hybridome können dann in Zellkultur vermehrt werden.

Exogene Proteine sind im Menschen immunogen. Therapeutische Antikörper stellen hier keine Ausnahme dar (Wang *et al.* 2008). Da sich die immunogenen Eigenschaften von Antikörpern auf den Fc-Teil konzentrieren, die Fab-Fragmente dagegen wenig immunogen sind, versucht man schon seit langem die Fc-Fragmente zu ersetzen (Jungi, 1996).

Ein weiterer Nachteil der Verwendung von murinen Antikörpern ist ihre niedrige Bindungsaffinität zum humanen Fc-Rezeptor neonatal (FcRn) (Ober *et al.* 2001) (genaue Beschreibung siehe Kapitel 2.2. Fc-Rezeptor neonatal). Dieser Umstand führt zu einer sehr geringen Halbwertszeit (1 – 2 Tage) von murinem IgG im Menschen (Goodman *et al.* 1985). Um die Einsatzmöglichkeiten in der Therapie zu verbessern, gibt es viele Versuche, Antikörper genetisch und chemisch zu modifizieren. Ziel dieser Ansätze ist es, monoklonale Antikörper aus nicht-humanen Spezies so zu verändern, dass sie im Menschen weniger immunogen sind und/oder sich ihre Serumhalbwertszeit verlängert.

Mitte der 1980er Jahre wurden zwei Methoden entwickelt, um dieses Problem zu lösen. Die sogenannte Chimerisierung (Neuberger *et al.* 1984) und die Humanisierung durch „CDR-grafting“ (Jones *et al.* 1986). Die Methoden werden im folgenden Text kurz beschrieben.

Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit des Kürzens von Antikörpern oder die Anlagerung diverser Substanzen und Gruppen. So spricht man z.B. bei der Anlagerung von Zuckern von Glykosilierung, bei der Anlagerung von Polyethylenglykol von Pegylierung (Mahmood and Green, 2005). Zu den kleinen Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten gehören z.B. Minibodies, Diabodies und Einzelstränge variabler Antikörperdomänen (Abb. 2) (Reff and Heard, 2001).

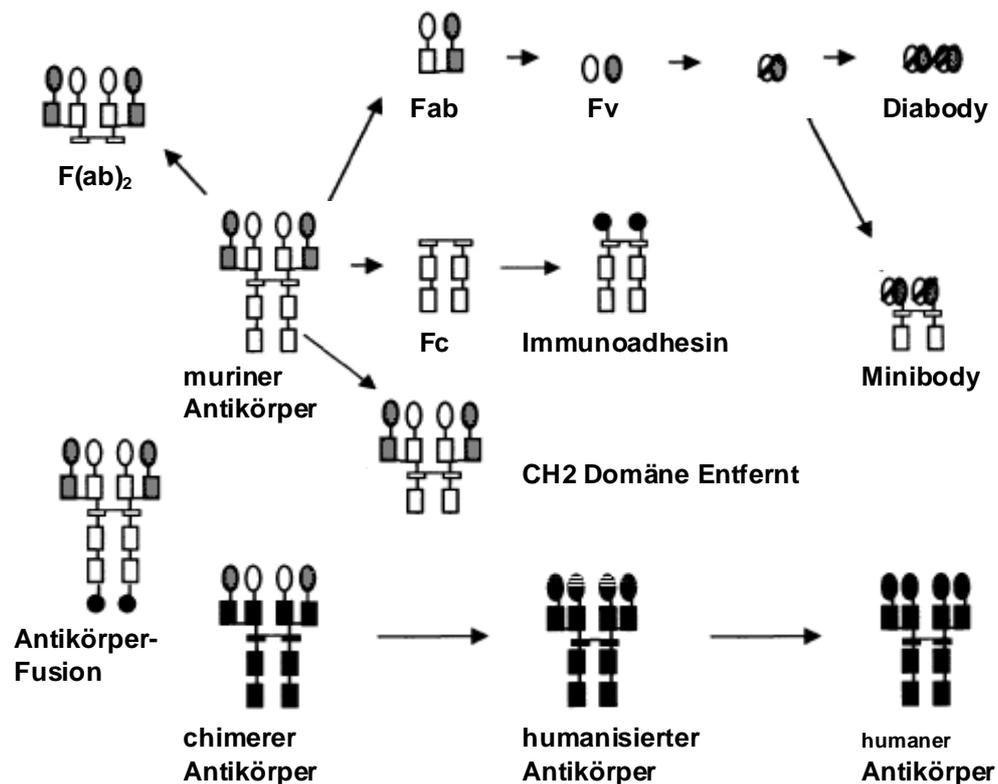


Abbildung 2: Formen modifizierter Antikörper und deren Fragmente

Durch verschiedenste Modifikationen wie z.B. enzymatische Spaltung oder Anlagerung diverser Gruppen entstehen aus tierischen Antikörpern (hier muriner Antikörper) Proteine, die in der Therapie und Diagnostik eingesetzt werden. Quelle: Reff and Heard, 2001

Therapeutische Antikörper werden nach ihrer Herkunft und Struktur in murine, chimere, humanisierte und humane Antikörper eingeteilt (Lobo *et al.* 2004). Ihre Halbwertszeit im menschlichen Blut steigt mit ihrem Grad an Humanisierung (Ternant and Paintaud, 2005): murin (1,5 Tage) < chimere (10 Tage) < humanisierte (12–20 Tage) < „voll“ humane (15-20 Tage).

Die ersten Hybridome produzierten rein murine Antikörper; dies schränkte ihren Einsatz in der Therapie erheblich ein. Wiederholte Applikationen am Menschen führen zur Bildung von humanen Anti-Maus-Antikörpern, sogenannten HAMAs (Schroff *et al.* 1985; Shawler *et al.* 1985; Khazaeli *et al.* 1994). Solche Immunreaktionen beeinflussen nicht nur die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper durch deren Neutralisation, sondern können auch zu ernsthaften Nebenwirkungen wie Hypersensibilität, Induktion der Serumkrankheit und anaphylaktischem Schock führen (Wagner *et al.* 2003).

Chimerisierung: Um die Antigenität zu senken, wurden chimere Antikörper kreiert, die aus variablen Regionen der Maus und humanen konstanten Regionen bestehen. Diese Antikörper sind zu ca. 75 % human und ca. 25 % murin (Morrison *et al.* 1984). Die humanen konstanten Regionen verleihen chimere Antikörpern pharmakokinetische Eigenschaften, ähnlich den humanen Antikörpern (d.h. lange Halbwertszeit in der Blutzirkulation, da sie von humanen Rezeptoren erkannt werden können) (Meredith *et al.* 1991). Unterschiedliche humane konstante Regionen können verwendet werden (Gamma 1, 2, 3, 4), um diverse Effektorfunktionen, wie z.B. eine erhöhte FcRn-Bindung, mit der gewünschten Anwendung zu verbinden (Reff and Heard, 2001). Trotz der Modifikationen können chimere Antikörper in immunkompetenten Patienten nicht mehrfach angewendet werden.

CDR-grafting: Um immunneutrale Antikörper zu generieren, wurden weitere Modifikationen entwickelt. Bei der Humanisierung durch „CDR-grafting“ werden nur die originalen „Complementarity-determining Regions“ (CDRs) und einige Schlüsselreste, die für die Antigenbindung verantwortlich sind, von murinen Antikörpern mit humanen Antikörpern gleicher Struktur kombiniert (Jones *et al.* 1986). Diese mehr menschlichen Moleküle werden besser toleriert. Die Gen-Sequenzen der hypervariablen Regionen werden im humanen Immunglobulin-Gen gegen die des murinen Immunglobulins ausgetauscht.

Eine neuere Entwicklung ist die Generierung transgener Mäuse (HuMab Mäuse), bei denen das murine IgG-Gen durch das humane IgG-Gen ersetzt wurde (Jakobovits, 1995). Diese Methode ermöglicht das Immunsystem solcher Mäuse mehrfach mit Antigenen zu stimulieren um vollhumane Antikörper zu erhalten.

Ähnliche hochaffine humane Antikörper werden in SCID-Mäusen (SCID steht für Severe Combined Immuno-Deficiency) generiert. In diese immundefizienten Mäuse werden stimulierte humane B-Lymphozyten aus Zellkulturen eingebracht und die Mäuse anschließend immunisiert, bis ein hoher Titer an Antikörpern erreicht wird (Chamat *et al.* 1999). Humane Antikörper können nun aus diesen B-Lymphozyten durch die Hybridom-Technik oder durch direkte Klonierung und Expression ihrer IgG-Gene generiert werden.

Um große Mengen humaner Antikörper zu produzieren werden Rinder eingesetzt, die ein artifizielles Chromosom tragen, das für humanes IgG kodiert. Das Chromosom enthält die Sequenz der humanen schweren IgG-Kette und der leichten IgG-Kette vom Lambda-Isotyp. Bei einer Immunisierung der Rinder werden sowohl humane wie auch chimere Antikörper gebildet, die dann aus dem Blut extrahiert werden können (Kuroiwa *et al.* 2009).

2.2 Fc-Rezeptor neonatal (FcRn)

2.2.1 Entdeckung und Benennung von FcRn

Brambell postulierte schon 1964 einen spezifischen Rezeptor, der für die IgG-Homöostase verantwortlich ist (Brambell *et al.* 1964). Gleichermaßen charakterisierte er den „Neonatal Gut Transport Receptor“, von ihm abgekürzt FcRn für „Fc-Rezeptor neonatal“, und bewies seine sättigbare Natur (Brambell, 1966). Dies wurde von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt (Waldmann and Strober, 1969; Jones and Waldmann, 1972). Der intestinale Rezeptor wurde von Simister und Kollegen kloniert und charakterisiert (Simister and Mostov, 1989; Israel *et al.* 1995). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor, der die IgG-Homöostase reguliert (Ghetie *et al.* 1996; Israel *et al.* 1996; Junghans and Anderson, 1996), derselbe ist, der für den IgG-Transport über den neonatalen Darm verantwortlich ist. Er nimmt während des gesamten Lebens verschiedenste Funktionen in Verbindung mit IgG wahr (siehe Kapitel 2.2.4 Vorkommen und Aufgaben von FcRn in Verbindung mit IgG). Obwohl bewiesen wurde, dass der Rezeptor nicht nur bei Neugeborenen vorkommt, hat sich aus historischen Gründen in seinem Namen das „n“ für neonatal erhalten. Da zu Beginn der Entdeckung von verschiedenen Rezeptoren ausgegangen wurde, findet man heute in der Literatur als Synonyme für FcRn auch FcRB, Fcgrt oder Brambell-Rezeptor (Reff and Heard, 2001; Tiwari and Junghans, 2005).

2.2.2 Struktur von FcRn

FcRn ist ein heterodimeres membranäres Glykoprotein (Abb. 3), das dem MHC I Molekül strukturell ähnlich ist (Simister and Mostov, 1989; Jones and Waldmann, 1972). Es besteht aus einer größeren membranverankerten schweren Kette und einer löslichen leichten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (Raghavan and Bjorkman, 1996). Das β_2 -Mikroglobulin kommt sowohl im FcRn als auch im MHC I vor (Raghavan and Bjorkman, 1996). Die schweren Ketten beider Moleküle bestehen aus drei extrazellulären Domänen (α_1 , α_2 , α_3), gefolgt von einer transmembranären Region und einer kurzen zytoplasmatischen Sequenz (Raghavan and Bjorkman, 1996; Simister and Mostov, 1989). Die Sequenzen der schweren Ketten sind nur ähnlich, α_1 und α_2 sind zu 22 - 30 % und α_3 ist zu 35 - 37 % gleich (Raghavan and Bjorkman, 1996; Simister and Mostov, 1989). Die transmembranären und zytoplasmatischen Regionen zeigen keine Übereinstimmungen (Raghavan and Bjorkman, 1996; Simister and Mostov, 1989). Die schwere Kette ist nichtkovalent mit β_2 -Mikroglobulin verbunden (Raghavan and Bjorkman, 1996; Simister and Mostov, 1989). Die α -Domänen sind die IgG-Bindungsdomänen (Raghavan and Bjorkman, 1996).

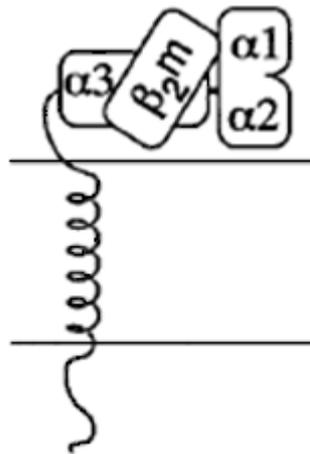


Abbildung 3: Schematische Struktur von FcRn

FcRn besteht aus einer membranverankerten Alpha-Kette, die nichtkovalent mit β_2 -Mikroglobulin (β_2m) verbunden ist. Der extrazelluläre Teil der Alpha-Kette teilt sich in 3 Domänen (α_1 , α_2 , α_3), ihnen folgt eine transmembranäre Region und eine kurze zytoplasmatische Sequenz. Quelle: Raghavan and Bjorkman, 1996

FcRn ist nicht nur mit MHC I verwandt, es gehört gleichzeitig zur Ig-Superfamilie. Mitglieder der Ig-Superfamilie sind definiert als Moleküle, die Domänen mit Sequenzähnlichkeit der variablen oder konstanten Domänen von Antikörpern besitzen (Williams and Barclay, 1988). Auf der Basis von Sequenz- und Struktur-Ähnlichkeiten werden Membrandomänen der Ig-Superfamilie in drei Gruppen eingeteilt: C1, C2 und V-like (Williams and Barclay, 1988).

Die C1-Gruppe beinhaltet konstante und topologisch äquivalente Antikörperdomänen (Williams and Barclay, 1988). FcRn ist der einzige Fc-Rezeptor, dessen Zugehörigkeit zur Ig-Superfamilie sich aus dem Besitz einer Domäne der C1-Gruppe ableitet. C2 und V-like sind übliche Bauteile von Zellosoziationsmolekülen (Wagner and Wyss, 1994; Vaughn and Bjorkman, 1996), diese sind strukturell anderen Fc-Rezeptoren ähnlich (Raghavan and Bjorkman, 1996).

2.2.3 Funktionsweise von FcRn

FcRn wird in allen epithelialen Zellen exprimiert (Ghetie and Ward, 2000). Hauptorte der FcRn-Wirkung sind Orte mit großer Kontaktfläche zu Blut wie z.B. das vaskuläre Endothel von Haut und Skelettmuskel (Borvak *et al.* 1998). Es wird angenommen, dass FcRn dort drei funktionelle Modi der Interaktion mit IgG besitzt (Akilesh *et al.* 2007):

1. FcRn transportiert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* IgG durch Transzytose über polarisierte epitheliale Zellverbände (Ghetie and Ward, 2002).
2. FcRn bindet pinozytotisch aufgenommenes IgG in sauren Endosomen und transportiert es zurück an die Zelloberfläche. Diese Funktion schützt IgG vor dem schnellen intrazellulären Abbau (Ward *et al.* 2003) und ist somit für die lange Halbwertszeit von IgG, wie auch für seine hohen Serumkonzentration verantwortlich (Roopenian *et al.* 2010) (Abb. 4).
3. FcRn fungiert als phagozytischer Rezeptor in neutrophilen Granulozyten (Vidarsson *et al.* 2006).

Das Hauptmerkmal des IgG-FcRn-Systems ist die strikte pH-Abhängigkeit der Ligandenbindung (Datta-Mannan *et al.* 2007b). Auch die Bindung mit Albumin (Chaudhury *et al.* 2003) und auf IgG-basierende therapeutische Antikörper ist pH-abhängig (Petkova *et al.* 2006). Die beiden Hauptliganden (IgG, Albumin)

binden in pH-abhängiger Weise, allerdings an unterschiedliche Bindungsstellen und konkurrieren somit nicht um diese (Kim *et al.* 2006). IgG bindet an FcRn über die Fc-Region bei pH 6,0 – 6,5; bei neutralem oder höherem pH findet keine Bindung statt (Raghavan and Bjorkman, 1996; Israel *et al.* 1995). Die Dissoziation des IgG-FcRn-Komplexes ist bei neutralem pH erleichtert. Diese pH-Abhängigkeit ist in allen Geweben gleich (Roberts *et al.* 1990) und schafft die Basis für den intrazellulären Transfer und das Recycling (Datta-Mannan *et al.* 2007b).

Ablauf des IgG- und Albumin-Recyclings durch FcRn (siehe auch Abb. 4): IgG und Albumin werden passiv durch Pinozytose in die Zelle aufgenommen (Brambell *et al.*, 1964; Chaudhury *et al.*, 2003; Ward and Ober, 2009). Danach werden sie in Endosomen transportiert (Junghans and Anderson, 1996). Im sauren Milieu der Endosomen dissoziiert gebundenes Antigen vom Antikörper; IgG und Albumin binden an FcRn (Raghavan and Bjorkman, 1996). Die Endosomen werden geteilt. Antikörper und Albumin, die an FcRn gebunden sind, werden an die Zelloberfläche transportiert, wo sie im neutralen pH der extrazellulären Flüssigkeit (z.B. Blut, Lymphe) vom FcRn abdissoziieren und so in die Zirkulation abgegeben werden (Raghavan and Bjorkman, 1996; Junghans and Anderson, 1996). Nach exozytotischer Fusion der Vesikel mit der Zellmembran wird FcRn schnell in die Zelle zurücktransportiert, wodurch ein geringer FcRn-Spiegel an der Plasmamembran aufrechterhalten wird (Ward and Ober, 2009).

Bei den meisten Zellen ist die FcRn-Expression an der Zelloberfläche gering (Ward and Ober, 2009). Solange es nicht benötigt wird, lagern die Zellen FcRn in ihren Endosomen (Petkova *et al.* 2006).

Moleküle, die nicht an FcRn binden können (z.B. Antikörper, Antigene, Serumproteine), werden mit endosomalem Inhalt zu Lysosomen geleitet, wo sie abgebaut werden. Wenn FcRn fehlt, werden Antigen und Antikörper zusammen lysosomal abgebaut (Junghans and Anderson, 1996).

Nur freies IgG und IgG in monomeren Immunkomplexen werden durch FcRn vor dem Abbau geschützt. IgG in großen multimeren Immunkomplexen wird schnell aus der Zirkulation entfernt und abgebaut (Qiao *et al.* 2008).

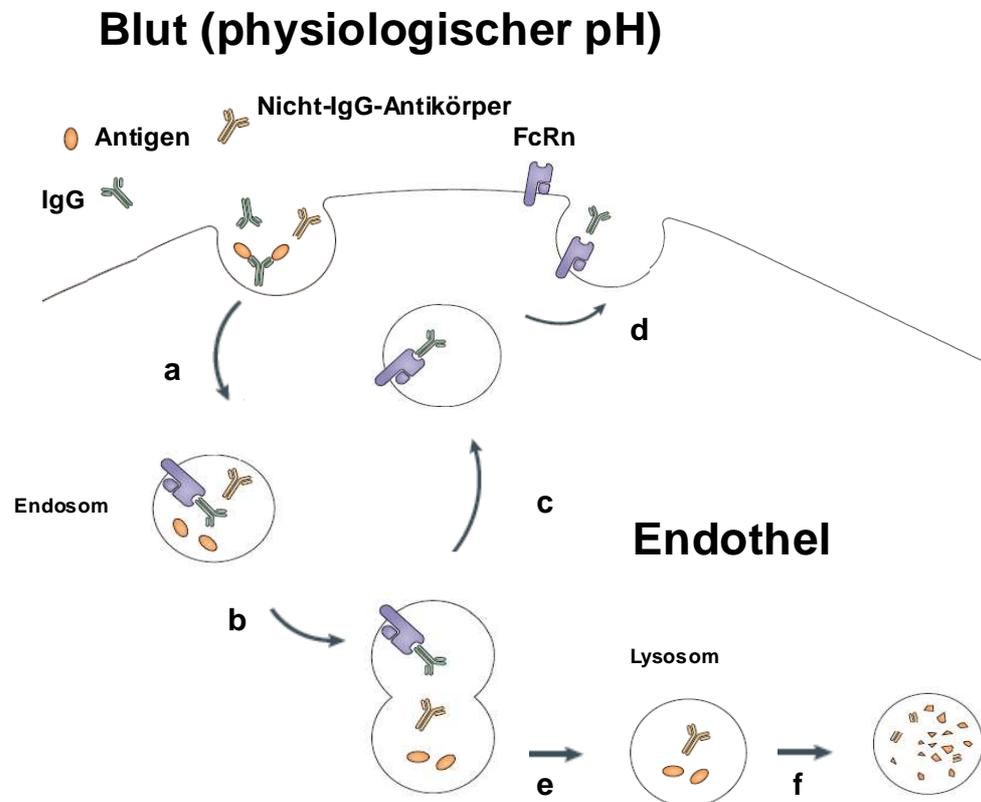


Abbildung 4: Mechanismus des IgG-Recyclings durch FcRn

- a) pinozytotisch aufgenommene Moleküle werden in saure Endosomen transportiert, Antigen dissoziiert vom Antikörper, IgG bindet an FcRn
- b) Teilung der Endosomen
- c) FcRn-gebundenes IgG wird an die Zelloberfläche transportiert
- d) IgG dissoziiert bei physiologischem pH vom FcRn ab
- e) Antigen und ungebundene Proteine werden in Lysosomen überführt
- f) lysosomaler Abbau

Quelle: modifiziert nach Roopenian and Akilesh, 2007

2.2.4 Vorkommen und Aufgaben von FcRn in Verbindung mit IgG

Die multiplen Aufgaben von FcRn hängen von seiner Fähigkeit ab, IgG und Albumin vor dem lysosomalen Abbau in Zellen zu schützen und die gebundenen Liganden durch Exozytose an der Plasmamembran wieder abzugeben (Ward and Ober, 2009). Gleichzeitig ist FcRn in der Lage, IgG innerhalb und über zelluläre Barrieren in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen zu transportieren (Ward and Ober, 2009; Roopenian and Akilesh, 2007).

FcRn-Orthologe wurden bei vielen Spezies isoliert, z.B. Maus, Ratte, Mensch, Schaf, Rind, Schwein, Kamel und Opossum (Simister and Mostov, 1989; Cervenak and Kacskovics, 2009; Ward and Ober, 2009). Dies lässt vermuten, dass FcRn in allen Säugetieren vorkommt. Auch in allen humanen epithelialen Geweben wird FcRn exprimiert (Ghetie and Ward, 2000).

Im Folgenden soll auf die wichtigsten Vorkommen und Aufgaben von FcRn in Verbindung mit IgG eingegangen werden.

2.2.4.1 Aufrechterhaltung des endogenen IgG-Spiegels

Hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung des endogenen IgG-Spiegels und somit für die lange Halbwertszeit von IgG sind endotheliale und hämatopoetische Zellen (Montoyo *et al.* 2009). Sie sind für die extrem langen Halbwertszeiten von IgG im Blut verantwortlich, da hauptsächlich in ihnen das FcRn-abhängige Recycling von IgG stattfindet. Die Halbwertszeit von IgG beträgt in der Maus 4,5 Tage, im Rhesusaffen 6,6 Tage und im Menschen 20-25 Tage (Loeb and Quimby, 1989). Eine Ausnahme stellt IgG3 dar, das im Menschen nur eine Halbwertszeit von 7 Tagen besitzt, ursächlich hierfür ist die geringe Affinität von IgG3 zu FcRn (Reff and Heard, 2001; Ternant and Paintaud, 2005). Die Halbwertszeit von Antikörpern, die nicht zum IgG-Typ gehören und kein Recycling durch FcRn erfahren, ist um das Zehnfache niedriger (Roopenian *et al.* 2010). Eine funktionelle Expression von FcRn im Endothel von Kapillaren wurde bei Mensch, Maus, Schwein und Rind nachgewiesen (Borvak *et al.* 1998; Cervenak and Kacskovics, 2009; Ghetie and Ward, 2002). Mäuse zeigen eine hohe Expression von FcRn im Endothel von Blutgefäßen der Haut, Muskel, Leber und Milz (Akilesh *et al.* 2007).

2.2.4.2 Antigenpräsentierende Zellen

FcRn wird in Zellen exprimiert, die dem Knochenmark entstammen und Antigen präsentieren. Hierzu gehören Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (Zhu *et al.* 2001) und B-Lymphozyten (Montoyo *et al.* 2009). Sie sind über die verschiedensten Gewebe verteilt (Akilesh *et al.* 2007). Zum einen sind auch sie an der IgG-Homöostase beteiligt (Akilesh *et al.* 2007), zum anderen liefert ihnen FcRn Antigen für die Präsentation (Ward and Ober, 2009).

2.2.4.3 IgG-Transport von der Mutter auf die Nachkommen

FcRn ist bei Säugetieren für den Transport von IgG von der Mutter auf die Nachkommen verantwortlich. Dies stattet die Nachkommen mit einer vorübergehenden humoralen Immunität aus, da ihr Immunsystem bei der Geburt noch nicht voll entwickelt ist. Dieser Transport zeigt speziesspezifische Unterschiede. Bei Primaten und Kaninchen wird das maternale IgG während der fetalen Periode über die Plazenta transportiert (Story *et al.* 1994; Simister, 2003). Bei Nagetieren wird das maternale IgG sowohl über den Dottersack als auch postnatal von der Milch über den neonatalen proximalen Dünndarm zum Fetus transportiert (Roberts *et al.* 1990; Simister and Rees, 1985). Bei Wiederkäuern wird IgG durch das Kolostrum in den ersten 12–18 Stunden nach der Geburt aufgenommen (Cervenak and Kacs Kovics, 2009).

Bei Nagetieren ist die intestinale Expression von FcRn auf die Säugeperiode beschränkt (Martin *et al.* 1997). Beim Menschen wird FcRn im fetalen Darm exprimiert, wo es an der IgG-Aufnahme aus der Amnionflüssigkeit beteiligt ist (Shah *et al.* 2003). Es wird aber auch in Enterozyten von Adulten exprimiert, wo es eine wichtige Rolle bei der intestinalen Immunkontrolle spielt (Yoshida *et al.* 2004; Dickinson *et al.* 1999).

2.2.4.4 Blut-Hirn-Schranke

FcRn wird im Endothel des Zentralnervensystems und der chorioidealen Plexus exprimiert (Schlachetzki *et al.* 2002).

Die Blut-Hirn-Schranke verhindert das Eindringen von IgG in das Interstitium des Zentralnervensystems und in die zerebrospinale Flüssigkeit. Diese Schranke kann zeitweise durch Entzündungsmediatoren wie den Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF α) durchlässig werden, z.B. bei bakteriellen Infektionen (Ballabh *et al.* 2004). Wird die Schranke durchlässig, flutet IgG im Gehirn aufgrund des Konzentrationsgefälles an. In solchen Fällen sorgt FcRn für einen aktiven Transport von IgG aus dem Gehirn in die Zirkulation (Roopenian and Akilesh, 2007). Es spielt somit eine wichtige Rolle bei der Limitierung von Entzündungen bei pathologischen Situationen des Zentralnervensystems.

2.2.4.5 Niere

Die Niere filtert das Blut und sorgt für die Ausscheidung von Produkten des Metabolismus. Um einen Verlust von Serumproteinen zu verhindern, besitzt die Niere einen gröÙenselektiven Filter. Es handelt sich hierbei um ein fenestriertes Endothel. Nur Moleküle mit einer Größe < 70 kDa werden in den Primärharn filtriert. Somit ist IgG mit einer ungefähren Masse von 150 kDa zu groß um den Filter zu passieren. IgG-Ablagerungen können allerdings den Filter verstopfen. Daher exprimieren die Podozyten des Glomerulums FcRn, um abgelagertes IgG durch Transzytose in den Primärharn zu transportieren (Haymann *et al.* 2000). Anschließend wird im proximalen Tubulus das IgG durch FcRn-vermittelte Transzytose aus dem Primärharn in die systemische Blut-Zirkulation zurücktransportiert (Kobayashi *et al.* 2002).

Fehlt Mäusen dieser Mechanismus aufgrund einer Blockade von FcRn führt dies zu einer seruminduzierten Nephritis (Ward and Ober, 2009).

2.3 Auswahl des Tiermodells

Präklinische Tests zur Beurteilung von Pharmakokinetiken und der Effektivität therapeutischer humaner Antikörper werden normalerweise in Mäusen durchgeführt (Ober *et al.* 2001). Konventionelle Nagetiermodelle spiegeln jedoch nicht die Pharmakokinetik humaner Antikörper im Primaten wider (Roopenian *et al.* 2010).

Da murines IgG schnell aus der humanen Zirkulation entfernt wird, humanes IgG aber lange in der Maus verweilt, kann daraus geschlossen werden, dass Mäuse nicht immer ein ideales Modell sind (Ober *et al.* 2001). Die rapide Elimination muriner Antikörper im Menschen wird der Unfähigkeit zur Bindung von murinem IgG an humanes FcRn zugeschrieben. Murines FcRn kann hingegen humanes IgG gut binden, was sich in einer langen Halbwertszeit von humanem IgG in der Maus widerspiegelt. Die Unfähigkeit von humanem FcRn zur Bindung von murinem IgG wurde in einem transgenen Mausmodell bestätigt, bei dem die Mäuse humanes FcRn exprimierten (Ober *et al.* 2001).

Murine monoklonale Antikörper besitzen nachteilige Eigenschaften, die ihren therapeutischen Einsatz limitieren (Ternant and Paintaud, 2005):

1. Sie besitzen im Menschen eine sehr kurze Halbwertszeit, was zu niedriger therapeutischer Effektivität führen kann, wenn eine lange Wirkung benötigt wird.
2. Murine Fc-Regionen aktivieren nur schlecht Effektorfunktionen, die von humanen Molekülen abhängen.
3. Sie induzieren eine Immunantwort, die die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von monoklonalen Antikörpern beeinflusst.

Die Interaktion zwischen FcRn und IgG unterscheidet sich bei Maus und Mensch hinsichtlich der Speziespezifität und der Bindungsaffinität. Die Interaktion von humanem und murinem FcRn mit IgG verschiedener Spezies wurde mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie von Ober und Kollegen untersucht (Ober *et al.* 2001). Hierbei konnte gezeigt werden, dass humanes FcRn sehr stringent in seiner Bindungsspezifität für IgG verschiedener Spezies ist: Humanes FcRn bindet nur IgG von Menschen, Kaninchen und Meerschweinchen; es zeigt keine signifikante Bindung zu IgG von Ratten, Rindern, Schafen, oder Mäusen

(mit Ausnahme einer schwachen Bindung zu murinem IgG2b). Im Gegensatz dazu ist murines FcRn nicht speziesspezifisch; es bindet IgG von allen getesteten Spezies, wie z.B. Mensch, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Rind, Schaf und Ratte (Ober *et al.* 2001). Eine unterschiedliche Glykosylierung von Nager- und Human-FcRn wird als Ursache für die speziesspezifischen Unterschiede vermutet (Kuo *et al.* 2009).

Diese Unterschiede in der Biologie von Nager- und Human-FcRn kann die Evaluierung von FcRn-abhängigen Pharmaka beeinflussen (Vaccaro *et al.* 2006). Dies hat Relevanz für die präklinische Analyse von humanen IgGs in murinen Modellen. Die Affinität von humanem IgG1 zu murinem FcRn ist um das Zehnfache höher als die vergleichbare Interaktion der humanen Partner (Zhou *et al.* 2005). Folge dieser hohen Affinität ist eine relativ lange Halbwertszeit von humanem IgG1 in Mäusen. Die hohe Affinität von modifizierten humanen IgGs, die in murinen Modellen getestet werden, kann daher zu Fehlinterpretationen führen.

Die Antikörperanalyse in nichthumanen Primaten (Dall'Acqua *et al.* 2006; Roopenian and Akilesh, 2007) oder das humane Plazenta Transfer Modell (Vaccaro *et al.* 2006) sind aussagekräftiger hinsichtlich der Halbwertszeiten im Menschen. Allerdings sind nichthumane Primaten aufgrund ethischer Bedenken und aufgrund ihrer hohen Kosten (Ward and Ober, 2009) für Routine-Screens ungeeignet (Roopenian *et al.* 2010).

Folglich besteht Bedarf an einem erprobten präklinischen Nagetiermodell, das die humane FcRn-Funktion adäquat nachahmt (Ward and Ober, 2009). Als Alternative stehen Mäuse zur Verfügung, denen murines FcRn fehlt und die aufgrund einer Transgenese humanes FcRn exprimieren (Chaudhury *et al.* 2003; Petkova *et al.* 2006). Auch Roopenian empfiehlt den Einsatz hFcRn transgener Mäuse. Er setzt bevorzugt heterozygote Mäuse der Linie B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr}Tg(FCGRT)276Dcr ein, um Unterschiede in der Halbwertszeit von Antikörpern nachzuweisen, und verwendet homozygote Tiere der Linie B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr}Tg(FCGRT)32Dcr, um verlängerte Halbwertszeiten modifizierter Antikörper zu zeigen. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Tiere ist, dass sie einen homogenen genetischen Hintergrund (C57BL/6J) besitzen, der das biologische „Hintergrundrauschen“, verursacht durch genetische Variation in gemischten Hintergründen, reduziert (Roopenian *et al.* 2010).

Auch das FcRn-transgene Maus-Modell unterliegt einigen Einschränkungen: Da humanes FcRn kein endogenes murines IgG binden kann, sind die Serum-IgG-Spiegel dieser Mäuse niedrig, vergleichbar mit FcRn defizienten Mäusen (Roopenian *et al.* 2003). Grund für die niedrigen Spiegel ist ein Hyperkatabolismus für IgG und eine schnellere IgG-Elimination in Mäusen, denen die genetische Expression von FcRn fehlt (Ghetie *et al.* 1996). Da die FcRn-Rezeptorsättigung durch das Fehlen von endogenem IgG reduziert ist, kann die Halbwertszeit rekombinanter humaner IgGs in diesen Mäusen gegenüber Tieren mit normaler Serum-IgG-Konzentrationen erhöht sein (Vaccaro *et al.* 2006). Die B-Lymphozyten bzw. B-Lymphozyten-Antwort dieser Mäuse sind allerdings normal (Ghetie *et al.*, 1996; Israel *et al.*, 1996; Junghans and Anderson, 1996; Roopenian *et al.*, 2003).

FcRn defiziente Mäuse scheinen eine gewisse Immundefizienz zu besitzen. Dies zeigt sich in einer erhöhten Anfälligkeit für bestimmte bakterielle Infektionen, wie z.B. *Citrobacter rodentium* und *Borrelia burgdorferi* (Qiao *et al.* 2008; Yoshida *et al.* 2006; Crowley *et al.* 2006).

Trotz dieser Limitationen ist das transgene Human-FcRn-Modell das am besten getestete System in kleinen Säugetieren für die initiale Beurteilung von FcRn-abhängigen Therapeutika und solchen, die humanes FcRn blockieren. Es sollte vor der pharmakokinetischen Beurteilung in Primaten und humanen Systemen eingesetzt werden (Roopenian *et al.* 2003; Roopenian and Akilesh, 2007; Petkova *et al.* 2006). Zusätzlich kann das Mausmodell für die Erforschung der Lokalisation der humanen FcRn-Expression eingesetzt werden (Roopenian *et al.* 2003; Petkova *et al.* 2006).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Mäuse

Bezeichnung	Lieferant
C57BL/6J	Charles River
B6.129X1-Fcgrt<tm1Dcr>/DcrJ	Jackson Laboratories
B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(FCGRT)276Dcr	Jackson Laboratories
B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(FCGRT)32Dcr	Jackson Laboratories

3.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Lieferant
Therapeutische Antikörper für Pharmakokinetik	
huMAb<P>	Roche
huMAb<A>	Roche
huMAb<I>	Roche
huMAb<E>	Roche
huMAb<C>	Roche
Antikörper für ELISA	
mAb<hFc _γ PAN>IgG-Bi	Roche
mAb<hFc _γ PAN>IgG-Dig	Roche
Anti-Digoxigenin-POD (poly), Fab fragments	Roche

3.1.3 Primer

Bezeichnung	Lieferant
o395 F 5'-GGA ATT CCC AGT GAA GGG C-3'	Metabion
o393 F 5'-GGG ATG CCA CTG CCC TG-3'	Metabion
o394 R 5'-CGA GCC TGA GAT TGT CAA GTG TAT T-3'	Metabion
huFcRn F 5'-AGC CAA GTC CTC CGT GCT C-3'	Metabion
huFcRn R 5'-CTC AGA GAT GCC AGT GTT CC-3'	Metabion

3.1.4 Technische Ausstattung

Bezeichnung	Lieferant
Kolbenhubpipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf
Elektrische Multipipetten (verschiedene Größen)	Matrix
Kühlschrank (Liebherr comfort)	Liebherr
Tiefkühlschrank (Liebherr premium, -20°C)	Liebherr
Tiefkühlschrank (6485, -50°C - -85°C)	GFL
Waage (sartorius universal)	Sartorius
Zentrifuge (Centrifuge 5810 R)	Eppendorf
Medizinisches Analysegerät (Olympus AU400)	Olympus
Reinstwasseranlage (Milli-Q)	Millipore
Geldokumentationssystem (AlphaImager 3400)	Biozym
Gelelektrophoresesystem (FlashGel System)	Lonza
Stromversorgung für Gelelektrophorese (GPS 200/400 Power Supply)	Pharmazia
Schüttler (MS1 Minishaker)	IKA
Schüttler (Thermomixer comfort)	Eppendorf
Photospektrometer (NanoDrop 1000)	Thermo Scientific
Thermo Cycler (PTC200)	MJ Research
Photometer für 96-Well-Platten (Sunrise)	Tecan
Mikrotiterplatten-Schüttler (Titramax 1000)	Heidolph
Mikrotiterplatten-Wäscher (ELx405)	BioTek
Veterinärdiagnostik Analysensystem (XT-2000iV)	Systemex

3.1.5 Spezielle Materialien für Zucht und Haltung von Mäusen

Bezeichnung	Lieferant
Nestbaumaterial aus Hanf	Ssniff
Kunststoffkäfig (Eurostandard Type III, 425 x 266 x 155 mm)	Tecniplast
Metallgitterdeckel (außenliegender Deckel mit Gitterseiten)	Tecniplast
Einstreu (autoklaviertes Weichholzgranulat, Lignocel)	Ssniff
Haus (Mouse Corner Home)	Datesand
Nageholz, Größe S	Abedd
autoklaviertes, pelletiertes Fertigfutter (Standard-Diät 3337.0.16 fortified)	Provimi Kliba
Tränkwasser	autoklaviertes Stadtwasser, Penzberg

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Lieferant
Einmalspritzen sterilisiert, pyrogenfrei, 1 ml	Dispomed
Einmal-Injektions-Kanülen, Ø 0,45 * 25 mm	Braun
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Eppendorf
Skalpellklinge	Bayha
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Eppendorf
Fussselfreie Tücher (Kim wipes)	Kimberley-Clark Corp.
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Falcon
Streptavidinbeschichtete 96-Well-Mikrotiterplatten	Roche
Unbeschichtete 96-Well-Mikrotiterplatten (Polypropylen)	Nunc
96-Well Mikrotiterplatten (Maxisorp microplates with flat bottoms)	Nunc
Hämatokrit-Kapillare (1,5 mm Durchmesser, 75 µl Inhalt)	Hirschmann Laborgeräte
Serum-Röhrchen (Microvette 500Z-Gel)	Sarstedt
Plasma-Röhrchen (Microvette 500 LH-Gel)	Sarstedt
EDTA-Röhrchen (Microvette K3E)	Sarstedt

3.1.7 Reagenzien, Chemikalien und Medikamente

Bezeichnung	Lieferant
Isofluran	CP-Pharma
Ethanol 100% p.a.	Roth
Destilliertes Wasser (steriles Wasser doppelt destilliert)	Roche
Master Mix (PCR Master)	Roche
FlashGel Loading Dye	Lonza
Größenstandard (FlashGel DNA Marker 100 bp – 4 kb)	Lonza
10xPBS (Premixed PBS Buffer, 10x)	Roche
ABTS (Solution, Ready-to-use ELISA Substrat)	Roche
Tween 20 (Tween 20, Aqueous solution 10%)	Roche
Albumin (RPLA 1, Assay quality)	Roche
gepooltes Maus-Serum (von C57BL/6J)	Charles River
gepooltes Maus-Plasma (von C57BL/6J)	Charles River
NaCl (NaCl zur Analyse)	Merk
Thymol p.a.	Roth
Standards für Sysmex XT-2000iV	
1-Check (XE) L1	Sysmex
1-Check (XE) L2	Sysmex
1-Check (XE) L3	Sysmex

3.1.8 Kits

Bezeichnung	Lieferant
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel
Mouse-IgG ELISA	Roche
Kits für Olympus AU400	
Harnstoff (OSR6134)	Olympus
Harnsäure (OSR6136)	Olympus
Kreatinin (OSR61204)	Olympus
Bilirubin total (OSR6112)	Olympus
Bilirubin direkt (OSR6111)	Olympus
Glukose (OSR6121)	Olympus
Cholesterin (OSR6116)	Olympus
Triglyceride (OSR6133)	Olympus
Freie Fettsäuren (NEFA HR)	Wako
High-density Lipoprotein (OSR6187)	Olympus
Low-density Lipoprotein (OSR6183)	Olympus
Alanin-Aminotransferase (OSR6107)	Olympus
Aspartat-Aminotransferase (OSR6109)	Olympus
Alkalische Phosphatase (OSR6104)	Olympus
α -Amylase (OSR6106)	Olympus
Laktatdehydrogenase (OSR6126)	Olympus
Lipase (OSR6130)	Olympus
Kreatinkinase (OSR6179)	Olympus
Transferrin (OSR6152)	Olympus
Ungesättigte Eisenbindungskapazität (OSR6124)	Olympus
Albumin (OSR6102)	Olympus
C-reaktives Protein (OSR6147)	Olympus
Gesamteiweiß (OSR6132)	Olympus
Eisen (OSR6186)	Olympus
Magnesium (OSR6189)	Olympus
Kalzium (OSR6176)	Olympus
Anorganisches Phosphat (OSR6122)	Olympus
Natrium (ISE = Ion Selective Electrode)	Olympus
Kalium (ISE)	Olympus
Chlorid (ISE)	Olympus

3.1.9 Software

Bezeichnung	Lieferant
Microsoft Office 2003	Microsoft
WinNonlin 5.3	Pharsight
XLfit4	IDBS
JMP 8	SAS

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse

Das Versuchsvorhaben war vom Regierungspräsidium Oberbayern unter der Bezeichnung „AZ 55.2-1-54-2531.2-36-01“ genehmigt. Es wurde mit den vier in Tabelle 3 aufgeführten Mauslinien gearbeitet.

Tabelle 3: Nomenklatur der Mauslinien

Wissenschaftlich korrekte Bezeichnung	Abkürzung
C57BL/6J	B6
B6.129X1-Fcgrt<tm1Dcr>/DcrJ	mFcRn -/-
B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(FCGRT)276Dcr (homozygot für das hFcRn-Gen) (heterozygot für das hFcRn-Gen)	hFcRn(276) Tg +/+ hFcRn(276) Tg +/-
B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(FCGRT)32Dcr (homozygot für das hFcRn-Gen) (heterozygot für das hFcRn-Gen)	hFcRn(32) Tg +/+ hFcRn(32) Tg +/-

Als Kontrolltiere (Wildtyp) wurden C57BL/6J, geliefert von Charles River, verwendet, da von diesem genetischen Hintergrund die anderen Linien generiert wurden. Für die Wachstumskurven, die Hämatologie und klinische Chemie wurden die Kontrolltiere bei Roche gezüchtet. Für die pharmakokinetischen Studien wurden 5 – 6 Wochen alte Tiere von Charles River bezogen.

Von allen genetischveränderten Linien wurden Zuchtpaare von Jackson Laboratories bezogen.

Bei der Linie B6.129X1-Fcgrt<tm1Dcr>/DcrJ handelt es sich um Mäuse, bei denen das Gen für die α -Kette des murinen FcRn inaktiviert wurde (Gen-Knock Out). Sie besitzen keine Expression des murinen FcRn. Eine Beschreibung der Linie findet sich unter Roopenian et al. 2003 und Roopenian et al. 2010.

Zur Generierung der Linien B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(FCGRT)276Dcr und B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(FCGRT)32Dcr wurde das Gen für den humanen FcRn auf Mäuse der Linie B6.129X1-Fcgrt<tm1Dcr>/DcrJ übertragen (Gen-Knock In). Beide humantransgenen Linien exprimieren kein murines FcRn, besitzen aber eine Expression des humanen FcRn. Die zwei humantransgenen Linien unterscheiden sich hinsichtlich der eingefügten Transgene.

In das Genom der Linie B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(FCGRT)276Dcr wurde ein cDNA-Konstrukt eingebracht, das für den humanen FcRn kodiert. Eine Beschreibung findet sich bei Chaudhury et al. 2003 und Roopenian et al. 2010.

Das Genom der Linie B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg(FCGRT)32Dcr enthält humane genomische DNA mit dem kompletten hFcRn-Gen und flankierende Sequenzen. Eine Beschreibung findet sich bei Petkova et al., 2006 und Roopenian et al., 2010.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im folgenden Text die in Tabelle 3 aufgeführten Abkürzungen für die Mauslinien verwendet.

Die Elimination von IgG ist direkt von der Affinität von IgG zu FcRn abhängig (Datta-Mannan *et al.* 2007b). Murines FcRn besitzt eine höhere Affinität zu humanem IgG als humanes FcRn (Ober *et al.* 2001). Zusätzlich ist die Elimination von der FcRn-Anzahl abhängig, die direkt vom FcRn-Expressionslevel abhängt. Die Linie mFcRn *-/-* besitzt kein FcRn, da bei ihr das FcRn-kodierende Gen zerstört wurde. Die Linie hFcRn(276) Tg besitzt weniger hFcRn Expression als die Linie hFcRn(32) Tg. Mäuse, die für das hFcRn-Gen heterozygot sind, besitzen nur die Hälfte der genetischen Information von homozygoten Tieren und somit auch weniger hFcRn (Roopenian *et al.* 2010).

Es ergeben sich bei den FcRn-modifizierten Linien hinsichtlich der hFcRn-Anzahl die folgenden Verhältnisse (Abb. 5): mFcRn *-/-* < hFcRn (276) Tg *+/-* < hFcRn (276) Tg *+/+* ≤ hFcRn (32) Tg *+/-* < hFcRn (32) Tg *+/+*

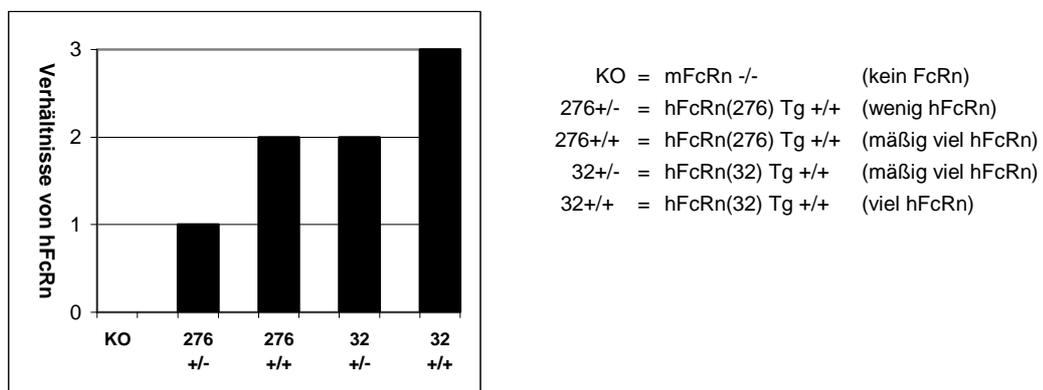


Abbildung 5: hFcRn-Anzahl der transgenen Mäuse

Es konnte keine Studie zur Rezeptoranzahl oder Gewebeverteilung von FcRn in den unterschiedlichen Mäusen gefunden werden. Die Rezeptoranzahl bzw. Verhältnisse werden immer nur durch berechnete pharmakokinetische Parameter wie z.B. Clearance oder Halbwertszeit abgeschätzt.

Da über die FcRn-Anzahl und die Gewebeverteilung bei den unterschiedlichen Mäusen keine Angaben vorliegen, ist es schwer, Mäuse mit murinem FcRn und Mäusen mit humanem FcRn, hinsichtlich IgG-Elimination, zu vergleichen. Grund hierfür ist, dass die Elimination ein Zusammenspiel aus Affinität (IgG zu FcRn) und FcRn-Anzahl ist.

3.2.1.1 Haltung

Die Mäuse wurden bei der Firma Roche Diagnostics GmbH in Penzberg im spezifisch pathogenfreien Bereich der Tierhaltung gemäß den Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) (Nicklas *et al.* 2002), der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) (Boehm *et al.* 2007a) und des Europäischen Parlaments und des Rates EU 86/609/EEC (European Union, 1986) gehalten und vermehrt.

Die Haltung und Zucht erfolgte unter konstanten klimatischen Bedingungen (Tab. 4). Ein bis fünf Mäuse wurden in Kunststoffkäfigen (Eurostandard Type III 425 mm x 266 mm x 155 mm) mit außenliegenden Metallgitterdeckeln gehalten. Die Käfige enthielten Einstreu, je ein Haus, ein Nageholz und die Zuchtkäfige zusätzlich Nistmaterial. Autoklaviertes pelletiertes Fertigfutter und Leitungswasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Tabelle 4: Klimatische Haltungsbedingungen

Temperatur	22 °C (20 -24 °C)
Luftfeuchte	55 % (45 – 70 %)
Luftwechselrate	15 -20 l/h
Tag/Nacht-Rhythmus	12h/12h

3.2.1.2 Zucht

Zum Aufbau der Zucht wurden 20 Paare C57BL/6J von Charles River und von den genetisch veränderten Linien je 6 Paare von Jackson Laboratories bezogen.

Die Tiere wurden im Alter von >50 Tagen zum ersten Mal verpaart, im Anschluss erfolgte die Verpaarung permanent monogam. Jungtiere wurden mit 18 bis 20 Tagen abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und bis zum Einsatz ins Experiment oder in die Zucht unter gleichen Bedingungen wie die Eltern gehalten.

Um Tiere zu erhalten, die homozygot für das mFcRn-Gen und heterozygot für das hFcRn-Gen waren, wurden Weibchen der Linie mFcRn $-/-$ mit Männchen der Linien hFcRn(32) Tg $+/+$ oder hFcRn(276) Tg $+/+$ verpaart. Nachkommen dieser Verpaarungen besitzen keinen mFcRn und eine geringere Expression von hFcRn als ihre homozygoten Väter.

3.2.2 Genotypisierung

Da sich die Mauslinien optisch nicht unterscheiden und eine genetische Kontamination ausgeschlossen werden musste, bedurfte es einer Methode die Linien sicher voneinander zu differenzieren. Genetische Kontaminationen können z.B. durch Mutationen, Verwechslungen oder fehlerhafte Kennzeichnung zustande kommen. Als Methode kam die Genotypisierung durch PCR in Verbindung mit Gelelektrophorese nach publizierten Verfahren zum Einsatz. Zur Unterscheidung wurde DNA der Mäuse aus Gewebeproben des Schwanzes isoliert, die relevanten Genabschnitte mittels PCR amplifiziert und zuletzt die DNA-Abschnitte mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Alle von Jackson Laboratories und Charles River gelieferten Zuchttiere wurden auf ihren Genotyp hinsichtlich des murinen FcRn-Gens und humanen FcRn-Gens untersucht. Von den Tieren für die Versuche wurden nur Stichproben untersucht, da der Arbeitsaufwand für eine Genotypisierung aller Tiere zu groß gewesen wäre.

3.2.2.1 Gewebeentnahme

Den Mäusen wurde unter Isofluran-Narkose ein ca. 2 mm langes Stück der Schwanzspitze mit einer sterilen Skalpellklinge abgeschnitten. Das Gewebestück wurde mit der gleichen Klinge zerkleinert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben lagerten bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C im Tiefkühlschrank.

3.2.2.2 Isolierung genomischer DNA

Zur DNA-Isolierung wurde der kommerziell erhältliche Kit „NucleoSpin Tissue“ nach Angaben des Herstellers Macherey-Nagel genutzt.

Vorbereitung: Alle Reagenzien wurden nach Herstellervorschrift angesetzt.

Prä-Lyse: Gewebeprobe (ca. 25 mg) mit 180 µl Buffer T1 und 25 µl Proteinase K mischen (für alle Mischschritte wurde ein Minishaker verwendet) und über Nacht bei 56°C im Schüttler (Thermomixer comfort) inkubieren.

Lyse: Probe mischen, 200 µl Buffer B3 zugeben, mischen und bei 70°C für 10 Minuten inkubieren, Probe mischen.

Einjustieren der DNA-Bindungskonditionen: Zur Probe 210 µl Ethanol 100 % zugeben und mischen.

DNA-Bindung: Für jede Probe eine Nucleo Spin Tissue Silikat-Säule in ein Sammelröhrchen geben. Proben auf je eine Säule geben und anschließend bei 11,000*g für 1 Minute zentrifugieren. Die abzentrifugierte Flüssigkeit verwerfen und die Säulen wieder in die Sammelröhrchen geben.

1. Waschen der Silika-Membran: 500 µl Buffer BW auf die Säule geben und dann 1 Minute bei 11,000*g zentrifugieren, Flüssigkeit verwerfen und Säulen zurück in die Sammelröhrchen geben.

2. Waschen der Silika-Membran: 600 µl Buffer B5 auf die Säule geben und dann 1 Minute bei 11,000*g zentrifugieren, Flüssigkeit verwerfen und Säulen zurück in die Sammelröhrchen geben.

Trocknen der Silika-Membran: Säulen in Sammelröhrchen 1 Minute bei 11,000*g zentrifugieren.

Eluieren der hochreinen DNA: Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße geben, 100 µl auf 70°C vorgewärmten Elution Buffer BE zugeben, bei Raumtemperatur 1 Minute inkubieren und anschließend 1 Minute bei 11,000*g zentrifugieren.

Probenlagerung: Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur quantitativen und qualitativen Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA wurde das Spektrophotometer-System „NanoDrop 1000“ der Firma Thermo Scientific genutzt. Alle Angaben zum Gerät und zur Messung stammen von Gallagher and Desjardins, 2008.

Mit diesem System ist es möglich sehr kleine Probenvolumina von 1 µl – 2 µl zu messen. Das Gerät kommt ohne Kapillaren oder Küvetten aus. Die Proben werden direkt auf eine Messfläche pipettiert, in die eine Glasfaseroptik einmündet. Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption bei 260 nm gemessen. Das Gerät berechnet automatisch mit der Formel: $c = A_{260} * Vf * F$ (A_{260} : optische Dichte bei 260 nm, Vf: Verdünnungsfaktor bei unverdünnten Proben = 1, F: Multiplikationsfaktor ist für doppelsträngige DNA = 50) die Konzentration der DNA. Zum Nachweis eventueller Verunreinigungen durch Proteine findet eine zweite Messung bei 280 nm statt. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} liegt für reine DNA bei 1,8 - 2,0 (Gallagher and Desjardins, 2008).

Durchführung:

1. Öffnen der NanoDrop Software und Auswahl des Modus „Nucleic Acid“
2. Initialisieren des Spektrophotometers mit 2 µl destilliertem Wasser
3. Reinigen der Messflächen mit einem sauberen fusselfreien Papiertuch
4. Einstellen des Nullwerts mit 2 µl destilliertem Wasser
5. Reinigen der Messflächen mit einem sauberen fusselfreien Papiertuch
6. Messung von 2 µl Probe
7. Reinigen der Messflächen mit einem sauberen fusselfreien Papiertuch
8. Arbeitsschritt 6. und 7. werden für jede Probe wiederholt
9. Nach Abschluss aller Messungen können die Ergebnisse ausgedruckt werden
10. Zuletzt werden die Messflächen mit destilliertem Wasser und einem sauberen fusselfreien Papiertuch gereinigt
11. Die DNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Nachweis mFcRn-Gen und mFcRn-Knock Out:

Die Sequenzen der folgenden Primer (Tab. 5) wurde genutzt, um Mäuse mit dem Ziel-Konstrukt (Mäuse bei denen das FcRn-Gen ausgeknockt wurde) und Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J) zu unterscheiden.

Tabelle 5: Primer zum Nachweis des mFcRn-Gens und mFcRn-Knock Outs

Abkürzung	Sequenz
o395 F	5'-GGA ATT CCC AGT GAA GGG C-3'
o393 F	5'-GGG ATG CCA CTG CCC TG-3'
o394 R	5'-CGA GCC TGA GAT TGT CAA GTG TAT T-3'

Die Kombination aus o395 F und o394 R bringt bei Tieren mit ausgeknocktem mFcRn-Gen (mFcRn *-/-*, hFcRn(276) Tg, hFcRn(32) Tg) ein 378 bp großes DNA-Fragment, beim Wildtyp (C57BL/6J) entsteht kein Fragment.

Die Kombination aus o393 F und o394 R bringt beim Wildtyp (C57BL/6J) ein 248 bp großes Fragment, bei den Linien mit mFcRn Knock Out entsteht kein Fragment (Roopenian *et al.* 2003).

Nachweis hFcRn-Knock In:

Die Sequenzen der folgenden Primer (Tab. 6) wurden genutzt, um das hFcRn-Gen nachzuweisen. Bei hFcRn(32) Tg wird ein 740 bp großes Fragment erwartet (Petkova *et al.* 2006), wohingegen bei hFcRn(276) Tg ein ca. 300 bp großes Fragment zu erwarten ist (Roopenian *et al.* 2010).

Tabelle 6: Primer zum Nachweis des hFcRn-Knock Ins

Abkürzung	Sequenz
huFcRn F	5'-AGC CAA GTC CTC CGT GCT C-3'
huFcRn R	5'-CTC AGA GAT GCC AGT GTT CC-3'

Reaktionsgemisch:

Vor dem Einbringen der DNA-Proben in das Reaktionsgemisch mussten sie mit destilliertem Wasser (steriles Wasser doppelt destilliert von Roche) so verdünnt werden, dass sie eine Konzentration von 10 - 30 ng/ μ l aufwiesen. Beim Master Mix handelte es sich um das kommerziell erhältliche Produkt „PCR Master“ der Firma Roche mit der Zusammensetzung: 25 U Taq DNA Polymerase in 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, Brij 35, 0,01 % (v/v), dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 0,4 mM), pH 8,3 bei 20 °C.

Das Reaktionsgemisch hatte bei allen PCR-Ansätzen die in Tabelle 7 aufgeführte Zusammensetzung.

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemischs

Volumen	
1 μ l	gelöste DNA (10 – 30 ng/ μ l)
1 μ l	Primer F
1 μ l	Primer R
22 μ l	H ₂ O (steriles Wasser doppelt destilliert von Roche)
25 μ l	Master Mix (PCR Master von Roche)

Amplifikation:

Nach dem Mischen wurden die Ansätze sofort im „Thermo Cycler“ prozessiert. Das folgende Thermo-Cycler-Programm wurde von Jackson Laboratories, nach Rücksprache, empfohlen.

Tabelle 8: Thermo-Cycler-Programm

Programmschritt	
1	initiale Denaturierung bei 95°C für 1 Minute
40 Zyklen:	
2	Denaturierung: 95°C für 15 Sekunden
3	Annealing: 60°C für 20 Sekunden
4	Extension: 70°C für 30 Sekunden
5	ein finaler Kühlungsschritt auf 4°C schloss sich an

3.2.2.5 Gelelektrophorese zum Nachweis der amplifizierten DNA

Zur Darstellung der in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurde das Gelelektrophoresesystem „FlashGel System“ der Firma Lonza genutzt. Als Stromversorgung für das System kam der „GPS 200/400 Power Supply“ der Firma Pharmazia zum Einsatz. Es wurden je 5 µl Probe mit 1 µl „FlashGel Loading Dye“ gemischt und auf ein Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde der „FlashGel DNA Marker 100 bp – 4 kb“ eingesetzt.

Die DNA wurde anschließend in einem Geldokumentationssystem mit ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert. Die Bilder konnten dann digital mit der Software „Microsoft Paint“ bearbeitet (Farben umkehren) werden.

3.2.2.6 Auswertung der Genotypisierung

Aufgrund der Größe und Kombinationen, der amplifizierten DNA-Fragmente, ist der Genotyp der meisten Verpaarungen eindeutig nachweisbar. Mit der Methode ist es allerdings nicht möglich zwischen homo- und heterozygoten hFcRn-transgenen Mäusen zu unterscheiden. Dies zeigen die schattierten Zeilen der Tabelle 9 an.

Tabelle 9: Auswertung der Genotypisierung

Verpaarung	amplifizierte DNA-Fragmente		
	mFcRn-Gen	Zielkonstrukt	hFcRn-Gen
B6 * B6	248 bp	-	-
KO * B6	248 bp	378 bp	-
KO * KO	-	378 bp	-
276 * B6	248 bp	378 bp	740 bp
276 * KO	-	378 bp	740 bp
276 * 276	-	378 bp	740 bp
276 * 32	-	378 bp	740 bp + 300 bp
32 * B6	248 bp	378 bp	300 bp
32 * KO	-	378 bp	300 bp
32 * 32	-	378 bp	300 bp

Nach Verpaarung der Mauslinien (B6 = C57BL/6J, KO = mFcRn $-/-$, 276 = hFcRn(276) Tg $+/+$, 32 = hFcRn(32) Tg $+/+$) ist bei Genotypisierung mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese mit den aufgeführten DNA-Fragmenten (Größe in Basenpaaren = bp) zu rechnen. Eine Unterscheidung zwischen homo- und heterozygoten hFcRn-transgenen Mäusen ist nicht möglich (schattierte Zeilen).

3.2.3 Phänotypisierung

3.2.3.1 Körperwachstum

Zur besseren phänotypischen Charakterisierung der einzelnen Mauslinien wurde von jeder Linie eine Wachstumskurve erstellt. Alle Tiere des Bestandes im Alter von 0 bis 100 Tagen wurden zu acht Zeitpunkten im Abstand von mehreren Wochen auf 0,1 g genau gewogen. Als Waage wurde eine Laborwaage der Firma Sartorius genutzt. Bei den Tieren im Alter bis 17 Tagen wurde nicht nach Geschlechtern getrennt, da die Geschlechtsbestimmung erst beim Absetzen der Jungtiere von den Müttern am 18. Lebenstag erfolgte. Nach dem 17. Lebenstag wurden die Wäageergebnisse nach Geschlechtern getrennt aufgenommen. Aus diesem Grund zeigen die Wachstumskurven von Tag 0 bis 17 gemischtgeschlechtliche Werte und ab Tag 18 können die Werte den Geschlechtern zugeordnet werden.

Alle Messergebnisse wurden in eine Microsoft-Excel-Tabelle übertragen und anschließend das arithmetische Mittel berechnet. Aus diesen Werten wurden Liniendiagramme zur besseren Veranschaulichung erstellt, die mit der Software „XLfit4“ angepasst wurden. Um das durchschnittliche Wachstum der Linien beurteilen zu können, wurde von jeder Gewichts-Zeit-Kurve die Fläche unter der Kurve im Zeitraum 0 – 100 Tage berechnet. Zusätzlich wurden die Ergebnisse unter Verwendung einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit mehrfacher Besetzung (ANOVA) auf ihre Unterschiede bzw. Signifikanz hin überprüft, wobei eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p) < 0,05 als statistisch signifikant festgelegt wurde. Für diese Kurvenanalyse wurden allerdings nur Zeitpunkte verwendet, von denen mindestens sechs Messergebnisse je Gruppe vorlagen.

3.2.3.2 Hämatologie und Klinische Chemie

Durch eine klinisch-chemische und hämatologische Phänotypisierung kann eine Vielzahl von Organfunktionen beurteilt werden. Sie ist daher ein unentbehrliches Instrument für die umfassende Charakterisierung von mutanten Mäusen. Sie erlaubt den Nachweis von hämatologischen Veränderungen, von Defekten an Organsystemen und von Veränderungen des Metabolismus sowie der Elektrolythomöostase. Geeignete labordiagnostische Verfahren erlauben die genaue und effiziente Untersuchung von erwarteten Effekten und zusätzlichen unerwarteten Konsequenzen von bestimmten genetischen Modifikationen, z.B. in Knockout-Mäusen mit bekannten phänotypischen Alterationen. Daher tragen genaue klinisch-chemische Untersuchungen zum Verständnis von Pathomechanismen in Mausmodellen und dem Verständnis der Systembiologie von komplexen Organismen bei (Gailus-Durner *et al.* 2009; Rathkolb *et al.* 2000). Dies ist außerdem wichtig, um in Versuchen die Wirkung des eingesetzten Pharmakons von Effekten der genetischen Manipulation unterscheiden zu können. Des Weiteren können unterschiedliche Konzentrationen an Metaboliten, Elektrolyten und Transportproteinen die Pharmakonwirkungen beeinflussen.

3.2.3.2.1 Probengewinnung

Das Blut wurde zwischen 9.00 und 11.00 Uhr gewonnen, indem der retrobulbäre Venenplexus von isoflurannarkotisierten Mäusen mit einer nichtheparinisierten Hämatokrit-Kapillare punktiert wurde. Nach maximalem Blutentzug wurden die Tiere sofort durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet.

Blut zur Serumgewinnung wurde in Serum-Röhrchen aufgefangen, 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach 3 Minuten bei 9300*g zentrifugiert. Hierbei war die Zentrifuge auf -4°C gekühlt. Nach der Zentrifugation wurde das Serum in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

EDTA-Blut wurde gewonnen, indem das Blut in EDTA-Röhrchen aufgefangen wurde. Jedes Gefäß musste sofort nach der Abnahme 20-mal invertiert werden, um eine gleichmäßige Verteilung des Antikoagulanzen zu gewährleisten. Bis zur Messung lagerten die Proben im Kühlschrank. Die Messungen für die Hämatologie fanden innerhalb von vier Stunden nach Blutentnahme statt.

3.2.3.2.2 Messung Hämatologie

Kurz vor der Messung mussten die blutgefüllten EDTA-Röhrchen mindestens 5-mal invertiert werden, um das sedimentierte Blut gleichmäßig zu mischen. Die Messungen erfolgten am Veterinärdiagnostik Analysensystem „XT-2000iV“ der Firma Sysmex. Die Ergebnisse wurden anschließend auf einen Computer übertragen und gespeichert. Als tägliche Qualitätskontrolle und Gerätekalibration kamen die drei Standards „I-Check (XE) L1“, „I-Check (XE) L2“ und „I-Check (XE) L3“ zum Einsatz. Der Hersteller wartet das Gerät in halbjährigem Rhythmus.

Es wurde Blut von 50 ± 3 Tage alten, gefütterten Tieren beiderlei Geschlechts jeder Mauslinie gemessen. Die Gruppengröße lag bei 22 – 26 Tieren. Die in Tabelle 10 aufgeführten hämatologischen Parameter wurden von jeder Maus bestimmt:

Tabelle 10: Hämatologische Parameter

Parameter	Abkürzung	Einheit
Leukozytenzahl	WBC	$10^3/\mu\text{l}$
Erythrozytenzahl	RBC	$10^6/\mu\text{l}$
Hämoglobin	HGB	g/dl
Hämatokrit	PCV	%
Retikulozyten	RETI	%
Thrombozytenzahl	PLT	$10^3/\mu\text{l}$
Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin Konzentration	MCHC	g/dl
Mittleres Korpuskuläres Volumen	MCV	fl
Mittleres Korpuskuläres Hämoglobin	MCH	pg
Durchschnittliches Thrombozytenvolumen	MPV	fl
Erythrozytenverteilungsbreite	RDW-SD	fl

3.2.3.2.3 Messung Klinische Chemie

Die meisten Parameter wurden am medizinischen Analysegerät „OlympusAU400“ der Firma Olympus gemessen. Ausgenommen war der endogene IgG-Spiegel der Mäuse, der mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit der Firma Roche Diagnostics GmbH bestimmt wurde.

Die Serumproben wurden kurz vor der Messung aufgetaut und gut durchmischt (MS1 Minishaker). Es wurde Serum von 50 ± 3 Tage alten, gefütterten Tieren beiderlei Geschlechts jeder Mauslinie gemessen. Für die Parameter, die am medizinischen Analysegerät gemessen wurden, lag die Gruppengröße bei 10 – 18 Tieren; im IgG-ELISA wurden 5 Tiere je Gruppe gemessen.

3.2.3.2.3.1 Messungen am Olympus AU400

Die Messungen der klinisch-chemischen Parameter am „Olympus AU400“ (Tab. 11) erfolgten im klinisch-chemischen Labor der Deutschen Mauslinik (GMC).

Ein limitierender Faktor bei klinisch-chemischen Messungen ist das Blutvolumen von Mäusen. Um alle Parameter an jeder Maus messen zu können, wurde ein Teil der Serumproben 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und diese Messwerte anschließend mit zwei multipliziert. Die Messtemperatur lag bei 37°C. Die Messwerte wurden anschließend auf einen Computer übertragen und gespeichert. Das Gerät wurde täglich kalibriert und halbjährlich vom Hersteller gewartet.

Tabelle 11: Klinisch-chemische Parameter

Parameter	Abkürzung	Einheit
Elektrolyte		
Natrium	Na ⁺	mmol/l
Kalium	K ⁺	mmol/l
Kalzium	Ca ⁺⁺	mmol/l
Eisen	Fe	µmol/l
Chlorid	Cl ⁻	mmol/l
anorganisches Phosphat	Phos	mmol/l
Proteine		
Gesamteiweiß	TP	g/l
Albumin	Alb	g/l
C-reaktives Protein	CRP	mg/l
Transferrin	TF	µmol/l
Transferrinsättigung	TS	%
Gesamte Eisenbindungskapazität	TIBC	µmol/l
Ungesättigte Eisenbindungskapazität	UIBC	µmol/l
Enzyme		
Alanin-Aminotransferase	ALT	U/l
Aspartat-Aminotransferase	AST	U/l
Alkalische Phosphatase	AP	U/l
α-Amylase	Amyl	U/l
Kreatinkinase	CK	U/l
Laktatdehydrogenase	LDH	U/l
Lipase	LP	U/l
Spezifische Substrate		
Glukose	Gluc	mmol/l
Cholesterin	Chol	mmol/l
Triglyceride	TG	mmol/l
Harnstoff	UREA	mmol/l
Harnsäure	HS	µmol/l
Freie Fettsäuren	NEFA	mmol/l
High-density Lipoprotein-Cholesterin	HDL	mmol/l
Low-density Lipoprotein-Cholesterin	LDL	mmol/l
Kreatinin	Crea	mmol/l
Bilirubin direkt	Bili d	µmol/l
Bilirubin total	Bili t	µmol/l

3.2.3.2.3.2 Maus-IgG ELISA

Zur quantitativen Bestimmung des endogenen murinen IgGs in Serumproben wurde der kommerziell erhältliche Kit „Mouse-IgG ELISA“ nach Angaben des Herstellers Roche genutzt.

Testprinzip:

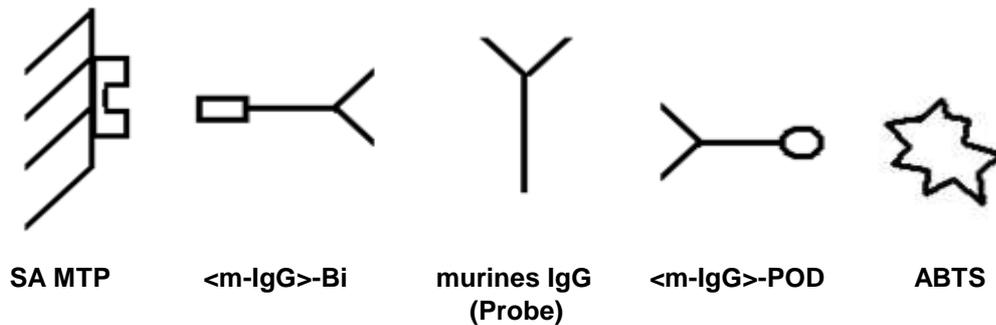


Abbildung 6: ELISA-Prinzip zum Nachweis von murinem IgG

Im ersten Schritt werden biotinierte (Bi) gegen murines IgG gerichtete Antikörper (<m-IgG-Bi>) an einer streptavidinbeschichteten (SA) Mikrotiterplatte (MTP) immobilisiert. Während der anschließenden Inkubation der Serumproben, die murines IgG enthalten, bindet das murine IgG an das immobilisierte <m-IgG-Bi>. Dieses murine IgG wird durch Antikörper (<m-IgG>-POD) gegen murines IgG, die mit Peroxidase (POD) verbunden sind und ABTS (ABTS: Diammonium- 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)) als Substrat nachgewiesen. Die dadurch entstehende Farbreaktion kann photometrisch gemessen und zur Quantifikation genutzt werden.

Durchführung:

Vorbereitung: Vor ihrem Einsatz müssen alle Lösungen und Puffer auf Raumtemperatur gebracht und nach Herstellerangabe vorbereitet werden.

Standardverdünnung: Der im Kit enthaltenen Standard ist in „Dilution Buffer (1x Blocking reagent)“ so zu verdünnen, dass Verdünnungen mit den folgenden Konzentrationen entstehen: 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ng/ml. Alle Standardkonzentrationen und Probenverdünnungen wurden doppelt hergestellt und doppelt gemessen.

Probenverdünnung: Von den Serumproben wurden 8 Verdünnungen in „Dilution Buffer (1x Blocking reagent)“ wie folgt hergestellt:

Proben, bei denen hohe IgG-Spiegel zu erwarten waren (d.h. Serumproben von C57BL/6J), wurden 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000, 1:320000, 1:640000, 1:1280000 verdünnt. Bei den Proben der transgenen Mäuse wurde mit 10-fach niedrigeren IgG-Spiegeln gerechnet, daher wurden sie nur 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000 verdünnt.

Beschichtung: 50 µl „Capture antibody solution“ in jedes Well der 96-Well Mikrotiterplatten (Maxisorp microplates with flat bottoms, Nunc) pipettieren. 45 Minuten bei Raumtemperatur schütteln. (Alle Schüttel-Schritte fanden auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei einer Geschwindigkeit von 700 rpm statt.)

Blockieren: 3-mal mit je 200 µl „Wash solution“ pro Well waschen (alle Wasch-Schritte wurden mit einem Mikrotiterplatten-Wäscher durchgeführt). 200 µl „Blocking reagent (1x)“ in jedes Well pipettieren. 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.

Proben aufrufen: 3-mal mit je 200 µl „Wash solution“ pro Well waschen. 50 µl Proben- oder Standardverdünnung in jedes Well pipettieren. 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.

Konjugieren: 3-mal mit je 200 µl „Wash solution“ pro Well waschen. 50 µl „Conjugate dilution“ in jedes Well pipettieren. 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.

Substratreaktion und photometrische Messung: 3-mal mit je 200 µl „Wash solution“ pro Well waschen. 50 µl „Substrat Solution“ in jedes Well pipettieren und schütteln. Die Intensität der Farbreaktion wurde mehrfach im Photometer (Wellenlänge für die Messung: 405 nm; Wellenlänge für den Referenzwert 492 nm) gemessen bis die optische Dichte (OD) des am höchsten konzentrierten Standards 2,0 betrug.

Berechnung: Die Standardwerte wurden genutzt um mit der Software „XLfit4“ unter Verwendung der Anpassung „Modified Rodbard model“ eine Standardkurve (Konzentration gegen optische Dichte) zu erstellen. Durch Vergleich der Probenmessungen mit der Standardkurve konnte dann auf die Probenkonzentrationen zurückgerechnet werden.

Parameter für die Akzeptanz des Tests: Die Standardkurve (Abb. 10) sollte aus mindestens 5 Werten bestehen, die auf einer Geraden liegen. Die Absorption des ersten Standards (0 ng/ml) sollte $< 0,1$ OD, die Absorption des höchsten Standards sollte $> 1,0$ OD sein. Zur Probenanalyse sollten mindestens zwei Verdünnungen je Probe im Bereich des linearen Teils der Standardkurve liegen.

3.2.3.2.4 Daten und Statistik

Alle Messergebnisse der klinischen Chemie und Hämatologie wurden in eine Microsoft-Excel-Tabelle übertragen. Extreme Werte unterzog man dem Ausreißertest nach Nalimov. Zeigte sich, dass es sich um Ausreißer handelte, wurden sie von allen weiteren Betrachtungen ausgeschlossen. Anschließend wurde das arithmetische Mittel (MW) und die Standardabweichung (SD) jedes Parameters berechnet. Aus den Mittelwerten \pm Standardabweichung wurden Säulendiagramme für die bessere Veranschaulichung erstellt. Alle Daten der Linien mFcRn -/-, hFcRn(276) Tg, und hFcRn(32) Tg wurden mit den Werten der Linie C57BL/6J verglichen. Zum Vergleich wurde die Software „JMP“ genutzt, als Signifikanztest wurde der „Tukey-Kramer honestly significant difference test“ modifiziert nach Hayter gewählt. Signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen und Tabellen wie folgt gekennzeichnet:

$$* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0,001.$$

Zusätzlich wurden die erhobenen Daten mit physiologischen Werten des Stamms C57BL/6 aus der Literatur verglichen. Die Vergleichswerte stammen aus den Quellen: Boehm et al. 2007b; Champy et al. 2008; Kile et al. 2003; Klempt et al. 2006; www.jaxmice.jax.org, 2007; www.taconic.com, 2004; Zhou and Hansson, 2004. Die Werte sind in den Tabellen 22 und 24 aufgeführt. Da die Messwerte von Methoden und Geräten abhängig sind, wurden in den Tabellen 23 und 25 die veröffentlichten Angaben der Vergleichswerte zusammengestellt

3.2.4 Pharmakokinetik therapeutischer Antikörper

3.2.4.1 Versuchstiere

Für die Versuche kamen 6 – 20 Mäuse je Linie, Geschlecht und Test-Antikörper zum Einsatz. Zu Versuchsbeginn hatten die Mäuse ein Alter von 5 – 10 Wochen. Die gelieferten C57BL/6J erhielten eine mindestens einwöchige Eingewöhnungszeit vor Versuchsbeginn. Bei den übrigen Linien war dies nicht notwendig, da sie aus eigener Zucht stammten. Die Tiere wurden mittels Zufallszahlen randomisiert (Keller, 1993) und auf die Versuchsgruppen verteilt. Zur Identifikation wurden die Tiere mit Ohrlöchern markiert (Donovan and Brown, 2006).

3.2.4.2 Auswahl der Test-Antikörper

Für die Pharmakokinetiken in Mäusen wurden fünf therapeutische Antikörper ausgewählt, die sehr unterschiedliche *in vitro* Bindungen an hFcRn aufweisen und/oder in Primaten (Mensch, Affe) verschiedene Pharmakokinetiken zeigten. Zusätzlich mussten Studiendaten von Affen- und/oder Probanden vorliegen. Alle Antikörper stammten aus der firmeninternen Fermentation der Roche Diagnostics GmbH und sind gegen unlösliche bzw. zellgebundene Antigene gerichtet. Aus Gründen der Schutzrechtswahrnehmung mussten die Antikörper anonymisiert werden. Zur Unterscheidung sind sie mit den Großbuchstaben P, A, I, E und C benannt. Die Abkürzung huMAb vor den Buchstaben steht für humanisierter bzw. humaner Antikörper. Die Humanisierung einiger Antikörper ist so weit fortgeschritten, dass sie als human angesehen werden können. Alle Angaben zu den Antikörpern stammen aus unveröffentlichten Roche-internen Dokumenten.

3.2.4.2.1 Antikörper huMAb<P>

huMAb<P> ist ein rekombinanter, humaner, monoklonaler Antikörper. Er gehört zur Antikörper-Subklasse IgG4 und bindet mit hoher Affinität und Selektivität sein Antigen. Er besitzt Kreuzreaktivität zum Antigen von *Macaca fascicularis*, aber nicht mit dem Antigen von Maus, Ratte, Meerschwein oder Kaninchen. Er zeigt im Primaten eine lange Halbwertszeit und bei der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie-Messung (SPR) (siehe Kapitel 3.2.4.6.3.1 Vergleichsdaten Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie) eine starke Bindung mit hFcRn. Im Affen und Menschen zeigt er keine durch das Zielantigen-vermittelte Medikamenten-Disposition (TMDD) (siehe Kapitel 5.3.4.2.1 Clearance).

3.2.4.2.2 Antikörper huMAb<A>

huMAb<A> ist ein rekombinanter, humaner, monoklonaler Antikörper der Immunglobulinsubklasse IgG1, der im Affen und Mensch eine lange Serumhalbwertszeit zeigt. Er besitzt im Affen und Mensch keine TMDD, da sein Antigen in gesunden Individuen nicht vorkommt. Bei der SPR zeigt er eine extrem starke Bindung an hFcRn.

3.2.4.2.3 Antikörper huMAb<I>

huMAb<I> ist ein rekombinanter, humaner, monoklonaler Antikörper der IgG1 Kappa-Subklasse. Bei diesem Antikörper wurden einzelne Lysine durch Alanin ausgetauscht (sog. LALA-Modifikation). Der Antikörper bindet mit hoher Affinität humanes Antigen und das von *Macaca fascicularis*. Er zeigt keine Kreuzreaktivität zum Antigen von Mäusen, Ratten, Hunden, Meerschweinchen und Kaninchen. Im Primaten zeigt er eine mäßig lange Halbwertszeit und bei Applikation niedriger Dosen eine TMDD. Die Bindung zu hFcRn ist in der SPR-Messung mittelmäßig bis gering.

3.2.4.2.4 Antikörper huMAb<E>

huMAb<E> ist ein rekombinanter, humanisierter, glykomodifizierter monoklonaler Antikörper der IgG1 Subklasse. Er wurde durch Humanisierung eines Ratten-Antikörpers erzeugt. Er zeigt hohe Bindungsaffinität zu seinem Antigen, diese zeigt sich auch durch hohe Werte in der SPR-Messung. Er ist kreuzreaktiv zum Antigen von *Macaca fascicularis*, seine Serumhalbwertszeit im Affen ist mittelmäßig und er besitzt im Primaten eine TMDD bei niedrigen Antikörperdosen.

3.2.4.2.5 Antikörper huMAb<C>

huMAb<C> ist ein rekombinanter, humanisierter und glykomodifizierter monoklonaler Antikörper der Subklasse IgG1. Er wurde durch Humanisierung eines Kaninchen-Antikörpers erzeugt, er bindet mit hoher Affinität und Selektivität an sein Antigen. Er zeigt Kreuzreaktivität zum Antigen von *Macaca fascicularis*, TMDD kann nur vermutet werden, da die Primaten ab Tag 9 eine Immunreaktion zeigen, und daher Daten ab Tag 9 nicht mehr zu beurteilen sind. Die Bindung zu hFcRn in der SPR-Messung ist mäßig bis gering.

Tabelle 12: Auswahlkriterien der therapeutischen Antikörper

huMAb	Humanisierungsgrad	Subklasse	TMDD	t _½	SPR	Modifikation
P	vollhuman	IgG4	-	+++	+++	-
A	vollhuman	IgG1	-	+++	+++	-
I	vollhuman	IgG1 Kappa	+	++	+	LALA
E	humanisierter Ratten-Ak.	IgG1	+	+	+++	glykomodifiziert
C	humanisierter Kaninchen-Ak.	IgG1	?	++	+	glykomodifiziert

TMDD: Zielantigen-vermittelte Medikamenten-Disposition

t_½: terminale Serumhalbwertszeit im Primaten

SPR: relative Bindung zu hFcRn

LALA: Lysine durch Alanin ausgetauscht

+++ groß, ++ mittel, + klein, - nicht vorhanden, ? vermutet

3.2.4.3 Behandlung

Die Mäuse erhielten eine intravenöse Einzeldosis der therapeutischen Antikörper über die Schwanzvene in einer Dosis von 2,5 bzw. 10 mg/kg, in einem Volumen von 10 ml/kg appliziert. Zur Applikation wurden sterile 1 ml Spritzen mit Einmal-Injektionskanülen (Ø 0,45 * 25 mm) verwendet. Die intravenöse Applikation wurde gewählt, um die Konditionen der klinischen Verabreichung zu simulieren. Die Dosen wurden gewählt, da hierzu Vergleichsdaten von *Macaca fascicularis* und/oder Menschen vorlagen.

3.2.4.4 Probengewinnung

Es fanden Blutentnahmen an folgenden Zeitpunkten statt: 0,5, 7, 24, 48, 96, 192, 216, 384, 432, 672, 936 Stunden nach Applikation. Zur Blutentnahme wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert. Die Blutproben wurden durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit einer Hämatokrit-Kapillare gewonnen, in Serum-Röhrchen bzw. Plasma-Röhrchen mit Lithium-Heparin-Beschichtung aufgefangen und nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugiert (3 Minuten bei 9300*g und -4°C). Je Blutentnahme wurden 75 µl Blut gewonnen. Das gewonnene Serum bzw. Plasma wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

Die limitierenden Faktoren der Analyse von murinen Blutproben sind zum einen das Volumen, das den Tieren maximal entzogen werden darf, und zum anderen die Häufigkeit der Blutentnahmen. Bei wiederholten Blutentnahmen sollte die wöchentlich entnommene Menge 7,5 % des Blutvolumens nicht überschreiten. An einer Maus sollte maximal 3-mal am retrobulbären Venenplexus Blut gewonnen werden (einmal rechtes Auge, einmal linkes Auge, finale Blutentnahme) (www.gv-solas.de, 2009).

Aus diesen tierschutzrechtlichen Gründen konnte nicht zu jedem Zeitpunkt des Blutentnahmeschemas von jeder Maus Blut gewonnen werden, um Einzel-tierkinetiken zu erstellen. Die Mäuse wurden in 2 – 4 Behandlungsgruppen aufgeteilt, und jede Gruppe wurde maximal dreimal geblutet. Zu Beginn der Studien kamen 4 Gruppen mit je 5 Tieren zum Einsatz. Aufgrund wachsender Erfahrung konnte im Verlauf der Studien durch Reduktion der Blutentnahmezeitpunkte die Anzahl der Gruppen auf zwei und die Tierzahl je Gruppe auf drei gesenkt werden. Nach der dritten Blutentnahme wurden die Tiere durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Ein exemplarisches Blutentnahmeschema ist in Abbildung 7 gezeigt.

Zeit nach Applikation (h) / (d)	Gruppe I					Gruppe II					Gruppe III					Gruppe IV				
	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5
0.5 / 0	X	X	X	X	X															
7 / 0						X	X	X	X	X										
24 / 1											X	X	X	X	X					
48 / 2																X	X	X	X	X
96 / 4											X	X	X	X	X					
192 / 8	X	X	X	X	X															
216 / 9						X	X	X	X	X										
384 / 16	X	X	X	X	X															
432 / 18						X	X	X	X	X										
672 / 28																X	X	X	X	X
936 / 39																X	X	X	X	X

Abbildung 7: Exemplarisches Blutentnahmeschema

Die Tiere wurden in 4 Gruppen (I - IV) zu je 5 Mäusen (M) eingeteilt und zu den mit X markierten Zeitpunkten nach Applikation geblutet.

3.2.4.5 ELISA zur Quantifikation humaner Antikörper in murinen Seren

Für die Analyse der Serumproben kam ein ELISA zum Einsatz, der den Fc-Teil humaner IgGs erkennt. Somit konnten alle Proben der pharmakokinetischen Studien mit dem gleichen Test gemessen werden.

3.2.4.5.1 Testprinzip

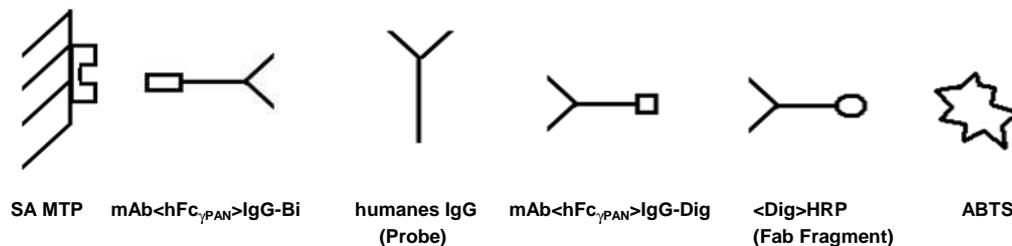


Abbildung 8: ELISA-Prinzip zum Nachweis von humanem IgG

Im ersten Schritt binden biotinylierte (Bi) monoklonale Antikörper gegen humanes Fc γ (mAb$\langle hFc_{\gamma PAN} \rangle IgG-Bi$) an eine streptavidinbeschichtete (SA) Mikrotiterplatte (MTP). Im zweiten Schritt inkubiert man das Probenmaterial und den Referenzstandard in der so vorbereiteten Mikrotiterplatte. Die enthaltenen humanen IgG-Antikörper binden an die zuvor immobilisierten mAb$\langle hFc_{\gamma PAN} \rangle IgG-Bi$-Antikörper. Anschließend gibt man digoxigenierte monoklonale Antikörper (mAb$\langle hFc_{\gamma PAN} \rangle IgG-Dig$) gegen humanes Fc γ zu, die dann ebenfalls mit den humanen IgG-Antikörpern reagieren. Im nächsten Schritt binden anti-Dig-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper-Fab-Fragmente an die gebundenen digoxigenierten Antikörper. Zuletzt wird ABTS-Lösung (ABTS: Diammonium- 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)) als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase zugegeben. Die dadurch entstehende Farbreaktion kann photometrisch bestimmt werden. Durch Vergleich der Farbintensität des Standards mit dem der Proben ist es möglich, auf deren human IgG-Konzentration zurückzurechnen.

3.2.4.5.2 Durchführung

Die Standards, Kontrollen und Proben wurden im Doppelsatz gemessen. Mengenangaben beziehen sich auf eine 96-Well-Platte auf der 5 Proben getestet werden können.

Vorbereitung: Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen. Puffer täglich frisch ansetzen (Tab. 13). Bei der Messung von Plasmaproben muss nur das gepoolte Mausserum im S1-Puffer durch gepooltes Mausplasma ausgetauscht werden.

Tabelle 13: Puffer für hIgG-ELISA

Abkürzung	
VP	Verdünnungspuffer 1xPBS/0,5% RPLA1 (0,2g RPLA1 + 4 ml 10xPBS + 36 ml deionisiertes Wasser)
S1	Verdünnungspuffer 1% Serum (bzw. Plasma) (100 µl gepooltes Mausserum + 9,9 ml VP)
WP	Waschpuffer 1xPBS/0,05% Tween 20 (0,2 ml Tween 20 + 40 ml 10xPBS + 360 ml deionisiertes Wasser)

Beschichtung: 1,1 µl mAb<hFc_γPAN>IgG-Bi (c = 7,44 mg/ml) mit 11 ml VP mischen und davon 100 µl in jedes Well der streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte pipettieren. Die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (500 rpm) inkubieren. Nach der Inkubation die Platte im Wäscher 3-mal mit 300 µl WP pro Well waschen.

Standard und Probenvorbereitung: Standard-Kalibrationskurve durch mehrfaches Verdünnen des entsprechenden Referenzstandards in S1 vorbereiten. Es werden Verdünnungen mit den Konzentrationen 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 ng/ml vorbereitet. Verdünnt wird in einer unbeschichteten 96-Well-Mikrotiterplatte.

Die so entstehenden Verdünnungen in die ersten 2 Spalten der beschichteten Mikrotiterplatte für die Standard-Kurven übertragen. In die untersten zwei Wells der ersten 2 Spalten reinen S1 Puffer pipettieren (Nullwert).

Proben aus Versuchen mit der Dosis 2,5 mg/kg zuerst 1 : 50 in S1 verdünnen. Proben aus Versuchen mit der Dosis 10 mg/kg zuerst 1 : 100 verdünnen. Im Anschluss alle Proben 8 mal 1 : 2 in S1 verdünnen.

Dadurch soll erreicht werden, dass beim späteren Messen mindestens 2 der Verdünnungen pro Probe im mittleren Bereich der Standardkurve liegen.

Auftragen der Proben: Je 100 µl der 1 : 2 Verdünnungen auf die vorbereitete Mikrotiterplatte übertragen (Plattenbelegung siehe Abb. 9). Die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (500 rpm) inkubieren. Nach der Inkubation die Platte im Wäscher 3-mal mit 300 µl WP pro Well waschen.

Standard	Probenverdünnungen											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	80 ng/ml											
B	40 ng/ml											
C	20 ng/ml											
D	10 ng/ml	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5						
E	5 ng/ml											
F	2,5 ng/ml											
G	1,25 ng/ml											
H	0 ng/ml											

Abbildung 9: Mikrotiterplattenbelegung

Erster Detektionsantikörper: 2 µl Antikörper-Stammlösung (mAb$hFc_{\gamma PAN}>IgG-Dig, c = 3,39 \text{ mg/ml}$) mit 18 µl S1 mischen, davon 2,1 µl mit 12 ml VP mischen. Es entsteht eine Verdünnung von $c = 0,06 \text{ µg/ml}$. Von dieser Antikörperlösung in jedes Well je 100 µl pipettieren. Die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (500 rpm) inkubieren. Nach der Inkubation die Platte im Wäscher 3-mal mit 300 µl WP pro Well waschen.

Zweiter Detektionsantikörper: 12 µl Antikörper-Stammlösung (Anti-Digoxigenin-POD (poly), Fab fragments, $c = 50 \text{ U/ml}$) mit 12 ml VP mischen. Es entsteht eine Verdünnung von $c = 50 \text{ mU/ml}$. Von dieser Antikörperlösung in jedes Well je 100 µl pipettieren. Die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (500 rpm) inkubieren. Nach der Inkubation die Platte im Wäscher 3-mal mit 300 µl WP pro Well waschen.

Substratreaktion und Messung: In jedes Well 100 µl ABTS-Lösung pipettieren. Die Platte wird auf einem vorgeheizten (38°C) Schüttler (500 rpm) inkubiert. Die Intensität der Farbreaktion wird mehrfach im Photometer (Wellenlänge für die Messung: 405 nm; Wellenlänge für den Referenzwert 492 nm) gemessen, bis die optische Dichte (OD) des am höchsten konzentrierten Standards 2,0 beträgt.

Berechnung: Aus den Standardwerten wurde mit der Anpassung „Modified Rodbard model“ von „XLfit4“ eine Standardkurve (typische Standardkurve siehe Abb. 10) erstellt. Durch Vergleich der Probenmesswerte mit der Standardkurve ist es dann möglich auf deren Konzentration zurückzurechnen.

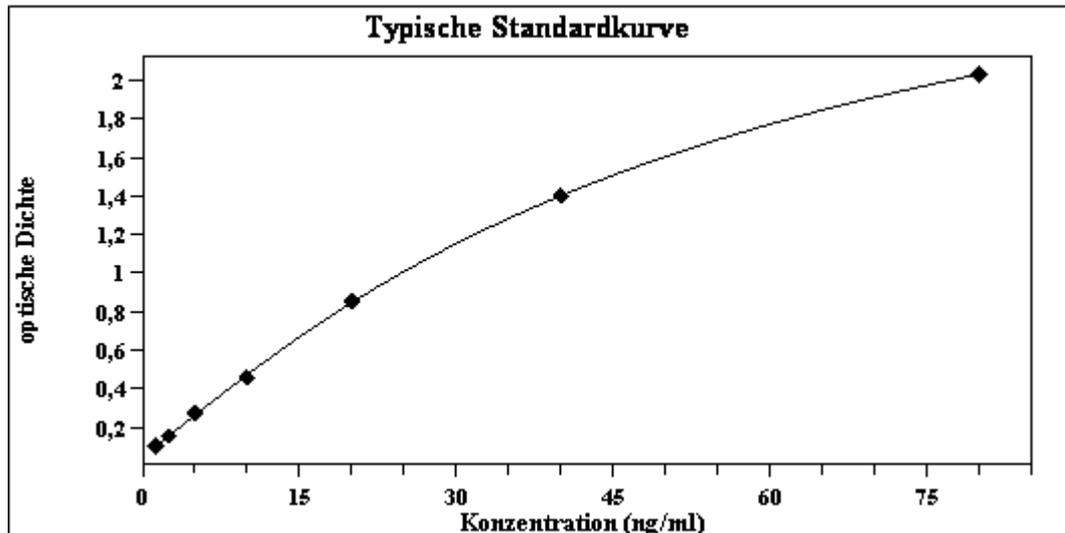


Abbildung 10: Typische ELISA-Standardkurve

Parameter für die Akzeptanz des Tests: Die Standardkurve sollte aus mindestens fünf Werten bestehen, die auf einer Geraden liegen. Die Absorption des ersten Standards (0 ng/ml) sollte $< 0,1$ OD, die Absorption des höchsten Standards sollte $> 1,0$ OD sein. Zur Probenanalyse sollten mindestens 2 Verdünnungen je Probe im Bereich des linearen Teils der Standardkurve liegen.

Reproduzierbarkeit (Präzision) und Sensitivität: In der rocheinternen Arbeitsvorschrift wird die Präzision mit $\pm 15\%$ angegeben. Die minimale Nachweisgrenze des Tests liegt bei 0,2 ng/ml.

3.2.4.6 Pharmakokinetische Parameter und Statistik

Für die meisten Pharmaka besteht eine Beziehung zwischen ihrer Konzentration am Wirkort und ihrer Wirkung. Da sich die Konzentration am Wirkort meist nicht messen lässt, ist man auf die Konzentrationsbestimmung im Blut angewiesen. Der zeitliche Verlauf der Konzentration eines Pharmakons im Organismus wird durch das Zusammenspiel von Resorption, Verteilung und Elimination bestimmt. Die wichtigen Parameter zur Beschreibung dieser Vorgänge sind Bioverfügbarkeit, Verteilungsvolumen, Clearance und Halbwertszeit (Forth *et al.* 2005). Auch die systemische Exposition mit einem Pharmakon stellt eine wichtige Größe dar; sie lässt sich durch die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve beschreiben.

3.2.4.6.1 Berechnung mit Softwareunterstützung

Die im ELISA gemessenen Serumkonzentrationen von 0,5 bis 672 Stunden wurden für die pharmakokinetische Evaluation genutzt. Für die Berechnungen wurde eine validierte Pharmakokinetik-Software eingesetzt. Es kam das Programm „WinNonlin 5.3“ der Firma Pharsight zum Einsatz. Als Grundlage für die Berechnung wurde ein Ein-Kompartiment-Modell (NCA Model 201 - IV-Bolus Input for Plasma Data) gewählt. Die gleiche Methode wurde auch von Ling et al., 2009 und Zalevsky et al., 2010 eingesetzt. Ein-Kompartiment-Modelle sind für die meisten Antikörper gut geeignet, da sie sich fast ausschließlich im zentralen Kompartiment aufhalten. Die Clearance, die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve im Zeitraum von 0 bis 672 Stunden, die terminale Halbwertszeit und das Verteilungsvolumen wurden berechnet.

Die kleine Gruppengröße von 3 – 5 Tieren lässt kaum statistisch signifikante Schlussfolgerungen zu. Daher wurde beim Vergleich der pharmakokinetischen Parameter nicht auf statistische Signifikanz getestet.

Zur Veranschaulichung wurden aus den gemessenen Serumkonzentrationen Mittelwerte berechnet und Liniendiagramme erstellt, die mit der Software „XLfit4“ angepasst wurden.

3.2.4.6.2 Vergleich von Verlaufskurven

Konzentrations-Zeit-Kurven von IgG können in zwei Phasen (Alpha und Beta) eingeteilt werden (Abb. 26). Zum Vergleich des Verlaufs solcher Kurven wurden die Ergebnisse unter Verwendung einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit mehrfacher Besetzung (ANOVA) auf ihre Unterschiede bzw. Signifikanz hin überprüft, wobei eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p) < 0,05 als statistisch signifikant festgelegt wurde.

3.2.4.6.3 Vergleichsdaten

Daten aus Versuchen mit FcRn-modifizierten Mäusen und deren Kontrollen sollten mit Bindungsdaten aus Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie-Messungen und pharmakokinetischen Daten aus Versuchen mit *Macaca fascicularis* und menschlichen Probanden verglichen werden. Alle Vergleichsdaten wurden von internen Arbeitsgruppen der Firma Roche Diagnostics GmbH zur Verfügung gestellt und sind zurzeit unveröffentlicht.

3.2.4.6.3.1 Vergleichsdaten der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Bei der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, im Englischen Surface Plasmon Resonance (SPR) genannt, handelt es sich um eine spektroskopische Methode zur Messung von Schichtdicken und dielektrischen Eigenschaften dünner Filme. Das Messprinzip beruht darauf, dass unter den Bedingungen der Totalreflektion ein polarisierter Lichtstrahl ein Oberflächenplasmon innerhalb eines Metallfilms (z.B. Gold) erzeugt. Diese Absorption innerhalb des Metallfilmes reduziert die Intensität des reflektierten Lichtes. Ändert sich der Brechungsindex in unmittelbarer Nähe der Oberfläche (z.B. durch Bindung von Molekülen), ändert sich auch der Winkel, unter dem dieses Minimum zu beobachten ist. Dies ermöglicht somit eine Echtzeitmessung einer Wechselwirkung von einem löslichen Interaktionspartner (Analyt) mit einem immobilisierten Interaktionspartner (Ligand). Schon einschichtige Lagen eines Moleküls reichen aus, um eine nachweisbare Veränderung der Plasmonwellenlänge hervorzurufen (Nuster *et al.* 2007; www.biocore.com, 2010).

Das Verfahren kann eingesetzt werden, um *in vitro* die Rezeptor-Liganden-Bindung zu quantifizieren. Als Messgerät für die Vergleichsdaten kam ein „BIAcore 3000“ der Firma Biacore Inc. zum Einsatz. Nach der Aktivierung einer Carboxymethyl-dextranoberfläche (CM5 Chip von GE Healthcare) über EDC/NHS (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid Hydrochlorid/N-hydroxysuccinimid) wurde humanes FcRn ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) unspezifisch und kovalent mit der Matrix eines Chips verknüpft (FcRn-Dichte auf 400 RU eingestellt). Die therapeutischen Antikörper waren in Puffern mit pH 6,0 gelöst und wurden in einer Konzentration von 200 nM über die Chipoberfläche geleitet. Die Messtemperatur betrug 25°C . Binden die Antikörper nun an FcRn, kommt es zu einer Signalerhöhung (RU_{max}), von der das Signal einer Referenzmessung abgezogen wird; es ergibt sich die apparente Assoziationskonstante (k_a gemessen in „relative Response Units“ = RU). Bei der Referenzmessung wird anstelle des Antikörpers nur Puffer injiziert. Dissoziieren die Antikörper vom FcRn kommt es zu einer Signalniedrigung, der sogenannten apparenten Dissoziationskonstante (k_d), die in Form einer Halbwertszeit ausgedrückt wird. Die Gleichgewichtskonstante (K_D) ist ein Maß für die Affinität der Bindungspartner; sie berechnet sich aus k_d/k_a . Die Dissoziationskonstante beschreibt die Komplexstabilität der Bindung. Eine typische Kurve einer SPR-Messung ist in Abbildung 11 gezeigt.

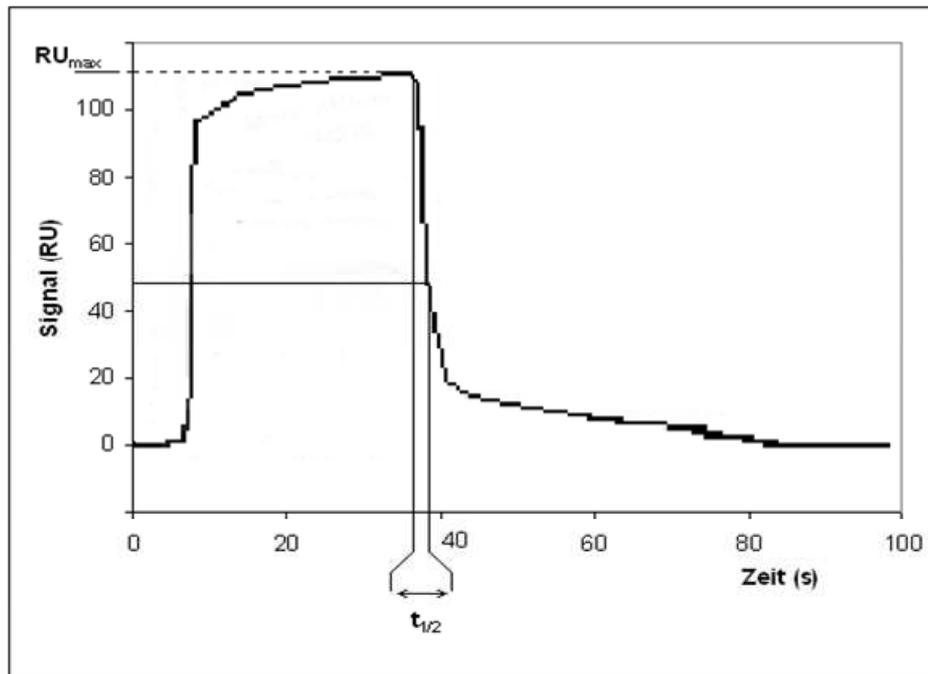


Abbildung 11: Schematische Kurve einer SPR-Messung

RU_{\max} stellt das Maß für die apparente Assoziationskonstante (k_a) und $t_{1/2}$ das Maß für die apparente Dissoziationskonstante (k_d) dar.

In der Literatur finden sich Beschreibungen, dass zwischen SPR-Messungen und pharmakokinetischen Parametern ein Zusammenhang besteht. Unklar ist allerdings, welcher Bindungsparameter mit der Halbwertszeit bzw. Clearance vergleichbar ist (Kim *et al.* 1994; Ghetie *et al.* 1997; Medesan *et al.* 1998; Hinton *et al.* 2004; Hinton *et al.* 2006). Andere Arbeitsgruppen konnten keine Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Daten feststellen (Datta-Mannan *et al.* 2007a; Datta-Mannan *et al.* 2007a; Datta-Mannan *et al.* 2007b; Yeung *et al.* 2009). Der Vergleich publizierter Daten wird dadurch erschwert, dass jede Arbeitsgruppe mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen (pH, Temperatur Antikörper- und FcRn-Konzentration usw.) arbeitet und keine standardisierten Rechenparameter existieren.

Aufgrund der Uneinigkeit in der Literatur wurde in dieser Arbeit die Clearance mit der apparenten Dissoziationskonstante (k_d) und die Halbwertszeit mit der apparente Assoziationskonstante (k_a) sowie der Gleichgewichtskonstante (K_D) korreliert. Diese Kombinationen könnten einen kausalen Zusammenhang besitzen. Als pharmakokinetische Daten von Mäusen (*in vivo*) wurden die Ergebnisse der fünf verwendeten Antikörper nach Applikation von 10 mg/kg genutzt.

Um zu klären, wie stark der statistische Zusammenhang ist, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt und der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) berechnet. Als schwache Korrelation gilt $r = 0,2 - 0,49$, als mittelstarke Korrelation gilt $r = 0,5 - 0,75$ und als starke Korrelation gilt $r > 0,74$ (Keller, 1993).

Tabelle 14: Vergleichsdaten Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Antikörper	k_a (RU)	k_d ($t_{1/2}$ in s)	K_D (k_d/k_a)
huMAb<P>	40,021	10,328	0,26
huMAb<A>	390,000	31,167	0,08
huMAb<I>	43,912	12,978	0,30
huMAb<E>	93,309	12,118	0,13
huMAb<C>	56,325	16,285	0,29

3.2.4.6.3.2 Pharmakokinetische Vergleichsdaten von Primaten

Als Vergleichsdaten von Affen und Menschen standen Serum- bzw. Plasma-Einzelwerte aus ELISA-Messungen pharmakokinetischer Versuche zur Verfügung. Die Daten wurden auf die gleiche Weise wie die Mausdaten mit „WinNonlin 5.3“ ausgewertet. Die berechneten pharmakokinetischen Parameter sind in den Tabellen 26 – 32 gezeigt.

Bei den nichthumanen Primaten handelte es sich um männliche Tiere der Spezies *Macaca fascicularis* (Synonyme: Javaneraffe, Langschwanzmakak, Cynomolgus Monkey). Sie waren zum Zeitpunkt der Versuche 7 – 11 Jahre alt; die Gruppengröße lag bei 2 – 4 Tieren. Die Antikörper wurden intravenös in Einzeldosen von 2,5 bzw. 10 mg/kg verabreicht. Blut wurde an der *Vena brachialis* gewonnen. Bei den Versuchen mit huMAb<P> und huMAb<A> wurde aus dem Blut Plasma, bei huMAb<I> huMAb<E> und huMAb<C> Serum gewonnen.

Für den Antikörper huMAb<P> stehen zusätzlich auch Vergleichswerte von menschlichen Probanden zur Verfügung. Den 6 Probanden im Alter von 18 - 65 Jahren beiderlei Geschlechts wurde je eine Einzeldosis von 10 mg/kg intravenös über 2 Stunden infundiert. Das Blut wurde aus der *Vena brachialis* entnommen und anschließend Serum gewonnen. Von huMAb<I> stehen nur die AUC_{0-inf} und die $t_{1/2}$ zum Vergleich zur Verfügung. Bei dieser Versuchsreihe wurde den 5 Probanden 10 mg/kg in 2 Stunden infundiert und im Anschluss Serum gewonnen.

4 ERGEBNISSE

Der Ergebnisteil gliedert sich in drei Abschnitte:

1. Genotypisierung der Mauslinien
2. Phänotypisierung hinsichtlich Körperwachstum, Hämatologie und klinischer Chemie
3. Pharmakokinetik der therapeutischen Antikörper

4.1 Genotypisierung

Um den Genotyp der gelieferten Tiere feststellen zu können und um Verwechslungen vorzubeugen, wurde den gelieferten Zuchttieren und einigen Versuchstieren Gewebeprobe entnommen, und diese auf das Vorhandensein des mFcRn-Gens und hFcRn-Gens untersucht. Zum Nachweis des jeweiligen Genotyps kamen PCR in Verbindung mit Gelelektrophorese nach publizierten Verfahren zum Einsatz.

4.1.1 Nachweis mFcRn-Gen

Die Kombination aus den Primern o393 F und o394 R bringt bei Tieren mit intaktem mFcRn-Gen (Wildtyp = C57BL/6J) ein DNA-Fragment zwischen 200 und 300 bp. Dies entspricht der Erwartung, da laut Literatur (Roopenian *et al.* 2003) ein 248 bp großes Fragment entstehen soll. Bei Tieren, die ein durch das Ziel-Konstrukt zerstörtes mFcRn-Gen besitzen (Mauslinien mit mFcRn Knockout), entsteht kein Fragment (Abb. 12A).

4.1.2 Nachweis mFcRn-Knock Out

Die Primerkombination o395 F und o394 R weist das Ziel-Konstrukt nach. Bei Tieren mit zerstörtem mFcRn-Gen (mFcRn $-/-$, hFcRn(32) Tg, hFcRn(276) Tg) soll ein 378 bp großes DNA-Fragment entstehen (Roopenian *et al.* 2003). Wie publiziert zeigt sich bei Mäusen mit zerstörtem mFcRn-Gen ein 300 – 500 bp großes DNA-Fragment, beim Wildtyp (C57BL/6J) entsteht kein Fragment (Abb. 12B).

4.1.3 Nachweis hFcRn-Knock In

Die Primer huFcRn F und huFcRn R wurden genutzt um die transgenen DNA-Abschnitte, die das hFcRn-Gen beinhalten, nachzuweisen. Bei Linie hFcRn(32) Tg soll ein 740 bp großes DNA-Fragment (Petkova *et al.* 2006) und bei Linie hFcRn(276) Tg ein ca. 300 bp großes Fragment (Roopenian *et al.* 2010) entstehen. Wie erwartet, konnte bei Linie hFcRn(32) Tg ein 500 – 800 bp großes Fragment und bei Linie hFcRn(276) Tg ein ca. 300 bp großes Fragment nachgewiesen werden; die Linien ohne hFcRn-Transgen (C57BL/6J und mFcRn -/-) zeigen kein DNA-Fragment (Abb. 12C).

Aufgrund der Größen, der amplifizierten DNA-Fragmente, die das hFcRn-Gen beinhalten (740 bp ↔ 300 bp), kann zwischen Linie hFcRn(276) Tg und hFcRn(32) Tg unterschieden werden. Mit der Methode ist es allerdings nicht möglich zwischen homo- und heterozygoten hFcRn-transgenen Mäusen zu unterscheiden.

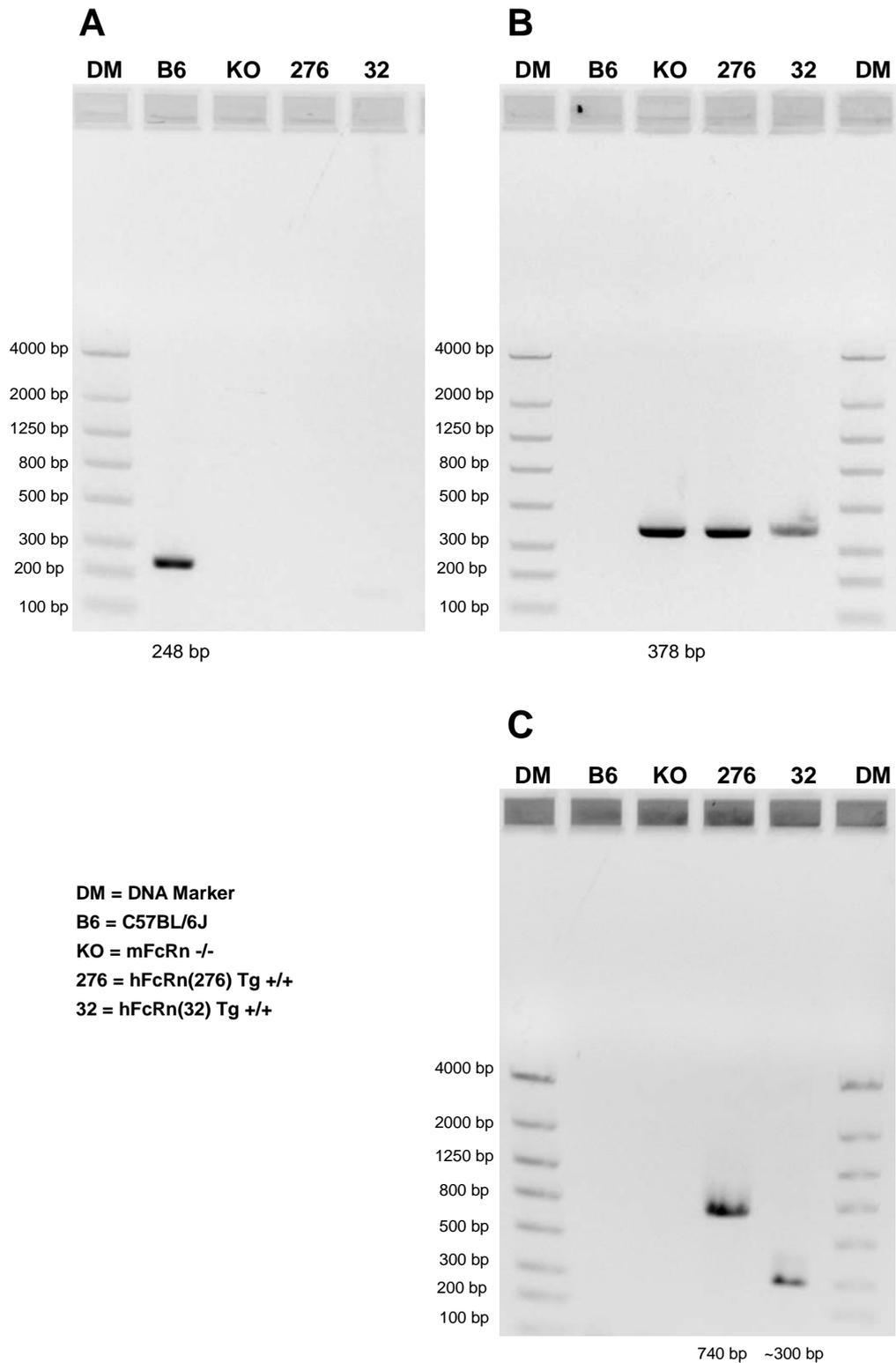


Abbildung 12: Elektrophoresegele der Genotypisierung

- A) Elektrophoresegel zum Nachweis des mFcRn-Gens,
 B) Elektrophoresegel zum Nachweis des Ziel-Konstrukts,
 das für den Knock Out des mFcRn-Gens verantwortlich ist.
 C) Elektrophoresegel zum Nachweis des hFcRn Knock Ins

4.2 Phänotypisierung

4.2.1 Körperwachstum

Bei der Zucht konnte beobachtet werden, dass Tiere der Linie hFcRn(276) Tg +/- kleiner waren als gleichaltrige Tiere der anderen Linien. Zusätzlich zeigten Jungtiere dieser Linie eine erhöhte Mortalität, wenn sie am 18. Lebenstag abgesetzt wurden, weshalb sie, wenn möglich, länger (\geq Tag 20) bei den Müttern belassen wurden. Diese Beobachtung konnte durch das Wiegen und Anlegen von Wachstumskurven, im Alter von 0 – 100 Tagen, genauer beschrieben werden.

Aus den Wäageergebnissen wurden Mittelwerte berechnet (Tab. 21). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 13 als Liniendiagramme gezeigt. Auf die Darstellung der Datenpunkte und Streubereiche wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Um das durchschnittliche Wachstum der Mäuse beurteilen zu können, wurden die Flächen unter den Wachstumskurven im Zeitraum von 0 bis 100 Tagen berechnet (Tab. 15). Zusätzlich wurden die Ergebnisse unter Verwendung einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit mehrfacher Besetzung auf ihre Unterschiede hin überprüft, wobei ein Signifikanzwert (p) $< 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt wurde (Tab. 15).

Die Wachstumskurven sind bei allen Linien biphasisch mit einem schnellen Wachstum in den ersten ± 40 Tagen, danach lässt das Körperwachstum nach bis die Körpergewichte annähernd konstant bleiben. Alle FcRn-modifizierten Mauslinien wurden gegen C57BL/6J verglichen, da dies der genetische Hintergrund aller FcRn-modifizierten Linien ist, und sie somit als Referenz verwendet werden können. In den Kurven ist deutlich zu erkennen, dass das postnatale Körperwachstum bei beiden Geschlechtern der Linie hFcRn(276) Tg +/- am geringsten ist. Die anderen Mauslinien zeigen ein annähernd gleiches Wachstum. Vergleicht man die weiblichen und männlichen Tiere der einzelnen Linien untereinander, zeigt sich, dass die Männchen schwerer sind als die Weibchen; im Mittel beträgt der Unterschied 18 – 21 %.

Beim Vergleich der durchschnittlichen Körpergewichte der Linien untereinander zeigt sich, dass alle Mauslinien außer der Linie hFcRn(276) +/+ ein leicht erhöhtes durchschnittliches Körpergewicht verglichen mit den C57BL/6J-Kontrollen besitzen (0,4 – 4,5 %). Nur die Tiere der Linie hFcRn(276) Tg +/+ zeigen ein erniedrigtes durchschnittliches Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrollen (7,1 - 7,4 %) und den anderen untersuchten Linien.

In der Kurvenanalyse ist zu erkennen, dass die mehrheitlich kleinen Unterschiede zu den Kontrollgruppen statistisch signifikant sind. Nur die männlichen Tiere der Linie hFcRn(276) Tg +/- zeigen keinen signifikanten Unterschied zu C57BL/6J.

Tabelle 15: Mittleres Körperwachstum und Analyse der Wachstumskurven

Linie, Geschlecht	AUC (h*g)	Δ zu C57BL/6J	Δ zwischen ♂ und ♀	Kurvenanalyse Vergleich mit C57BL/6J	
C57BL/6J	♂	2016	-	18,6 %	-
	♀	1641	-		-
mFcRn -/-	♂	2093	+ 3,8 %	21,3 %	sig.
	♀	1647	+ 0,4 %		sig.
hFcRn(276) Tg+/-	♂	2034	+ 0,9 %	18,4 %	n.s.
	♀	1660	+ 1,2 %		sig.
hFcRn(276) Tg+/+	♂	1872	- 7,1 %	18,9 %	sig.
	♀	1519	- 7,4 %		sig.
hFcRn(32) Tg+/-	♂	2106	+ 4,5 %	20,4 %	sig.
	♀	1677	+ 2,2 %		sig.
hFcRn(32) Tg+/+	♂	2059	+ 2,1 %	18,5 %	sig.
	♀	1678	+ 2,3 %		sig.

Bei der AUC handelt es sich um die Flächen unter den Gewichtskurven, die zum Vergleich des durchschnittlichen Körperwachstums herangezogen wurden. Bei der Kurvenanalyse wurden die FcRn-modifizierte Linien mit den C57BL/6J Kontrollen verglichen; genutzt wurde eine Varianzanalyse mit mehrfacher Besetzung, wobei ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant festgelegt wurde (sig. = signifikant, n.s. = nicht signifikant). Δ = Differenz der AUC in %.

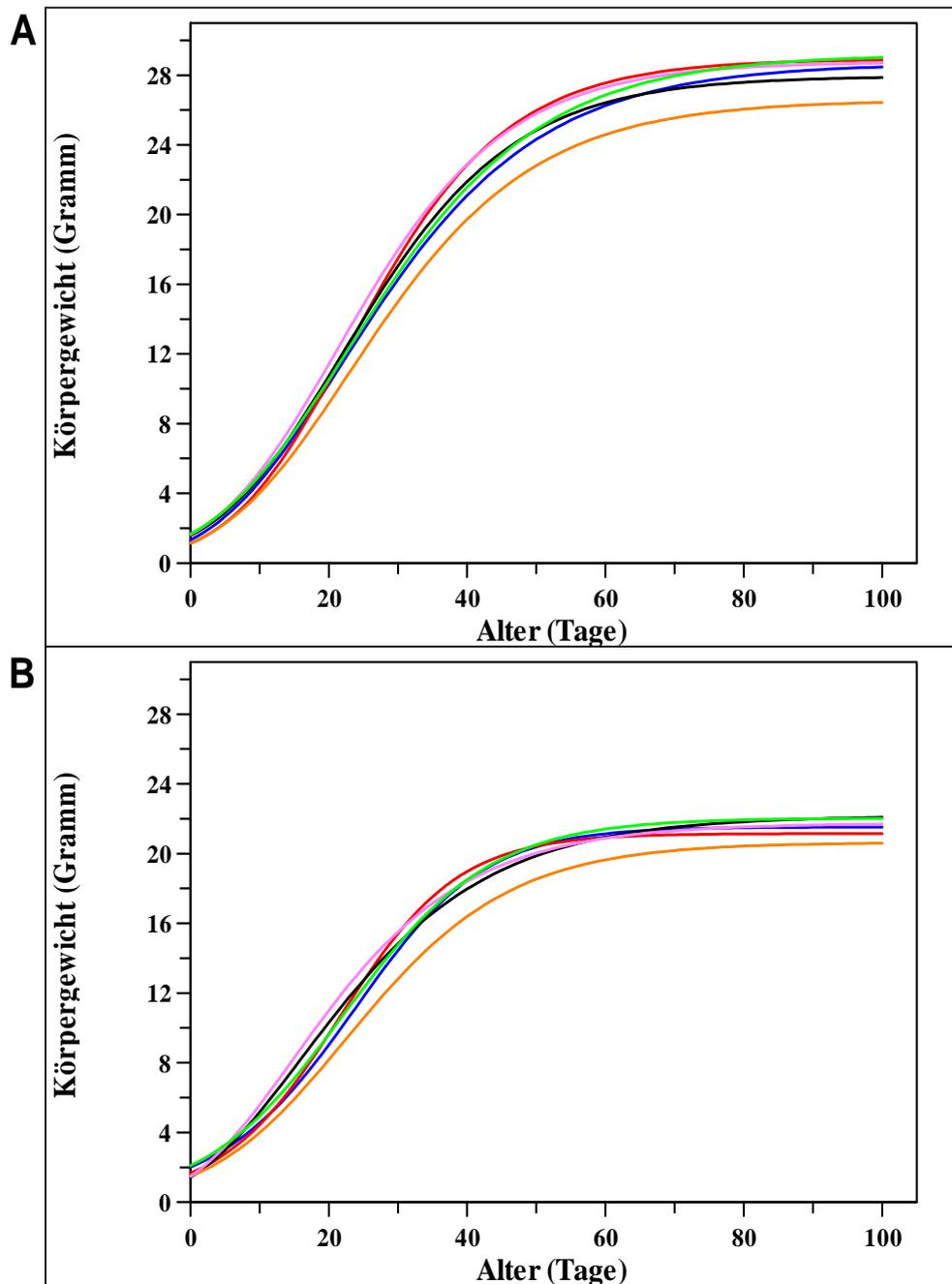


Abbildung 13: Körperwachstum im Vergleich der Mauslinien

Körpergewichts-Zeit-Kurven männlicher (**A**) und weiblicher (**B**) Mäuse im Alter von 0 – 100 Tagen. Es handelt sich um Mittelwertskurven, bei denen auf die Darstellung der Datenpunkte und Streubereiche zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet wurde.

- C67BL/6J
- mFcRn $-/-$
- hFcRn(276) Tg $+/-$
- hFcRn(276) Tg $+/+$
- hFcRn(32) Tg $+/-$
- hFcRn(32) Tg $+/+$

4.2.2 Hämatologie

Die Hämatologie ist die Lehre von der Physiologie und der Pathologie der zellulären Bestandteile des Blutes.

Generell ist zu sagen, dass das MCV muriner Erythrozyten geringer ist als das der meisten anderen Spezies, da Mäuse aber eine erhöhte Erythrozytenzahl besitzen, ist ihr Hämatokrit mit dem anderer Spezies vergleichbar. Eine weitere Besonderheit der Maus ist, dass gesunde Mäuse während des gesamten Lebens in der Milz und nicht nur im Knochenmark Erythrozyten produzieren. Der Anteil an Retikulozyten ist bei der Maus besonders hoch als Folge der nur kurzen Lebenszeit muriner Erythrozyten (30 – 40 Tage) (Horky *et al.* 1978). Mäuse besitzen die höchste Thrombozytenzahl aller Labortiere (Hedrich, 2004).

Für die hämatologischen Untersuchungen wurde EDTA-Blut von 50 ± 3 Tage alten Mäusen untersucht; die Gruppengröße je Linie und Geschlecht lag bei 21 – 24 Tieren.

Alle Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messwerte sind in Tabelle 16 angegeben. Vergleichswerte verschiedener Quellen finden sich in Tabelle 22, mit zugehöriger Qualität des verwendeten Materials in Tabelle 23. Alle erhobenen Daten wurden mit denen der C57BL/6J-Kontrollgruppen verglichen. Zur Veranschaulichung sind Parameter mit signifikanten Unterschieden im Vergleich zu C57BL/6J in Säulendiagrammen aus Mittelwerten \pm Standardabweichung dargestellt (Abb. 14). Signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen und Tabellen wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$

4.2.2.1 Hämatologie C57BL/6J

Fast alle gemessenen hämatologischen Ergebnisse von C57BL/6J lagen in den von der Literatur angegebenen Messbereichen für C57BL/6. Nur die Retikulozyten- und Leukozytenzahlen sowie das MPV waren gegenüber den Literaturangaben leicht erhöht.

4.2.2.2 Hämatologie mFcRn -/-

Mäuse der Linie mFcRn -/- besitzen sehr auffällige hämatologische Werte. Sie zeigen in beiden Geschlechtern im Vergleich mit C57BL/6J signifikant erhöhte Werte für Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration und signifikant erniedrigte Werte für MCH und MCV. Die Leukozytenzahl ist bei den männlichen Tieren nicht signifikant verändert, die weiblichen Tiere zeigen eine signifikant erniedrigte Leukozytenzahl verglichen mit C57BL/6J. MCHC, MPV, RDW, Retikulozytenzahl und Thrombozytenzahl zeigen keine statistisch signifikante Differenz im Vergleich mit C57BL/6J.

4.2.2.3 Hämatologie hFcRn(276) Tg +/+

Die Hämatologie von hFcRn(276) Tg +/+ zeigt nur drei signifikante Unterschiede zu C57BL/6J: der Hämatokrit der männlichen Tiere ist erhöht, der MCHC und die Thrombozytenzahl der weiblichen Tiere ist erniedrigt.

4.2.2.4 Hämatologie hFcRn(32) Tg +/+

Die hämatologische Untersuchung von hFcRn(32) Tg +/+ zeigt keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit C57BL/6J.

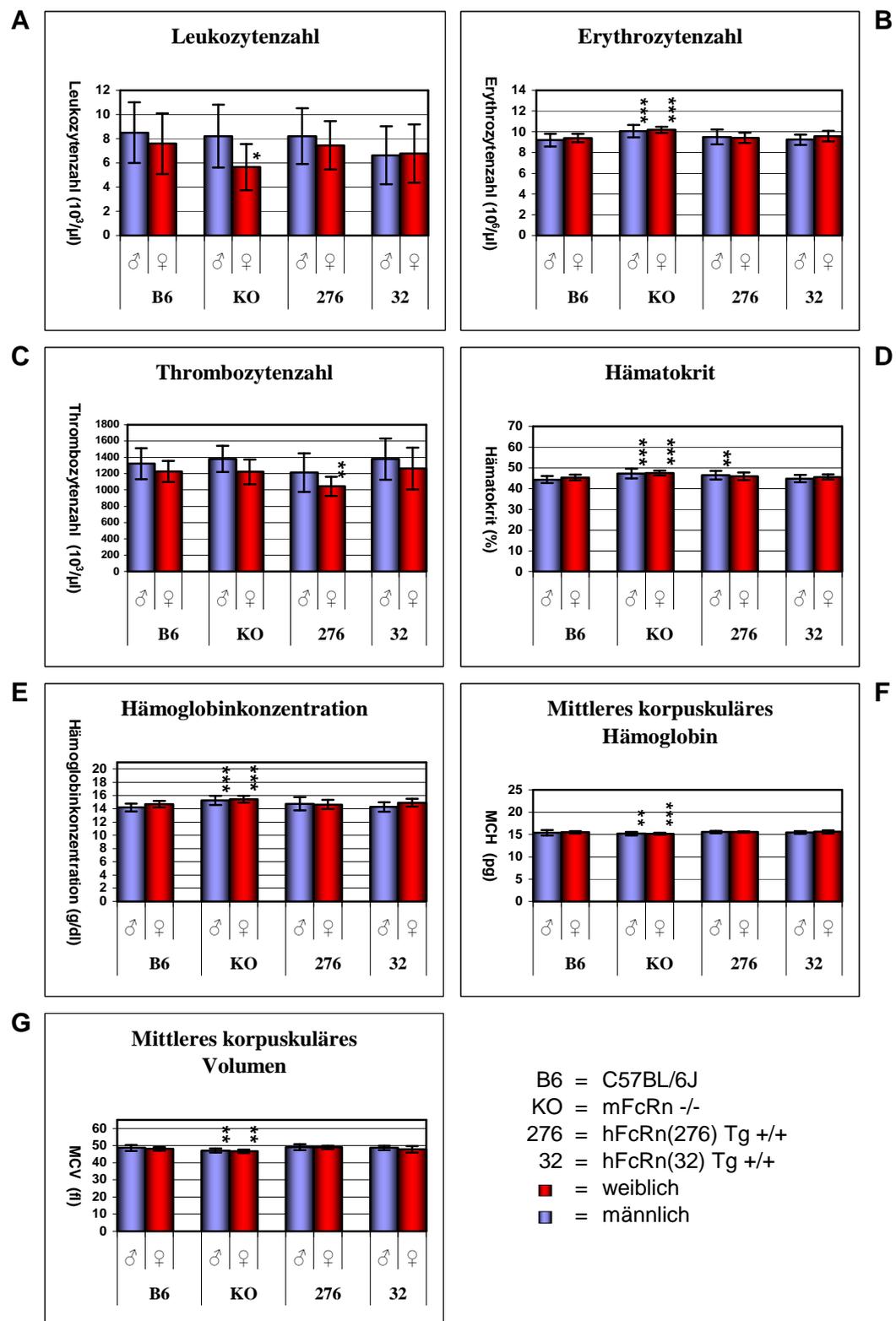


Abbildung 14: Hämatologie

Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Mäusen ($n = 21-26$) im Alter von 50 ± 3 Tagen. Die FcRn-modifizierte Mauslinien wurden mit C57BL/6J verglichen. Signifikante Unterschiede sind wie folgt markiert: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabelle 16: Messwerte der Hämatologie

Parameter	(Einheit)	C57BL/6J		mFcRn ^{-/-}		hFcRn(276) Tg ^{+/+}		hFcRn(32) Tg ^{+/+}	
		♂ (n = 22)	♀ (n = 23)	♂ (n = 26)	♀ (n = 23)	♂ (n = 22)	♀ (n = 24)	♂ (n = 22)	♀ (n = 21)
WBC	(*10 ³ /µl)	8,5 ± 2,5	7,6 ± 2,5	8,2 ± 2,6	5,7 ± 1,9*	8,2 ± 2,3	7,5 ± 2,0	6,6 ± 2,4	6,8 ± 2,4
RBC	(*10 ⁶ /µl)	9,2 ± 0,6	9,4 ± 0,4	10,1 ± 0,6***	10,2 ± 0,3***	9,5 ± 0,7	9,4 ± 0,5	9,2 ± 0,5	9,6 ± 0,5
HGB	(g/dl)	14,2 ± 0,6	14,7 ± 0,5	15,3 ± 0,7***	15,4 ± 0,5***	14,8 ± 1,0	14,6 ± 0,7	14,3 ± 0,7	14,9 ± 0,6
PCV	(%)	44,4 ± 1,7	45,4 ± 1,3	47,3 ± 2,4***	47,6 ± 1,2***	46,5 ± 2,1**	46,0 ± 1,8	44,9 ± 1,8	45,7 ± 1,2
RET1	(%)	5,1 ± 1,2	4,3 ± 0,9	5,0 ± 1,2	4,1 ± 1,0	5,5 ± 1,5	4,3 ± 0,9	5,8 ± 1,5	4,8 ± 1,4
PLT	(*10 ³ /µl)	1322 ± 190	1227 ± 131	1381 ± 160	1222 ± 152	1211 ± 235	1044 ± 116**	1379 ± 252	1263 ± 255
MCHC	(g/dl)	31,8 ± 0,9	32,4 ± 0,7	32,3 ± 0,7	32,5 ± 0,8	31,7 ± 0,8	31,8 ± 0,6*	31,8 ± 0,7	32,6 ± 0,7
MCV	(fl)	48,6 ± 1,7	48,1 ± 1,1	47,0 ± 1,1**	46,7 ± 1,0**	49,1 ± 1,8	48,9 ± 1,0	48,6 ± 1,3	47,8 ± 1,9
MCH	(pg)	15,4 ± 0,6	15,5 ± 0,3	15,2 ± 0,4**	15,2 ± 0,2***	15,5 ± 0,3	15,6 ± 0,2	15,5 ± 0,3	15,6 ± 0,4
MPV	(fl)	6,5 ± 0,2	6,5 ± 0,2	6,5 ± 0,3	6,5 ± 0,2	6,6 ± 0,2	6,6 ± 0,2	6,5 ± 0,2	6,5 ± 0,1
RDW-SD	(fl)	30,1 ± 1,9	29,1 ± 1,3	30,8 ± 1,9	29,9 ± 1,5	31,0 ± 2,6	29,7 ± 1	31,2 ± 1,7	30,2 ± 2,6

Mittelwerte ± Standardabweichungen von Mäusen im Alter von 50 ± 3 Tagen. Die FcRn-modifizierten Mauslinien wurden mit C57BL/6J verglichen. Die Tabelle ist die Grundlage von Abbildung 14. Signifikante Unterschiede sind wie folgt markiert: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

4.2.3 Klinische Chemie

Durch die klinische Chemie ist es möglich, eine Vielzahl von Organfunktionen zu beurteilen, so können z.B. Defekte in diversen Organsystemen, Änderungen in Stoffwechselwegen oder Störungen in der Elektrolythomöostase nachgewiesen werden. Dies ist wichtig, um in Versuchen die Wirkung des eingesetzten Pharmakons von Effekten der genetischen Manipulation unterscheiden zu können.

Beurteilt wurde Serum von 50 ± 3 Tage alten Mäusen; die Gruppengröße je Linie und Geschlecht lag bei 12 – 15 Tieren.

Alle Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messwerte sind in den Tabellen 17 und 18 angegeben. Publierte Vergleichswerte verschiedener Quellen finden sich in Tabelle 24, mit zugehöriger Qualität des verwendeten Materials in Tabelle 25. Zur Veranschaulichung sind Parameter, mit signifikanten Unterschieden, in Säulendiagrammen aus Mittelwerten \pm Standardabweichung dargestellt (Abb. 17). Alle erhobenen Daten wurden mit denen der C57BL/6J-Kontrollgruppen verglichen; signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen und Tabellen wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$

4.2.3.1 Klinische Chemie C57BL/6J

Beim Vergleich der Messwerte von C57BL/6J mit publizierten Werten von C57BL/6 aus der Literatur fallen einige Unterschiede auf. Für Eisen und Glukose wurden höhere Werte gemessen. Für α -Amylase, Laktatdehydrogenase, Low-Density Lipoprotein-Cholesterin und Kreatinin wurden niedrigere Werte als publiziert gemessen.

4.2.3.2 Klinische Chemie mFcRn -/-

Linie mFcRn -/- zeigt in beiden Geschlechtern im Vergleich mit C57BL/6J signifikant erhöhte Werte für Eisen, C-reaktives Protein, TIBC, Transferrin, UIBC, Alkalische Phosphatase, Cholesterin, High-Density Lipoprotein-Cholesterin, Low-Density Lipoprotein-Cholesterin und signifikant erniedrigte Werte für Kalzium, Gesamteiweiß, Albumin und murines IgG. Nur bei den Männchen ist α -Amylase und Lipase signifikant erhöht, Kreatinkinase und Glukose erniedrigt. Nur die weiblichen Tiere zeigen signifikant erhöhtes Chlorid und eine erniedrigte Alanin-Aminotransferase-Aktivität verglichen mit C57BL/6J.

4.2.3.3 Klinische Chemie hFcRn(276) Tg +/-

Beide Geschlechter der Linie hFcRn(276) Tg +/- zeigen im Vergleich mit C57BL/6J einen signifikant erhöhten Wert für die Totale Eisenbindungskapazität und einen erniedrigten Wert für murines IgG. Die männlichen Tiere zeigen zusätzlich signifikant erniedrigte Werte für Chlorid und Albumin und die weiblichen Tiere signifikant erhöhte Werte für Kalium, Eisen, Harnsäure, Freie Fettsäuren, Low-Density Lipoprotein-Cholesterin und signifikant erniedrigte Werte für Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Kreatinkinase, Low-Density Lipoprotein Cholesterin sowie Laktatdehydrogenase.

Bei den Gruppen hFcRn(276) Tg +/- ♂, hFcRn(276) Tg +/- ♀, hFcRn(32) Tg +/- ♀ fallen große Standardabweichungen im Transferrinspiegel auf. Betrachtet man die Einzelwerte dieser Gruppen, so ist zu erkennen, dass einzelne Tiere stark erhöhte Transferrinspiegel zeigen (Abb. 15).

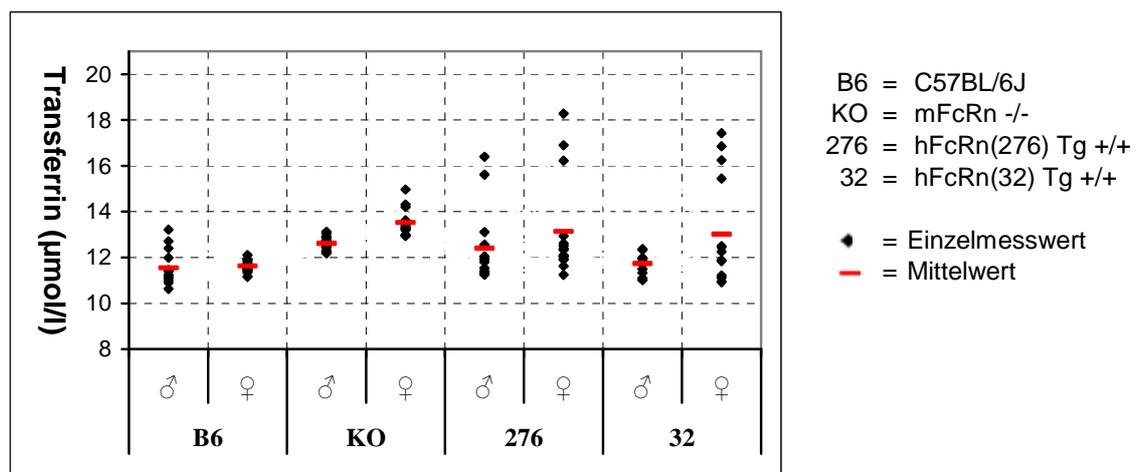


Abbildung 15: Einzelmesswerte von Transferrin

Einzelmesswerte (n = 12-15) und Mittelwerte der Transferrinmessungen. Es ist zu erkennen, dass einige hFcRn-transgene Tiere stark erhöhte Werte aufweisen.

4.2.3.4 Klinische Chemie hFcRn(32) Tg +/-

Die klinisch-chemische Untersuchung zeigte bei beiden Geschlechtern von hFcRn(32) Tg +/- im Vergleich mit C57BL/6J signifikant erhöhte Werte für Albumin, Totale Eisenbindungskapazität, α -Amylase, Freie Fettsäuren und signifikant erniedrigte Werte für C-reaktives Protein, murines IgG, Glukose und Kreatinkinase. Zusätzlich wurden bei männlichen Mäusen dieser Linie signifikant erhöhte Messwerte für die ungesättigte Eisenbindungskapazität und signifikant erniedrigte Werte für Chlorid und Transferrinsättigung gemessen. Die weiblichen Tiere besitzen signifikant erhöhte Werte für Triglyceride und Low-Density Lipoprotein-Cholesterin sowie eine signifikant erniedrigte Aspartat-Aminotransferase-Aktivität.

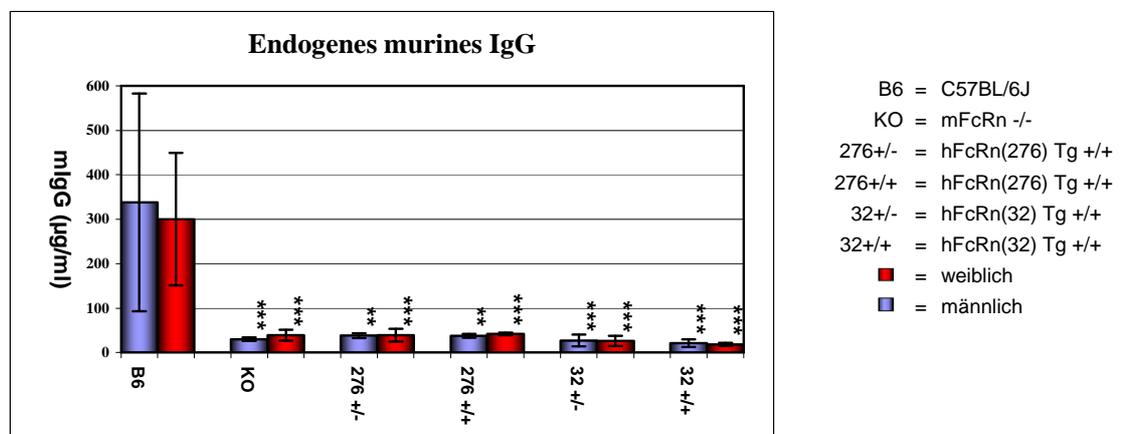
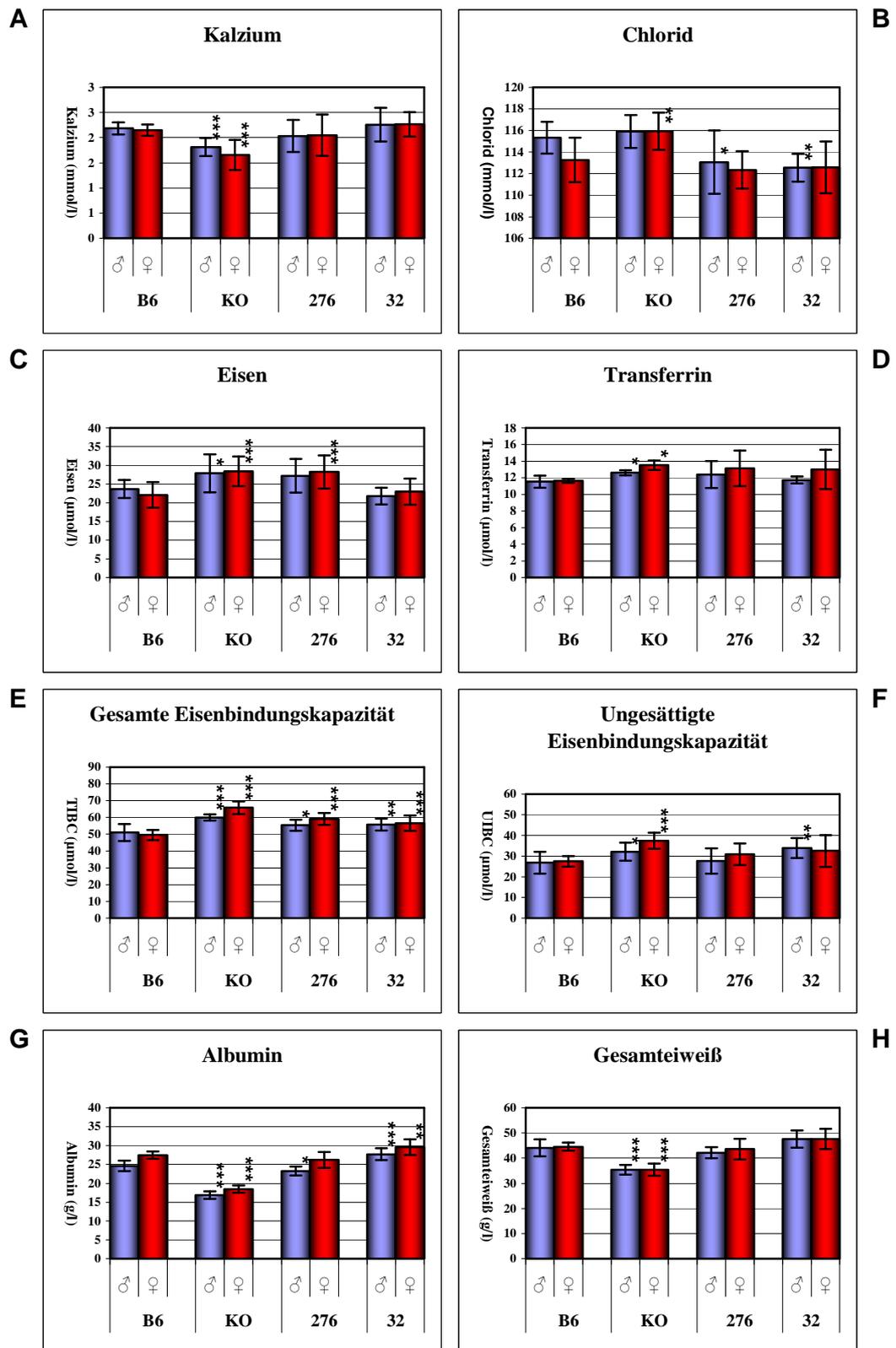


Abbildung 16: Endogenes murines IgG

Mittelwerte \pm Standardabweichung von Mäusen im Alter von 50 ± 3 Tagen. Die FcRn-modifizierte Mauslinie (n = 5) wurde mit C57BL/6J verglichen. Es zeigt sich, dass alle FcRn-modifizierte Mauslinien nur ca. 10 % IgG der Konzentration von C57BL/6J besitzen. Signifikante Unterschiede sind wie folgt markiert: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



Fortsetzung siehe Folgeseite

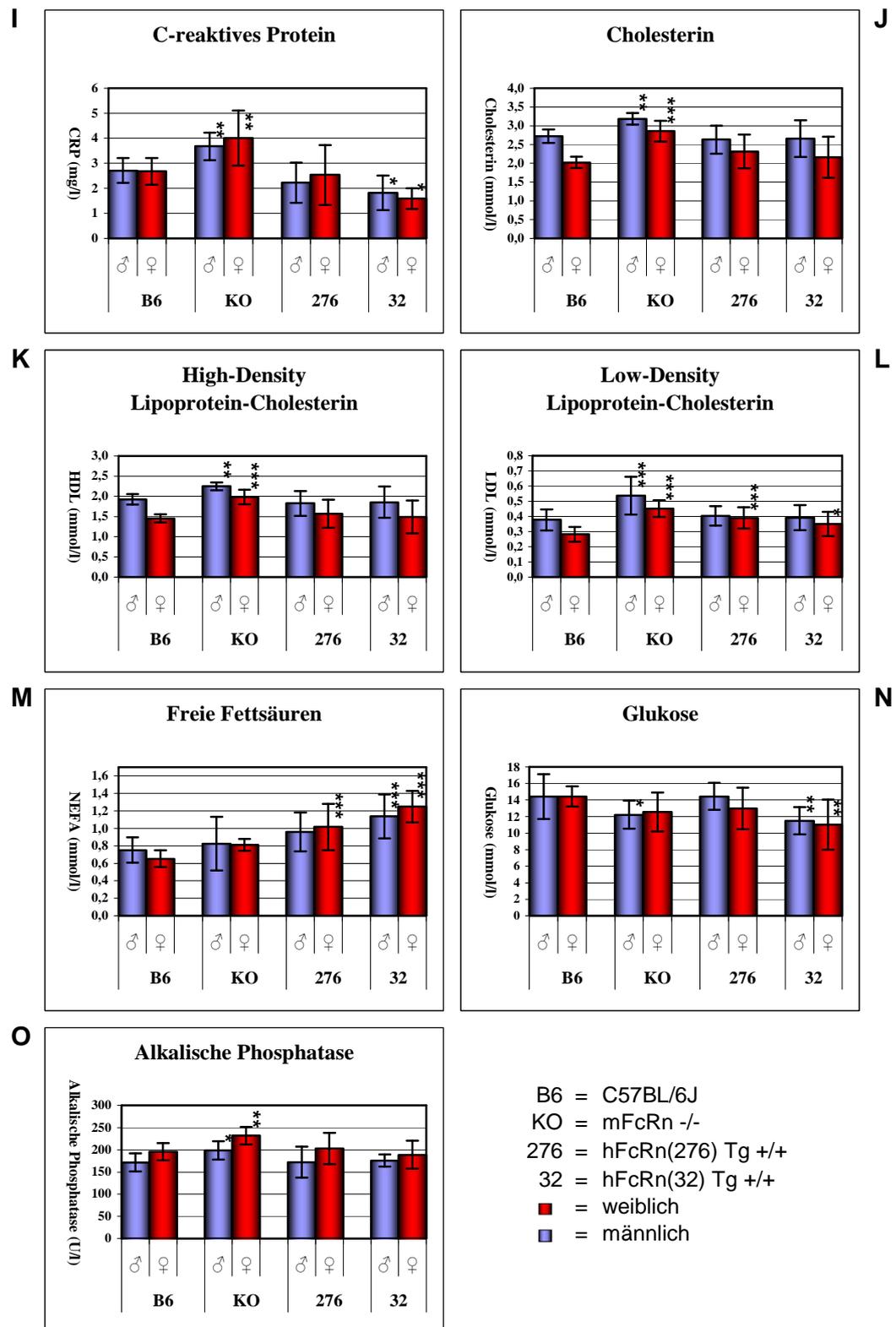


Abbildung 17: Klinische Chemie

Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Mäusen im Alter von 50 ± 3 Tagen. Die FcRn-modifizierte Mauslinien ($n = 12-15$) wurden mit C57BL/6J verglichen. Signifikante Unterschiede sind wie folgt markiert:

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabelle 17: Messwerte des endogenen murinen IgGs

Linie, Geschlecht	murines IgG ($\mu\text{g/ml}$)		
<i>C57BL/6J</i>	♂	337,7	\pm 244,9
	♀	299,8	\pm 148,9
<i>mFcRn -/-</i>	♂	29,8	\pm 4,3 ***
	♀	39,0	\pm 12,6 ***
<i>hFcRn(276)Tg +/-</i>	♂	38,0	\pm 5,5 **
	♀	39,0	\pm 14,3 ***
<i>hFcRn(276)Tg +/+</i>	♂	37,6	\pm 4,7 **
	♀	42,2	\pm 2,8 ***
<i>hFcRn(32)Tg +/-</i>	♂	27,3	\pm 13,7 ***
	♀	26,0	\pm 11,2 ***
<i>hFcRn(32)Tg +/+</i>	♂	20,9	\pm 8,8 ***
	♀	18,1	\pm 3,9 ***

Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Mäusen im Alter von 50 ± 3 Tagen. Die FcRn-modifizierten Mauslinien ($n = 5$) wurden mit C57BL/6J verglichen. Es zeigt sich, dass alle FcRn-modifizierten Mauslinien nur ca. 10 % IgG der Konzentration von C57BL/6J besitzen. Die Tabelle enthält die Daten zu Abbildung 16. Signifikante Unterschiede sind wie folgt markiert:

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabelle 18: Messwerte der Klinischen Chemie

Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Mäusen im Alter von 50 ± 3 Tagen. Die FcRn-modifizierten Mauslinien wurden mit C57BL/6J verglichen. Die Tabelle stellt die Grundlage zu Abbildung 17 dar. Signifikante Unterschiede sind wie folgt markiert: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabelle 18 siehe Folgeseite

4. Ergebnisse

Parameter	Einheit	C57BL/6J		mFcRn -/-		hFcRn(276) Tg+/+		hFcRn(32) Tg+/+	
		♂ (n=15)	♀ (n=15)	♂ (n=15)	♀ (n=15)	♂ (n=14)	♀ (n=15)	♂ (n=12)	♀ (n=14)
Natrium	mmol/l	154,9 ± 2,10	149,0 ± 3,03	153,5 ± 2,10	152,0 ± 1,51	152,7 ± 2,85	150,7 ± 3,34	154,4 ± 1,00	152,1 ± 4,60
Kalium	mmol/l	4,8 ± 0,25	4,2 ± 0,32	5,0 ± 0,32	4,5 ± 0,34	4,6 ± 0,23	4,6 ± 0,34**	4,7 ± 0,31	4,5 ± 0,23
Kalzium	mmol/l	2,2 ± 0,12	2,1 ± 0,11	1,8 ± 0,18***	1,7 ± 0,29***	2,0 ± 0,32	2,0 ± 0,41	2,3 ± 0,34	2,3 ± 0,24
Eisen	µmol/l	23,7 ± 2,41	22,1 ± 3,42	27,9 ± 5,09*	28,4 ± 3,97***	27,2 ± 4,52	28,2 ± 4,44***	21,8 ± 2,24	23,0 ± 3,52
Chlorid	mmol/l	115,3 ± 1,46	113,3 ± 2,06	115,9 ± 1,53	115,9 ± 1,72**	113,1 ± 2,90*	112,3 ± 1,73	112,6 ± 1,28**	112,6 ± 2,41
Phosphat	mmol/l	3,0 ± 0,21	2,8 ± 0,16	2,9 ± 0,39	2,8 ± 0,32	2,9 ± 0,38	2,7 ± 0,30	2,7 ± 0,32	3,1 ± 0,62
TP	g/l	44,1 ± 3,34	44,5 ± 1,60	35,4 ± 1,92***	35,4 ± 2,44***	42,1 ± 2,25	43,6 ± 4,17	47,6 ± 3,34	47,6 ± 4,07
Albumin	g/l	24,6 ± 1,40	27,5 ± 0,99	16,9 ± 0,99***	18,5 ± 0,92***	23,2 ± 1,19*	26,2 ± 2,11	27,7 ± 1,56***	29,6 ± 2,03**
CRP	mg/l	2,7 ± 0,50	2,7 ± 0,53	3,7 ± 0,55**	4,0 ± 1,11**	2,2 ± 0,81	2,5 ± 1,20	1,8 ± 0,69*	1,6 ± 0,41*
Trans.-Sät.	%	47,3 ± 6,06	44,4 ± 5,33	46,4 ± 7,77	43,1 ± 5,267	49,9 ± 9,39	47,9 ± 7,71	39,3 ± 5,49*	41,1 ± 8,27
TIBC	µmol/l	51,0 ± 5,00	49,6 ± 3,05	59,9 ± 1,84***	65,8 ± 3,76***	55,4 ± 3,29*	59,1 ± 3,65***	55,7 ± 3,50**	56,6 ± 4,55***
Transferrin	µmol/l	11,5 ± 0,72	11,6 ± 0,25	12,6 ± 0,31*	13,5 ± 0,56*	12,4 ± 1,63	13,1 ± 2,14	11,7 ± 0,43	13,0 ± 2,37
UBC	µmol/l	26,8 ± 5,22	27,5 ± 2,53	32,1 ± 4,37*	37,4 ± 3,89***	27,6 ± 6,12	30,9 ± 5,19	34,0 ± 4,78**	32,5 ± 7,63
mIgG	µg/ml	337,7 ± 244,9	299,8 ± 148,9	29,8 ± 4,3***	39,0 ± 12,6***	37,6 ± 4,7**	42,2 ± 2,8***	20,9 ± 8,8***	18,1 ± 3,86***
ALT	U/l	31 ± 8,7	28 ± 7,5	28 ± 6,9	21 ± 6,06**	28 ± 7,2	21 ± 4,10**	30 ± 5,2	25 ± 3,1
AST	U/l	60 ± 17,2	66 ± 17,2	50 ± 11,7	61 ± 19,1	52 ± 12,1	45 ± 13,8**	47 ± 10,5	49 ± 14,0*
AP	U/l	172 ± 20,3	196 ± 19,5	198 ± 20,51*	232 ± 19,82**	172 ± 35,1	203 ± 34,9	176 ± 13,9	189 ± 31,6
α-Amylase	U/l	566 ± 42,2	522 ± 33,2	675 ± 64,12***	568 ± 42,4	553 ± 74,2	506 ± 49,3	662 ± 92,87**	614 ± 77,40***
CK	U/l	278 ± 137,0	266 ± 153,6	135 ± 96,19*	170 ± 133,6	179 ± 134,1	101 ± 92,98**	129 ± 137,81*	100 ± 84,15**
LDH	U/l	191 ± 55,4	189 ± 30,9	187 ± 56,7	169 ± 59,2	196 ± 55,6	136 ± 31,99**	199 ± 42,4	160 ± 35,5
Lipase	U/l	83 ± 14,0	77 ± 8,1	112 ± 20,8**	82 ± 8,3	92 ± 14,5	68 ± 11,1	103 ± 24,7	68 ± 15,0
Glukose	mmol/l	14,4 ± 2,70	14,4 ± 1,22	12,2 ± 1,69*	12,6 ± 2,34	14,4 ± 1,62	13,0 ± 2,52	11,5 ± 1,67**	11,0 ± 3,02**
Cholesterin	mmol/l	2,7 ± 0,18	2,0 ± 0,15	3,2 ± 0,15**	2,9 ± 0,28***	2,6 ± 0,37	2,3 ± 0,45	2,7 ± 0,49	2,2 ± 0,54
TG	mmol/l	1,36 ± 0,26	0,96 ± 0,20	1,31 ± 0,36	1,20 ± 0,33	1,30 ± 0,43	1,12 ± 0,24	1,53 ± 0,49	1,27 ± 0,42*
Harnstoff	mmol/l	9,6 ± 0,88	10,0 ± 1,07	10,6 ± 1,19	9,6 ± 1,74	10,4 ± 1,65	10,0 ± 1,60	10,4 ± 1,63	9,7 ± 2,12
Harnsäure	µmol/l	101,4 ± 20,1	76,9 ± 27,6	103,0 ± 45,3	128,3 ± 33,6	104,1 ± 35,8	123,3 ± 33,62*	127,4 ± 43,4	113,8 ± 51,0
NEFA	mmol/l	0,75 ± 0,15	0,65 ± 0,09	0,82 ± 0,31	0,81 ± 0,07	0,96 ± 0,22	1,02 ± 0,26***	1,14 ± 0,25***	1,25 ± 0,18***
HDL	mmol/l	1,9 ± 0,13	1,5 ± 0,10	2,2 ± 0,10**	2,0 ± 0,18***	1,8 ± 0,31	1,6 ± 0,35	1,9 ± 0,39	1,5 ± 0,41
LDL	mmol/l	0,38 ± 0,07	0,28 ± 0,05	0,54 ± 0,13***	0,45 ± 0,06***	0,40 ± 0,06	0,39 ± 0,07***	0,39 ± 0,08	0,35 ± 0,08*
Kreatinin	mmol/l	8,9 ± 3,32	11,0 ± 2,83	11,8 ± 3,33	10,7 ± 3,44	10,5 ± 3,27	10,0 ± 1,97	8,2 ± 2,39	8,8 ± 3,58

4.3 Pharmakokinetik therapeutischer Antikörper

Alle berechneten pharmakokinetischen Parameter der einzelnen Antikörper sind in den Tabellen 26 bis 32 enthalten.

4.3.1 Kurvenverlauf pharmakokinetischer Profile

Nach der intravenösen Applikation von 2,5 bzw. 10 mg/kg der therapeutischen Antikörper werden diese in biphasischer Weise aus der Blutzirkulation der Mäuse entfernt. Dieser Befund ist für huMAb<E> in Abbildung 18 dargestellt. Die pharmakokinetischen Profile der Antikörper sind in den verschiedenen Mauslinien sehr ähnlich und unterscheiden sich primär durch die Höhe der Serumkonzentrationen (Y-Achse) und der Steilheit der Kurven. Dieser Verlauf wird auch als linearer Verlauf bezeichnet, da bei halblogarithmischer Darstellung der Kurve die β -Phase eine Gerade beschreibt. Die biphasische Clearance ist bei Linie mFcRn -/- am wenigsten ausgeprägt, da diese Mäuse aufgrund des Fehlens von FcRn, das IgG sehr schnell aus der Zirkulation entfernen. Die Linie mFcRn -/- zeigt in allen Versuchsreihen einen signifikant niedrigeren Kurvenverlauf ($p < 0,05$) verglichen mit allen anderen untersuchten Mauslinien.

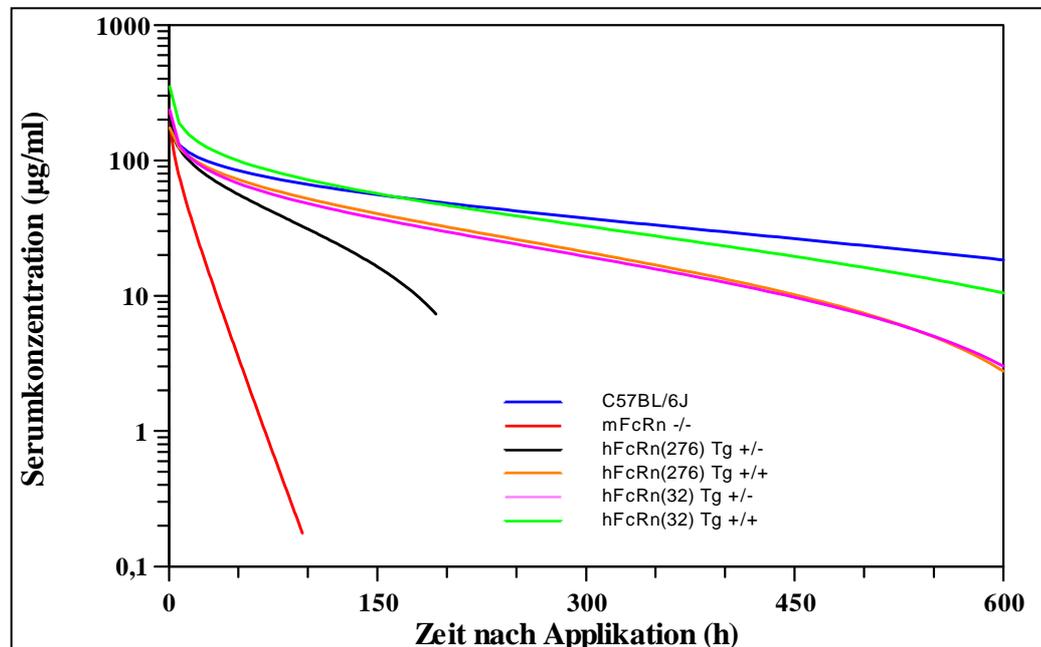


Abbildung 18: Pharmakokinetisches Profil von huMAb<E>

Serumkonzentrations-Zeit-Kurven von huMAb<E> nach einer intravenösen Applikation von 10 mg/kg an männliche Mäuse ($n = 3-5$). Es handelt sich um Mittelwertskurven, bei denen aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung der Datenpunkte verzichtet wurde.

4.3.2 Vergleich Serum versus Plasma

Für den Vergleich der eingesetzten therapeutischen Antikörper untereinander wurden ausschließlich Serumproben gewonnen und analysiert. Ein Teil der Vergleichswerte der Antikörper huMAb<P> und huMAb<A>, die im Affen und/oder Menschen generiert wurden, stammen allerdings von Plasmaproben.

Um festzustellen, in wieweit Ergebnisse aus Versuchen mit Serum mit Versuchen mit Plasma vergleichbar sind, wurden Versuche mit huMAb<P> und huMAb<A> an je zwei Mauslinien (C57BL/6J, mFcRn -/-) doppelt durchgeführt. Einmal wurden Serumproben, das andere Mal Plasmaproben gewonnen. Die Serum- und Plasmaproben wurden auf die gleiche Weise analysiert.

Beim Vergleich der Kurven (Abb. 19) ist zu erkennen, dass Versuche in Plasma im mittleren Kurvenverlauf höhere Konzentrationen zeigen als Versuche in Serum. Vergleicht man die AUC_{672} der Konzentrations-Zeit-Kurven von 10 mg/kg huMAb<P> in C57BL/6J, so ergibt sich ein Unterschied von 25 % zwischen Serum und Plasma. Bei mFcRn -/- ergibt sich ein Unterschied von 20 %. Bei den Kurven von huMAb<A> nach einer Gabe von 10 mg/kg liegen die Unterschiede in C57BL/6J bei 7 % und in mFcRn -/- bei 34 %.

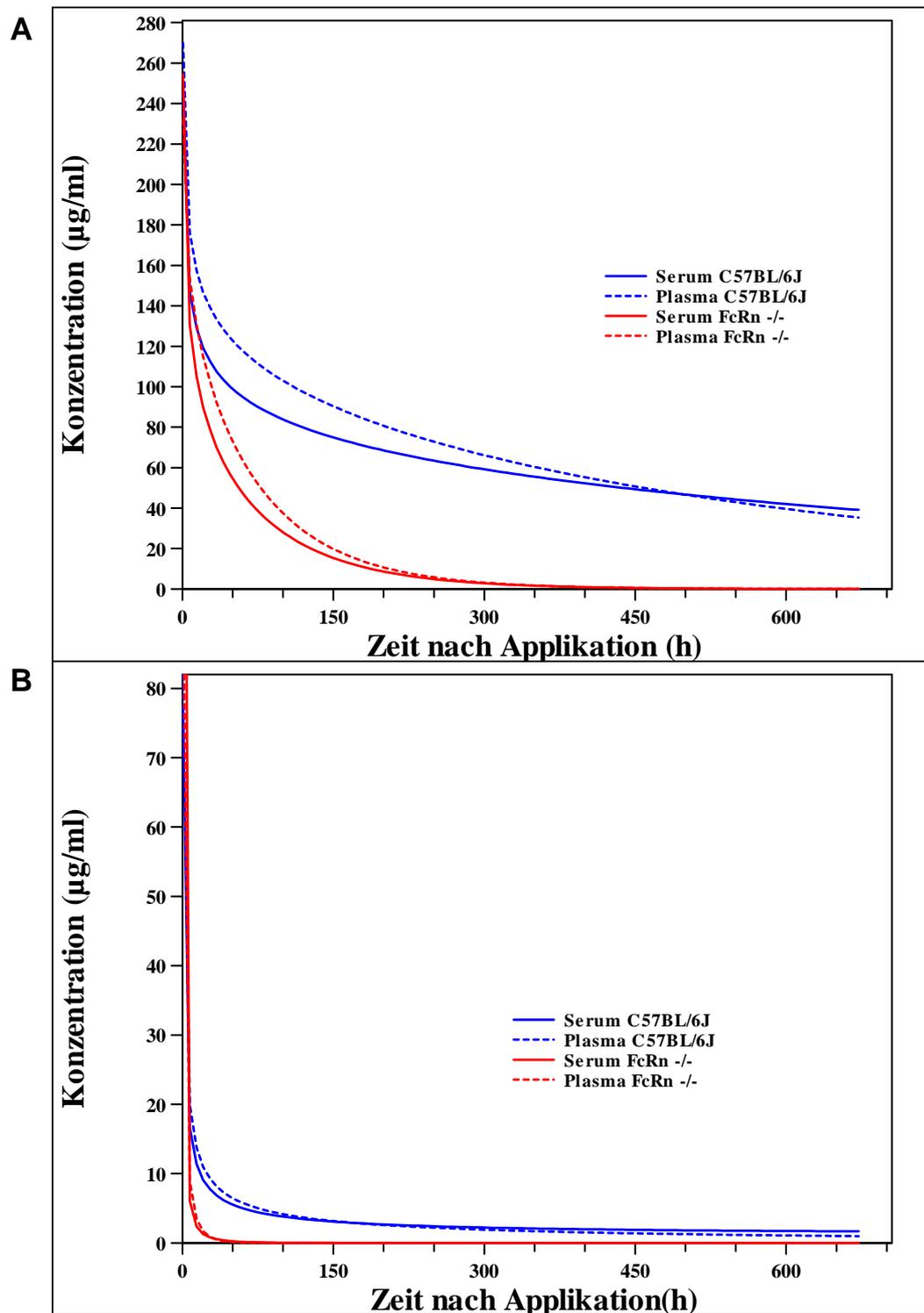


Abbildung 19: Vergleich Serum versus Plasma

Konzentrations-Zeit-Kurven von **A**) huMAb<P> und **B**) huMAb<A> nach einer intravenösen Applikation von 10 mg/kg an Mäuse ($n = 3-5$) der Linien C57BL/6J und mFcRn -/-. Es handelt sich um Mittelwertskurven, bei denen aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung der Datenpunkte verzichtet wurde.

4.3.3 Geschlechtervergleich

In der Literatur wird bei Versuchen mit transgenen FcRn-modifizierten Mäusen oft keine Rücksicht auf das Geschlecht der Tiere genommen („sex match“), siehe z.B. Petkova et al., 2006; Roopenian et al 2003. Es existieren aber auch Publikationen, dass das Geschlecht einen Einfluss auf die Clearance von monoklonalen Antikörpern haben kann (Mould and Green, 2010; Lu *et al.* 2008). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob das Geschlecht bei den verwendeten Antikörpern einen Einfluss auf die Pharmakokinetiken hat. Zu diesem Zwecke wurde ein Teil der Versuche in beiden Geschlechtern durchgeführt.

In den meisten Versuchen verlaufen die Kurven der beiden Geschlechter innerhalb der gleichen Mauslinie fast deckungsgleich. Dieser Befund ist exemplarisch für huMAb<P> in Abbildung 20 gezeigt.

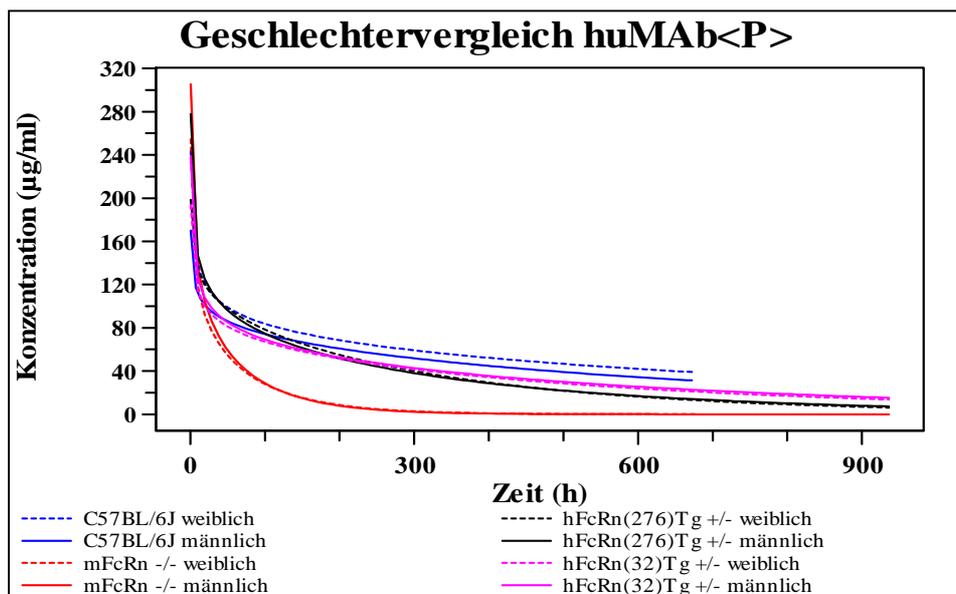


Abbildung 20: Geschlechtervergleich bei huMAb<P>

Serumkonzentrations-Zeit-Kurven beider Geschlechter verschiedener Mauslinien (n = 3–5) nach einer intravenösen Einzelgabe von 10 mg/kg huMAb<P>.

Bei huMAb<P> unterscheidet sich die AUC_{672} zwischen den Geschlechtern durchschnittlich um 9,2 %, bei huMAb<A> um 26,0 %, bei huMAb<I> um 11,4 %, bei huMAb<E> um 10,0 % und bei huMAb<C> um 18,9 %. Die größte Differenz der AUC_{672} zeigt sich bei der Linie mFcRn -/- nach der Applikation von 10 mg/kg huMAb<A>, hier beträgt die Differenz 47,8 %.

Die Clearance unterscheidet sich im Mittel zwischen den Geschlechtern bei huMAb<P> um 10,4 %, bei huMAb<A> um 28,1 %, bei huMAb<I> um 10,5 %, bei huMAb<E> um 8,3 % und bei huMAb<C> um 20,0%. Die größte Differenz der Clearance zeigt sich abermals bei der Linie mFcRn -/- nach der Applikation von 10 mg/kg huMAb<A>, hier beträgt die Differenz 48,7 %.

Das Verteilungsvolumen unterscheidet sich durchschnittlich bei huMAb<P> um 13,3%, bei huMAb<A> um 28,2 %, bei huMAb<I> um 13,1 %, bei huMAb<E> um 22,8 % und bei huMAb<C> um 27,9 %. Die größte Differenz des Verteilungsvolumens zeigt sich bei der Linie mFcRn -/- nach der Applikation von 10 mg/kg huMAb<A>, hier beträgt die Differenz 72,2 %.

Bei huMAb<P> unterscheidet sich die terminale Halbwertszeit im Mittel zwischen den Geschlechtern um 11,0 %, bei huMAb<A> um 25,3 %, bei huMAb<I> um 12,8 %, bei huMAb<E> um 22,4 % und bei huMAb<C> um 30,4%. Die größte Differenz der terminalen Halbwertszeit zeigt sich bei der Linie hFcRn(276) Tg +/- nach der Applikation von 10 mg/kg huMAb<A>, hier beträgt die Differenz 45,7 %.

Trotz der sehr ähnlichen Kurvenverläufe ruft das Geschlecht bei einigen Versuchen eine nichtzufällige Mittelwertsänderung der Serumkonzentrationen hervor ($p < 0,05$)(Tab. 19).

Tabelle 19: Signifikanz der Geschlechtsunterschiede

<i>Mauslinie</i>	<i>Test-Antikörper</i>				
	<i>huMAb<P></i>	<i>huMAb<A></i>	<i>huMAb<I></i>	<i>huMAb<E></i>	<i>huMAb<C></i>
<i>C57BL/6J</i>	sig.	sig.	n.s.	n.s.	sig.
<i>mFcRn -/-</i>	n.s.	n.s.	sig.	-	-
<i>hFcRn(276) Tg +/-</i>	n.s.	sig.	n.s.	-	n.s.
<i>hFcRn(276) Tg ++</i>	n.s.	n.s.	n.s.	-	sig.
<i>hFcRn(32) Tg +/-</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-
<i>hFcRn(32) Tg ++</i>	sig.	n.s.	n.s.	sig.	n.s.

Der Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven wurde durch zweifaktorielle ANOVA mit mehrfacher Besetzung verglichen. Bei allen gezeigten Versuchen ($n = 3-5$) wurde je eine Dosis von 10 mg/kg Antikörper intravenös appliziert.

sig.: signifikant für $p < 0,05$

n.s.: nicht signifikant für $p < 0,05$

-: nicht getestet, da Versuche nicht in beiden Geschlechtern durchgeführt

4.3.4 Verteilungsvolumen

Nach intravenöser Gabe einer Einzeldosis von 2,5 bzw. 10 mg/kg Antikörper ist das Verteilungsvolumen (V_{ss}) von huMAb<P>, huMAb<I>, huMAb<E> und huMAb<C> in beiden Geschlechtern und in allen untersuchten Mauslinien kleiner als 0,2 l/kg. Exemplarisch für diesen Befund sind in Abbildung 21A, die Verteilungsvolumina von huMAb<P> in weiblichen Tieren aller untersuchten Mauslinien nach einer Applikation von 10 mg/kg gezeigt. Alle untersuchten Antikörper zeigen in Linie mFcRn $-/-$, die geringsten Verteilungsvolumina.

HuMAb<A> unterscheidet sich von den anderen vier Antikörpern, es zeigt in beiden Geschlechtern der Linien C57BL/6J, hFcRn(276) Tg $+/-$, hFcRn(276) Tg $+/+$, hFcRn(32) Tg $+/-$ und hFcRn(32) Tg $+/+$ Verteilungsvolumina, die größer als 0,2 l/kg sind (Abb. 21B). Das Verteilungsvolumen scheint bei diesem Antikörper von der FcRn-Anzahl abzuhängen.

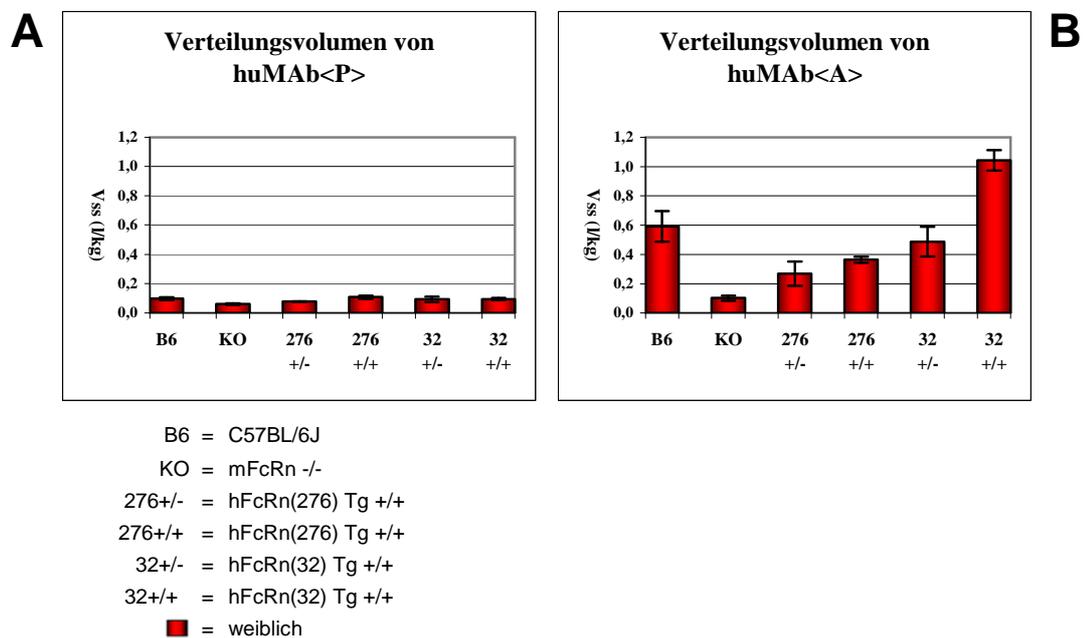


Abbildung 21: Verteilungsvolumina von huMAb<P> und huMAb<A>

Verteilungsvolumina von **A**) huMAb<P> und **B**) huMAb<A> in weiblichen Tieren verschiedener Mauslinien (n = 3–5) nach einer Einmalgabe von 10 mg/kg. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar.

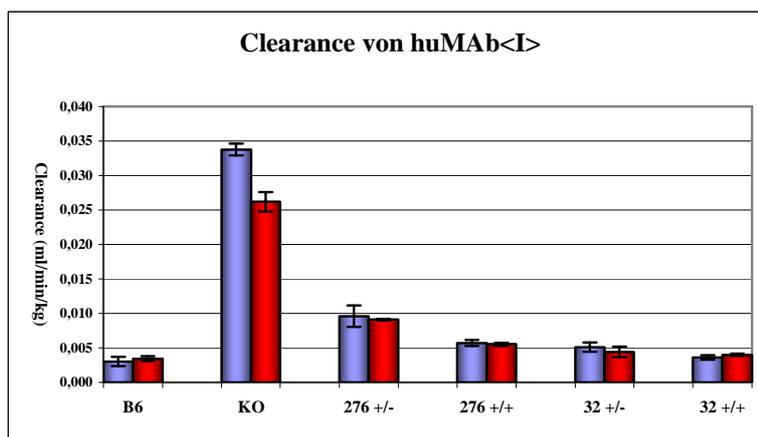
4.3.5 Clearance

Bei allen untersuchten Antikörpern zeigt sich in der Tendenz eine Aufspaltung der Clearance (Cl) unter den Mauslinien wie folgt: mFcRn $-/-$ > hFcRn(276) Tg +/- > hFcRn(276) Tg +/+ \geq hFcRn(32) Tg +/- > hFcRn(32) Tg +/+ \geq C57BL/6J. Diese Aufspaltung ist in Abbildung 22A exemplarisch an huMAb<I> gezeigt.

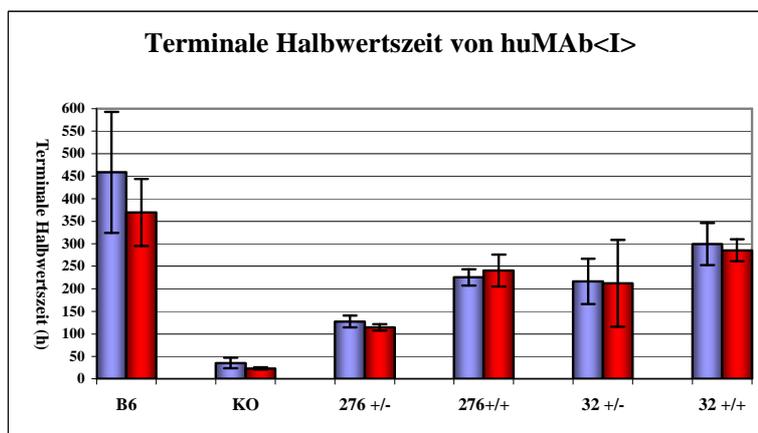
4.3.6 Terminale Halbwertszeit

Alle untersuchten Antikörper weisen tendenziell eine Aufspaltung der terminalen Halbwertszeit ($t_{1/2}$) unter den Mauslinien wie folgt auf: C57BL/6J \geq hFcRn(32) Tg +/+ > hFcRn(32) Tg +/- \geq hFcRn(276) Tg +/+ > hFcRn(276) Tg +/- > mFcRn $-/-$. Diese Aufspaltung ist in Abbildung 22B exemplarisch an huMAb<I> gezeigt.

A



B



B6 = C57BL/6J
 KO = mFcRn $-/-$
 276 +/- = hFcRn(276) Tg +/-
 276 +/+ = hFcRn(276) Tg +/+
 32 +/- = hFcRn(32) Tg +/-
 32 +/+ = hFcRn(32) Tg +/+
 ■ = weiblich
 ■ = männlich

Abbildung 22: Clearance und terminale Halbwertszeit von huMAb<I>

A) Clearance und B) terminale Halbwertszeit von huMAb<I> nach der Gabe von 10 mg/kg an männliche und weibliche Mäuse jeder untersuchten Mauslinie (n = 3–5). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar.

4.3.7 Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve

Bei allen untersuchten Antikörpern zeigt sich in der Tendenz eine Aufspaltung der Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) im Zeitraum 0 – 672 Stunden unter den Mauslinien wie folgt: C57BL/6J \geq hFcRn(32) Tg +/+ > hFcRn(32) Tg +/- \geq hFcRn(276) Tg +/+ > hFcRn(276) Tg +/- > mFcRn -/-. Diese Aufspaltung ist in Abbildung 23 exemplarisch an huMAb<I> gezeigt.

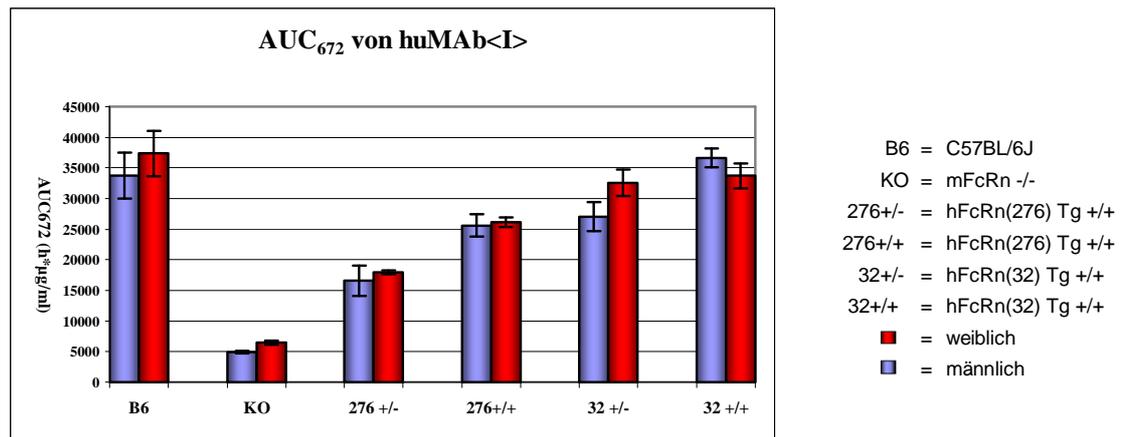


Abbildung 23: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurven von huMAb<I>

Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven im Zeitraum von 0 – 672 Stunden von huMAb<I> nach der Gabe von 10 mg/kg an männliche und weibliche Mäuse jeder untersuchten Mauslinie (n = 3–5). Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar.

4.3.8 Vergleich Maus versus Primat

In der Literatur wird vermutet, dass Mäuse, denen murines FcRn fehlt und die transgenes humanes FcRn exprimieren, ein vielversprechendes Modell sind, um Pharmakokinetiken von humanen IgGs in Primaten vorherzusagen (Roopenian et al. 2003; Petkova et al. 2006). Aus diesem Grund sollte geklärt werden, ob Mäuse, die humanes FcRn exprimieren, geeignet sind, um Pharmakokinetiken in Primaten vorherzusagen. Die berechneten pharmakokinetischen Parameter sind in den Tabellen 26 bis 32 enthalten. Zur Veranschaulichung sind die Konzentrationszeit-Kurven der Mäuse und Primaten in den Abbildungen 24 und 25 dargestellt.

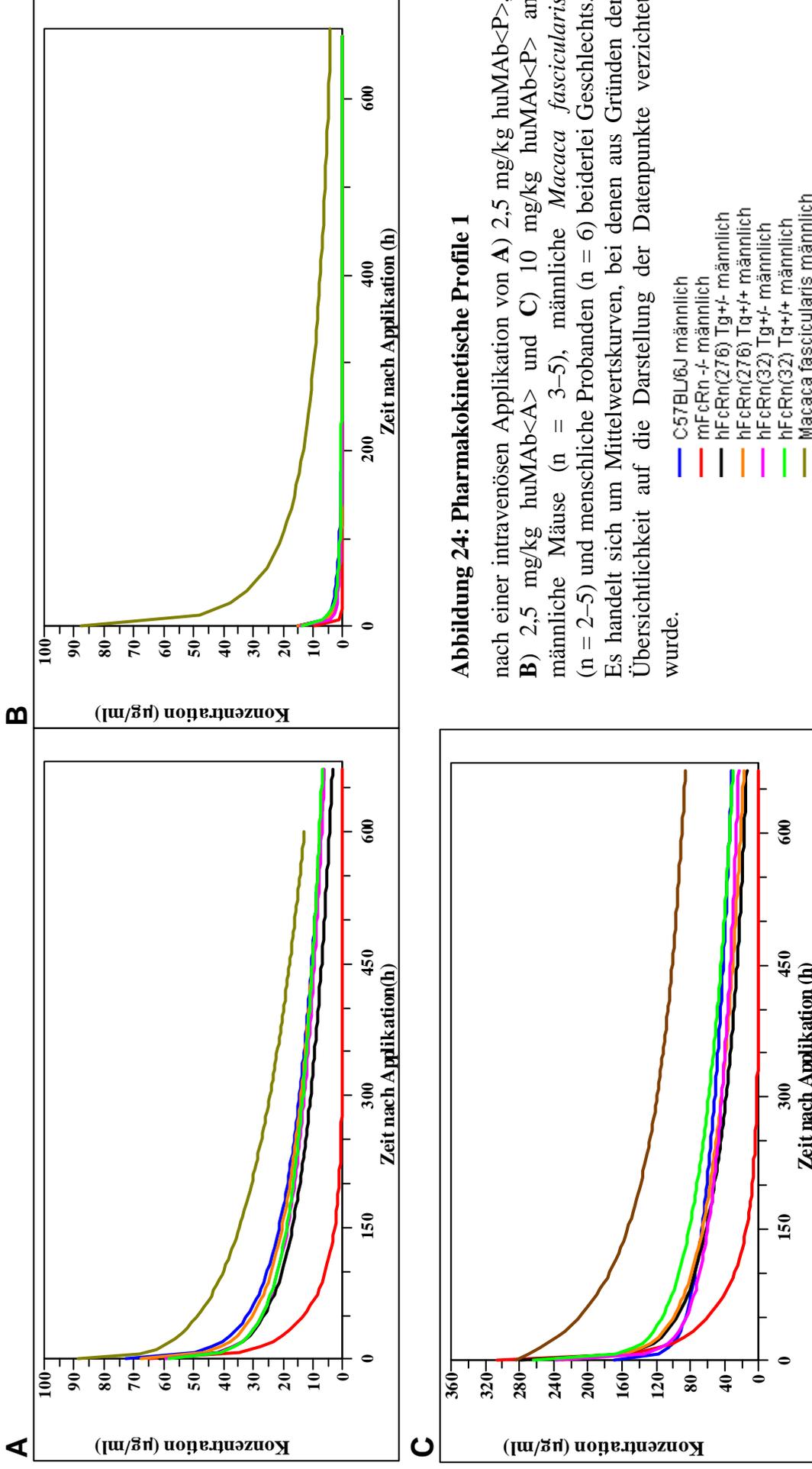
Die pharmakokinetischen Profile von Mäusen und Primaten sind sehr ähnlich; eine Ausnahme stellt das Profil von huMAb<C> beim Primaten dar. Grund für die Abweichung ist eine Immunreaktion gegen huMAb<C>, die die Kinetik beeinflusst.

Die Konzentrations-Zeit-Kurven der Primaten verlaufen bei huMAb<P> und huMAb<A> deutlich über den Kurven der Mäuse (Abb. 24). Dies führt bei den Primaten zu einer erhöhten AUC und terminalen Halbwertszeit bei verringerter Clearance. Bei huMAb<C> verläuft die Kurve ebenfalls bis zum 9. Versuchstag über den Mäusen, ab diesem Zeitpunkt fällt die Kurve aufgrund einer Immunreaktion gegen huMAb<C> schnell ab (Abb. 25C).

Die Kurven der Mäuse von huMAb<A> zeigen in den ersten Stunden einen extrem starken Konzentrationsabfall. Ein solcher Abfall ist bei *Macaca fascicularis* nicht zu beobachten.

Die pharmakokinetischen Profile der Primaten von huMAb<I> und huMAb<E> verlaufen in der Kurvenschar der Mäuse (Abb. 25A und 25B). Die AUC und Clearance zeigen bei *Macaca fascicularis*, den C57BL/6J-Kontrollen und den hFcRn-transgenen Mauslinien ähnlich hohe Werte, die terminalen Halbwertszeiten sind bei *Macaca fascicularis* allerdings verringert.

Die Primaten zeigen bei allen getesteten Antikörpern, selbst bei huMAb<A>, Verteilungsvolumina die kleiner als 0,1 l/kg sind.



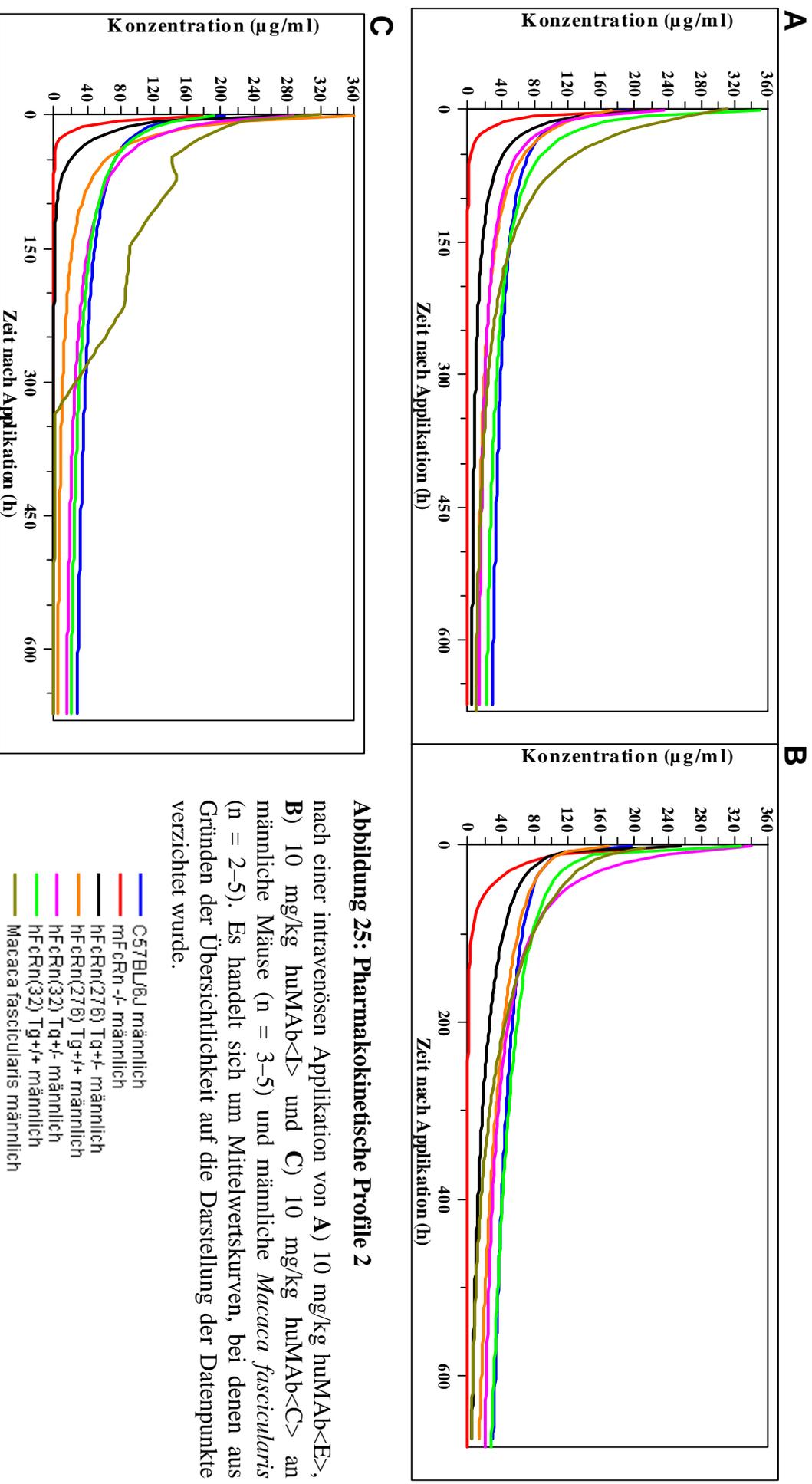


Abbildung 25: Pharmakokinetische Profile 2

nach einer intravenösen Applikation von A) 10 mg/kg huMAb<E>, B) 10 mg/kg huMAb<I> und C) 10 mg/kg huMAb<C> an männliche Mäuse (n = 3–5) und männliche *Macaca fascicularis* (n = 2–5). Es handelt sich um Mittelwertskurven, bei denen aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung der Datenpunkte verzichtet wurde.

4.3.9 Korrelation von *in vitro* mit *in vivo* Daten

In der Literatur finden sich Beschreibungen, dass zwischen SPR-Messungen (*in vitro*) und pharmakokinetischen Parametern (*in vivo*) ein Zusammenhang besteht. Unklar ist allerdings, welcher Bindungsparameter mit der Halbwertszeit bzw. der Clearance vergleichbar ist. Um zu klären, wie stark der statistische Zusammenhang ist, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt und der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) berechnet. Als Berechnungsgrundlage wurden die Daten der fünf verwendeten Antikörper genutzt.

Tabelle 20 belegt, dass bei allen Mauslinien ein starker statistischer Zusammenhang zwischen der apparenten Dissoziationskonstante (k_d) und der Clearance (Cl) besteht ($r = 0,96$ bis $0,99$). Bei den Vergleichen zwischen der apparenten Assoziationskonstante (k_a) bzw. der Gleichgewichtskonstante (K_D) mit der terminalen Halbwertszeit ($t_{1/2}$) zeigt sich, dass je nach Gruppe ein starker bis schwacher Zusammenhang besteht.

Tabelle 20: Korrelation von *in vitro* mit *in vivo* Daten

<i>Linie, Geschlecht</i>	$k_a \leftrightarrow t_{1/2}$	$k_d \leftrightarrow Cl$	$K_D \leftrightarrow t_{1/2}$
C57BL/6J ♀	0,88***	0,96***	0,97***
C57BL/6J ♂	0,71**	0,97***	0,89***
mFcRn -/- ♀	0,84***	0,99***	0,74**
mFcRn -/- ♂	0,46*	0,97***	0,52**
hFcRn(276)Tg +/- ♀	0,74**	0,98***	0,61**
hFcRn(276)Tg +/- ♂	0,42*	0,98***	0,37*
hFcRn(276)Tg +/+ ♀	0,48*	0,99***	0,34*
hFcRn(276)Tg +/+ ♂	0,66**	0,98***	0,59**
hFcRn(32)Tg +/- ♀	0,76***	0,99***	0,98***
hFcRn(32)Tg +/- ♂	0,59**	0,97***	0,74**
hFcRn(32)Tg +/+ ♀	0,60**	0,97***	0,73**
hFcRn(32)Tg +/+ ♂	0,26*	0,97***	0,32*

Pharmakokinetik (*in vivo*): Clearance (Cl), terminale Halbwertszeit ($t_{1/2}$)
 SPR-Messung (*in vitro*): Assoziationskonstante (k_a), Dissoziationskonstante (k_d),
 Gleichgewichtskonstante (K_D)

Die gezeigten Werte stellen Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) dar.

*	$r = 0,2 - 0,49$	schwache Korrelation
**	$r = 0,5 - 0,74$	mittelstarke Korrelation
***	$r > 0,74$	starke Korrelation

5 DISKUSSION

Der erste Teil der Diskussion beschäftigt sich mit der Genotypisierung der Mäuse, da ein sicheres Verfahren benötigt wurde, um die genetisch unterschiedlichen Mauslinien zu differenzieren. Der zweite Teil widmet sich der phänotypischen Charakterisierung der Mauslinien hinsichtlich des Körperwachstums, der Hämatologie und der klinischen Chemie. Im dritten und letzten Teil werden die Ergebnisse der pharmakokinetischen Versuche von therapeutischen Antikörpern an FcRn-modifizierten Mäusen und deren Vergleiche mit Primaten- und SPR-Daten diskutiert.

5.1 Genotypisierung

Da sich die eingesetzten Mauslinien optisch nicht unterscheiden, bedurfte es einer sicheren Methode, um diese zu differenzieren. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von PCR und anschließender Gelelektrophorese das mFcRn-Gen, das Zielkonstrukt für den mFcRn Knock Out, das cDNA-Transgen, das für den hFcRn kodiert und die genomische DNA, die ebenfalls für den hFcRn kodiert, nachgewiesen werden können.

Mit der in der Literatur beschriebenen und hier angewandten Methode ist es nicht möglich nachzuweisen, ob hFcRn-transgene Mäuse für die entsprechenden Genabschnitte homozygot oder heterozygot sind. Durch die eingesetzte PCR unter Verwendung eines Thermo Cycler kann nur getestet werden, ob die Mäuse Träger der gesuchten Genabschnitte sind oder nicht.

Dieses Problem kann durch den Einsatz von Echtzeit-PCR gelöst werden. Bei dieser Methode ist es durch Quantifizierung und Vergleich der entstehenden Fluoreszenzsignale möglich, zwischen homozygoten und heterozygoten Genabschnitten zu unterscheiden (Cashion *et al.* 2004).

Da die Methode recht zeitaufwendig ist, wurden nur die gelieferten Zuchttiere und Stichproben der Tiere für die Versuche untersucht. Es empfiehlt sich eine frühzeitige eindeutige Markierung der Tiere, um eventuellen Verwechslungen vorzubeugen. Bei kleinen Tierzahlen eignet sich die Markierung mit Ohrlöchern, für größere Mengen sind maschinenlesbare Transponder besser geeignet (Donovan and Brown, 2006).

5.2 Phänotypisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Mauslinien mit modifiziertem FcRn und C57BL/6J als Kontrolle phänotypisch charakterisiert. Hierzu wurden die genetisch veränderten Linien mit C57BL/6J hinsichtlich ihres Körperwachstums, ihrer hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter verglichen. Eine solche Charakterisierung ist wichtig, um beim Einsatz der Tiere in pharmakokinetischen Versuchen genetische von substanzinduzierten Befunden unterscheiden zu können.

5.2.1 Körperwachstum

Die Mauslinien C57BL/6J, mFcRn $-/-$, hFcRn(276) Tg $+/-$, hFcRn(32) Tg $+/-$ und hFcRn(32) Tg $+/+$ unterscheiden sich in ihrem durchschnittlichen Körperwachstum nur gering. Die Linie hFcRn(276) Tg $+/+$ weist hingegen im Vergleich mit C57BL/6J ein ca. 7 % geringeres durchschnittliches Körpergewicht auf. Verpaart man weibliche Tiere der Linie hFcRn(276) Tg $+/+$ mit Männchen der Linie mFcRn $-/-$, so dass die heterozygote Linie hFcRn(276) Tg $+/-$ entsteht, verschwindet dieser große Gewichtsunterschied (Abb. 13). Durch die Verpaarung kommt es zu einem Effekt, der die Auswirkung der Genveränderung auf das Wachstum aufhebt. Bei der Zucht der Linie hFcRn(276) Tg $+/+$ wurde beobachtet, dass bei routinemäßigem Absetzen der Jungtiere am 18. Lebenstag eine vermehrte Mortalität der Jungtiere auftrat. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass das geringere Körpergewicht der Jungen mit einer gewissen Unreife einhergeht. Die erhöhte Mortalität der Jungtiere tritt nicht auf, wenn die Jungtiere bis zum 20. Lebenstag bei den Müttern belassen werden.

Vergleicht man die Geschlechter der einzelnen Linien untereinander, zeigt sich, dass die Männchen durchschnittlich 19 – 21 % schwerer sind als die Weibchen. Dieser Geschlechtsdimorphismus ist von C57BL/6 und vielen anderen Mäusestämmen bekannt (www.taconic.com, 2004; www.jaxmice.jax.org, 2007).

Da sich die Mauslinien und die Geschlechter hinsichtlich ihres Durchschnittsgewichts unterscheiden, ist es bei pharmakokinetischen Studien mit diesen Tieren wichtig, dass Pharmaka pro Körpergewicht z.B. mg/kg verabreicht werden, und nicht jedes Tier die gleiche Substanzmenge erhält, wie es in einigen Publikationen (z.B. Petkova et al., 2006; Roopenian et al., 2010) beschrieben steht.

5.2.2 Hämatologie und Klinische Chemie

Die Untersuchung klinisch-chemischer und hämatologischer Parameter stellt einen unersetzlichen Teil der Phänotypisierung von Mauslinien dar, um physiologische Unterschiede in diversen Organsystemen oder Stoffwechselwegen erkennen zu können (Klempt *et al.* 2006). Die physiologische Bandbreite der Parameter ist wichtig, um Ausreißer und pathologische Zustände erkennen zu können (Loeb and Quimby, 1989). Veröffentlichte Daten sind für die Interpretation von Messwerten oft von nur begrenztem Nutzen, da eine große Zahl an nicht standardisierten Variablen zwischen den Laboratorien besteht (Kile *et al.* 2003). Bereits publizierte Daten sind oft unbrauchbar, da die Analysemethoden nicht ausreichend beschrieben werden, die Messtemperatur nicht angegeben ist oder variiert, gepoolte Proben gemessen oder nicht aussagekräftige Populationen vermessen werden (Boehm *et al.* 2007b). Nicht nur die Analytik hat einen großen Einfluss auf Blutwerte, so konnte bewiesen werden, dass eine Vielzahl an Parametern von den Haltungsbedingungen beeinflusst ist (Klempt *et al.* 2006).

Mäuse mit modifiziertem FcRn stellen ein wichtiges und häufig verwendetes Modell bei der Erforschung therapeutischer Antikörper dar. In der Literatur finden sich aber nur vereinzelt physiologische Laborwerte, die oft von sehr geringen Tierzahlen stammen. Eine breite Untersuchung der üblichen Laborwerte ist zurzeit für diese Mäuse nicht verfügbar. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit eine Vielzahl an klinisch-chemischen und hämatologischen Daten für die vier verwendeten Mauslinien erhoben.

Für diese Arbeit wurden nur klinisch gesunde Tiere gleichen Alters und aus der gleichen Zuchteinrichtung verwendet. Da einige Laborwerte geschlechtsspezifisch sind, wurden die Geschlechter getrennt untersucht. Es wurden keine Referenzbereiche für die Blutparameter definiert, da hierfür ca. 120 Individuen vermessen werden sollten (Kraft and Dürr, 2005). Aus diesem Grund sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. In Inzuchtstämmen ist die genetische Variabilität sehr gering, daher reicht schon eine geringe Tierzahl aus, um Unterschiede sicher nachweisen zu können.

5.2.2.1 Vergleich Messwerte C57BL/6J und Literaturangaben für C57BL/6

Zum Großteil liegen die gemessenen Werte im Bereich der publizierten Messbereiche. Abweichungen zeigen sich bei Eisen, α -Amylase, Laktatdehydrogenase, Glukose, Low-density Lipoprotein-Cholesterin, Kreatinin, Leukozytenzahl und MPV. Als Ursachen für die Abweichungen kommen eine Vielzahl von Möglichkeiten in Frage, wie z.B. Tieralter, Fütterung, Blutentnahmetechnik, Analysegerät, Messmethode, Probenmaterial, Probenlagerung und Messtemperatur. Um solche Differenzen zu vermeiden, sollten wenn möglich standardisierte Tiergruppen verglichen werden.

5.2.2.2 Endogenes murines IgG

FcRn bindet pinozytotisch aufgenommenes IgG in sauren Endosomen und transportiert es zurück an die Zelloberfläche. Diese Funktion schützt IgG vor dem schnellen intrazellulären Abbau (Ward *et al.* 2003) und ist somit für die lange Halbwertszeit von IgG, wie auch für seine hohe Serumkonzentration verantwortlich (Roopenian *et al.* 2010). FcRn defiziente Mäuse besitzen stark erniedrigte endogene IgG-Spiegel. Grund hierfür ist der erhöhte IgG-Katabolismus in Mäusen ohne murines FcRn (Ghetie *et al.*, 1996; Israel *et al.*, 1996; Junghans and Anderson, 1996; Roopenian *et al.*, 2003).

Dieser Effekt kann auch bei Linie mFcRn $-/-$ beobachtet werden (Abb. 16), da sie aufgrund des Gen-Knockouts kein FcRn exprimiert. Diese Mauslinie besitzt nur ca. 10 % des IgGs der Kontrolltiere. Die Linien hFcRn(276) Tg +/-, hFcRn(276) Tg +/+, hFcRn(32) Tg +/- und hFcRn(32) Tg +/+ besitzen ebenfalls nur ca. 10 % des IgGs der Kontrolltiere. Da das endogene murine IgG praktisch keine Affinität zu humanem FcRn besitzt (Ober *et al.* 2001), kann das humane FcRn der humantransgenen Mäuse das endogene murine IgG nicht vor dem Abbau schützen. Aus diesem Grund besitzen Mäuse, die kein funktionelles murines FcRn besitzen, aber transgen für das humane FcRn sind, ebenfalls sehr niedrige endogene IgG-Spiegel.

Endogene IgGs stellen kompetitive Antagonisten für therapeutische Antikörper dar. Grund hierfür ist, dass sie um die gleichen FcRn-Bindungsstellen konkurrieren. Somit beeinflusst der endogene IgG-Spiegel und die Bindungsaffinität von IgG zu FcRn die Pharmakokinetik von therapeutischen Antikörpern (Datta-Mannan *et al.* 2007b). Da in hFcRn-transgenen Mäusen die

FcRn-Rezeptorsättigung durch das Fehlen von endogenem IgG reduziert ist, kann sich die Halbwertszeit rekombinanter humaner IgGs erhöhen (Vaccaro *et al.* 2006). Zusätzlich ist die Affinität von hFcRn zu murinem IgG sehr gering, was die Konkurrenz noch weiter einschränkt (Ober *et al.* 2001). Diese Besonderheit muss bei der Interpretation pharmakokinetischer Daten bedacht werden, wenn Versuche an Tieren mit niedrigem endogenem IgG-Spiegel durchgeführt werden. Um dieses Problem zu beheben, appliziert Petkova in einigen Versuchen vor dem eigentlichen Versuchsbeginn IgG (2 mg gereinigtes humanes IgG pro Maus), das mit dem therapeutischen Antikörper um FcRn konkurrieren soll, um so die physiologische Situation nachzustellen (Petkova *et al.* 2006).

5.2.2.3 Albumin

Da FcRn auch Albumin vor dem intrazellulären Abbau schützt, beeinflusst der Rezeptor somit direkt die Höhe des Serumalbuminspiegels (Kim *et al.* 2006). Für den Serumalbuminspiegel sind sowohl die FcRn-Anzahl wie auch die Affinität von FcRn zu Albumin ausschlaggebend. Mäuse, die kein oder wenig FcRn besitzen, leiden an Hypalbuminämie (Chaudhury *et al.* 2003). Hypalbuminämie führt zu einer Hochregulation der Synthese von Proteinen, die in der Leber gebildet werden, wie Albumin und Transferrin (Kim *et al.* 2006). Als Ursache wird der niedrige kolloidosmotische Druck des Blutes bei Albuminmangel vermutet (Peters, 1996).

Der signifikant erniedrigte Albuminspiegel der Linie mFcRn $-/-$ (-32 %) kann somit aus dem Fehlen von FcRn erklärt werden (Abb. 17G). Kim und Kollegen fanden bei Mäusen mit defizientem FcRn ebenfalls erniedrigte (-42 %) Albuminwerte (Kim *et al.* 2006).

Ursächlich für den leicht erniedrigten (-5 %) Albuminspiegel der Linie hFcRn(276) Tg $+/+$ ist wahrscheinlich, dass sie von den humantransgenen Linien am wenigsten FcRn besitzt, und die erhöhte Albuminsynthese der Leber nicht ausreicht, um die Serumkonzentration der Kontrolltiere zu erreichen. Die Linie hFcRn(32) Tg $+/+$ besitzt leicht erhöhte (+10 %) Albuminspiegel.

Da die Höhe des Albuminspiegels nicht nur von der FcRn-Expression und der Affinität von FcRn zu Albumin abhängt, sondern bei Hypalbuminämie auch die Albuminsynthese in der Leber erhöht ist, kann vom Albuminspiegel der Mäuse nicht auf die FcRn-Expression geschlossen werden.

Die meisten der folgenden Veränderungen der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter lassen sich durch die Beeinflussung des Albumins erklären, da Albumin seine drei Hauptaufgaben im Blut nicht oder nur unzureichend erfüllen kann. In gesunden Wildtyp-Tieren ist Albumin für 80 % des kolloidosmotischen Drucks verantwortlich, es stellt den größten Teil des Säure/Base-Puffers der Plasmaproteine und ist Transportprotein für eine Vielzahl an Substanzen. Es bindet und transportiert, z.B. Fettsäuren, Eikosanoide, Gallensäuren, Vitamin D, Bilirubin, Kalzium, Chlorid, Magnesium, Tryptophan, Thyroxin und Steroide, zu denen Cortisol, Progesteron, Testosteron und Aldosteron gehören (Peters, 1996).

5.2.2.4 C-reaktives Protein

Das C-reaktives Protein (CRP) wird wie Albumin in der Leber synthetisiert. Es zählt zu den Akute-Phase-Proteinen, in der Diagnostik gilt es als Entzündungsparameter und wird beim Verdacht auf bakterielle Entzündungen bestimmt. Unter normalen Bedingungen wird CRP bei der Maus nur gering exprimiert und steigt bei der Akute-Phase-Reaktion nur gering an (Trion *et al.* 2005). Bei der Maus findet sich mehr Serum-Amyloid P als CRP; es ist der signifikantere Marker der Akute-Phase-Reaktion im Gegensatz zu Ratten und Mensch (Ochrietor *et al.* 2000). In der Literatur finden sich Beschreibungen, dass Mäuse, die keinen funktionellen FcRn besitzen, anfälliger für bestimmte Infektionen sind als Wildtyp-Mäuse. Es wird vermutet, dass der geringe endogene IgG-Spiegel ursächlich für den häufigeren bakteriellen Befall ist (Qiao *et al.* 2008; Yoshida *et al.* 2006; Crowley *et al.* 2006). Da nur die Linie mFcRn *-/-* im Vergleich mit den Kontrollen signifikant erhöhtes CRP zeigt (Abb. 17I), aber alle FcRn-modifizierten Linien niedrige endogene IgG-Spiegel besitzen, wird davon ausgegangen, dass die Erhöhung bei Linie mFcRn *-/-* auch aus der gesteigerten Proteinsynthese der Leber bei Hypalbuminämie stammt und kein vermehrter bakterieller Befall der Mäuse vorlag. Brauchbare CRP-Referenzwerte für C57BL/6J konnten in der Literatur nicht gefunden werden, da bei Mäusen meist Serum-Amyloid P bestimmt wird.

Die kompletten Messwerte einer hFcRn(276) Tg *+/+* Maus wurden aus der Beurteilung ausgeschlossen, da sie einen extrem hohen CRP-Wert besaß, weshalb eine bakterielle Entzündung vermutet wurde.

5.2.2.5 Gesamteiweiß

Da Albumin das mengenmäßig häufigste Plasmaprotein ist (Peters, 1996), zeigen sich beim Gesamteiweiß die gleichen Unterschiede zwischen den Linien wie bei Albumin (Abb. 17H). Im Vergleich zu den Kontrollen besitzt die Linie mFcRn -/- einen signifikant erniedrigten Proteinspiegel (-20 %), der Wert der Linie hFcRn(276) Tg +/+ ist leicht erniedrigt (-3 %) und der Wert der Linie hFcRn(32) Tg +/+ ist leicht erhöht (+7 %). Zu den Veränderungen der Proteinkonzentration im Serum tragen zusätzlich das niedrige IgG und die veränderten Transferrin- und CRP-Spiegel bei. Sie beeinflussen den Eiweißwert aber nur wenig, da ihre Serumkonzentration im Vergleich zu Albumin gering ist. Zu ähnlichen Ergebnisse kamen Kim und Kollegen. Sie fanden in FcRn-defizienten Mäusen 17 % weniger Eiweiß als in Wildtyp-Tieren (Kim *et al.* 2006).

5.2.2.6 Bilirubin

Da Mäuse im Vergleich zum Menschen viel niedrigere Bilirubinspiegel besitzen (Boehm *et al.* 2007b), die meisten Messgeräte aber für die Analyse von humanen Proben entwickelt werden, ist es diesen Geräten oft nicht möglich, die niedrigen Bilirubinkonzentrationen von murinen Proben zu bestimmen. Auch bei dieser Arbeit lagen die Bilirubinwerte der Proben größtenteils unterhalb oder im Bereich der unteren Messgrenze des Analysegeräts. Aus diesem Grund wurden die Bilirubinwerte in dieser Arbeit nicht dargestellt. Albumin bindet am stärksten hydrophobe organische Anionen, zu denen Fettsäuren und Bilirubin gehören (Peters, 1996). Eine Erhöhung des Bilirubins, wie sie bei Hypalbuminämie vorkommen kann, war nicht nachzuweisen. Eine gesenkte Kapazität des Bilirubintransports bei Serumproteinmangel kann bis zu einem bestimmten Maße durch einen HDL-gebundenen Transport ausgeglichen werden (Peters, 1996).

5.2.2.7 Lipide und Lipoproteine

Albumin stellt auch das Hauptbindungsprotein für Fettsäuren in der extrazellulären Flüssigkeit dar. Das dominante Lipoprotein des Menschen ist Low-Density Lipoprotein-Cholesterin (LDL). Im Gegensatz dazu besitzen Mäuse viel High-Density Lipoprotein-Cholesterin (HDL) (Aigner *et al.* 2007; Dietschy and Turley, 2002). Ratten und Patienten mit Analbuminämie weisen erhöhte Lipoproteinspiegel auf; vor allem ist LDL erhöht. Zusätzlich wurden erhöhte Triglyceride, Phospholipide, Cholesterin, HDL und normale oder leicht gesenkte

Werte an freien Fettsäuren gemessen (Nagase *et al.* 1979; Van *et al.* 1991; Peters, 1996). Die Beobachtung, dass freie Fettsäuren in LDL akkumulieren, zeigt die kompensatorische Rolle von LDL für den Transport freier Fettsäuren im vaskulären Kompartiment bei niedrigen Albuminspiegeln an (Peters, 1996).

Es ist anzunehmen, dass die signifikanten Veränderungen (Abb. 17) der Cholesterinwerte (Cholesterin, LDL, HDL) der mFcRn *-/-* im Vergleich zu den Kontrollen auf einen ähnlichen Mechanismus zurückzuführen sind. Bemerkenswert ist, dass Mäuse der Linien hFcRn(276) Tg *+/+* und hFcRn(32) Tg *+/+* im Vergleich zu C57BL/6J zum Teil auch signifikant veränderte Konzentrationen von LDL, HDL und/oder freien Fettsäuren im Serum aufweisen, obwohl bei ihnen nur leicht erniedrigte bzw. erhöhte Albuminwerte nachgewiesen wurden.

5.2.2.8 Knochenstoffwechsel

Albumin spielt eine wichtige Rolle als Kalzium-bindendes Protein im Serum. Die Bindung ist schwach, aber vom physiologischen und klinischen Standpunkt hoch signifikant. Im Blut sind 45 % des Kalziums frei, 45 % sind an Serumproteine gebunden und 10 % sind mit Citrat und Phosphat komplexiert (Peters, 1996). Eine Reduktion des Serumalbumins führt zu einer Erniedrigung des freien Kalziums (Ladenson *et al.* 1979); dies kann wiederum den Knochenstoffwechsel beeinflussen, indem die Sekretion von Parathormon inhibiert wird (Inaba *et al.* 2000). Analbumine Nagase-Ratten zeigen allerdings keine erniedrigten Kalziumwerte (Inaba *et al.* 2000).

Bei mFcRn *-/-* Mäusen mit stark erniedrigtem Albumin könnte eine solche Beeinflussung des Knochenstoffwechsels ursächlich für die niedrigen Kalziumwerte sein (Abb. 17A).

Auch die erhöhte alkalische Phosphatase bei mFcRn *-/-* Mäusen ist wahrscheinlich auf eine Beeinflussung des Knochenstoffwechsels zurückzuführen (Abb. 17O).

Bei hFcRn-transgenen Mäusen ist keine signifikante Veränderung des Kalziums und der alkalischen Phosphatase nachweisbar.

5.2.2.9 Enzyme

Bei den Enzymaktivitäten der Kreatinkinase, Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase zeigen einige Gruppen der Mäuse mit modifiziertem FcRn signifikant erniedrigte Werte im Vergleich zu C57BL/6J (Tab. 18).

Bei der Interpretation dieser Enzymwerte geht man bei einigen Tierarten erst ab einer dreifachen Enzymaktivität von einer hochgradigen Aktivitätssteigerung aus. Für Mäuse konnten keine solchen Empfehlungen für die Interpretation gefunden werden. Für die Kreatinkinase ist beschrieben, dass die Referenzwerte stark laborspezifisch sind, weshalb laborinterne Referenzwerte erhoben werden sollten (Kraft and Dürr, 2005).

Die durch die Blutabnahme entstandenen Gewebeerletzungen sind mit großer Wahrscheinlichkeit ursächlich für die Schwankungen der Enzymaktivitäten von Kreatinkinase, Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase zwischen den Mäusen. Für Hunde ist z.B. belegt, dass schon eine intramuskuläre Injektion zu leicht erhöhten Werten führt, die allerdings schon mehrere hundert U/l ausmachen kann (Kraft and Dürr, 2005).

Die Laktatdehydrogenase ist ein gewebeunspezifisches Enzym. Ihre Aktivität steigt bei Entzündungen und degenerativen Prozessen (Kraft and Dürr, 2005). Da nur erhöhte Werte von Bedeutung sind, ist der signifikant erniedrigte Wert der Linie hFcRn(276) Tg +/+ ♀ mit großer Wahrscheinlichkeit ohne Belang.

Die Nahrung von Mäusen ist reich an Rohfaser und Zellulose; diese Kohlenhydrate werden durch α -Amylase in kleinere Fragmente gespalten. Bei Nagern ist die α -Amylase-Aktivität viel höher als beim Menschen (Boehm *et al.* 2007b). Die geringgradigen aber signifikanten Erhöhungen der α -Amylase-Aktivität der Gruppen mFcRn -/- ♂, hFcRn(32) Tg +/+ ♂ und hFcRn(32) Tg +/+ ♀ könnten ein Hinweis für eine erhöhte Leberaktivität sein, da ein großer Teil der α -Amylase in der Leber gebildet wird (MacKenzie and Messer, 1976).

Lipase ist ein für die Fettverdauung verantwortliches Enzym und wird im Pankreas in aktiver Form sezerniert. Sie zeigt im Vergleich der Mauslinien keine signifikanten Unterschiede.

5.2.2.10 Glukose

Die eingesetzten Mäuse weisen eine große Variabilität der Serumglukose auf. Die Werte sind im Vergleich zu C57BL/6J teilweise signifikant erniedrigt (Abb. 17N). Da den Tieren Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung standen und die Blutglukose vom Zeitpunkt der letzten Futteraufnahme abhängt, waren große Schwankungen der Glukosespiegel zu erwarten.

Die Glukosewerte wurden zusätzlich durch die Serumgewinnung beeinflusst. Das Blut wurde ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor Serum gewonnen wurde. Da dem Blut kein Glykolyseinhibitor zugesetzt war, bauten die enthaltenen Blutzellen Glukose ab und senkten so den ursprünglichen Glukosewert.

Die gemessenen Glukosewerte sind bei allen Linien höher als die von Jackson Laboratories angegebenen Vergleichswerte; die ebenfalls von gefütterten C57BL/6J stammen (www.jaxmice.jax.org, 2007).

Es gibt Berichte, dass C57BL/6J an einer Glukoseintoleranz leiden und wenig Insulin sezernieren. Diese Glukoseintoleranz soll zu erhöhten Glukosewerten bei C57BL/6J im Vergleich zu anderen Inzuchtstämmen führen und altersabhängig sein (Freeman *et al.* 2006).

5.2.2.11 Harnpflichtige Substanzen

Akilesh und Kollegen zeigten 2008, dass FcRn von Podozyten der Niere exprimiert wird; hier soll FcRn IgG von der glomerulären Basalmembran entfernen. Bei Mäusen, denen FcRn fehlt, akkumuliert im Alter IgG in der glomerulären Basalmembran (Akilesh *et al.* 2008). Diese Akkumulation führt bei Mäusen ohne funktionelles FcRn zu einer seruminduzierten Nephritis (Ward and Ober, 2009).

Zur Beurteilung der Nierenfunktion wurden Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure gemessen. Die Harnsäurewerte der FcRn-modifizierten Linien sind im Vergleich mit C57BL/6J leicht erhöht. Die erhöhten Werte befinden sich aber alle im Bereich der laut Literatur zu erwartenden Werte (Boehm *et al.* 2007b; Klempt *et al.* 2006). Die Werte für Harnstoff und Kreatinin zeigen im Vergleich mit den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen (Tab. 18). Diese Ergebnisse belegen, dass bei 50 Tage alten Mäusen mit modifiziertem FcRn keine nachweisbare Beeinflussung der Nierenfunktion vorliegt.

5.2.2.12 Elektrolyte

Der Chloridspiegel ändert sich bei pH-Veränderungen des Blutes. So kann eine Hyperchlorämie für eine Azidose und eine Hypochlorämie für eine Alkalose verantwortlich sein (Kraft and Dürr, 2005). Da Albumin den größten Teil des Säure/Base-Puffers der Plasmaproteine stellt (Peters, 1996) und die Albuminspiegel der FcRn-modifizierten Mäuse beeinflusst sind, wäre es möglich, dass die veränderten Chloridspiegel (Abb. 17B) der FcRn-modifizierten Mäuse die Folge eines veränderten Blut-pH-Werts sind. Zusätzlich wird ein Teil des Chlorids an Albumin-gebunden transportiert.

Obwohl Albumin einen Teil der Mineralkortikoide transportiert und demzufolge Änderungen der Albuminspiegel auch die Spiegel der Mineralkortikoide beeinflussen, sind bei Natrium, Kalium und anorganischem Phosphat keine bemerkenswerten Veränderungen zwischen den Linien zu erkennen. Die geringen Unterschiede liegen alle im Bereich der zu erwartenden Referenzwerte.

5.2.2.13 Eisenstoffwechsel

Bei den mit dem Eisenstoffwechsel-assoziierten Parametern (Transferrin, Eisen, ungesättigte und gesamte Eisenbindungskapazität) zeigen sich ebenfalls linienspezifische Unterschiede (Abb. 17).

In der Literatur ist beschrieben, dass es bei Hypalbuminämie zu einer vermehrten kompensatorischen Synthese von Proteinen in der Leber kommt (Kim *et al.* 2006). Neben Albumin wird auch verstärkt Transferrin synthetisiert. Hierdurch kann wahrscheinlich auch das leicht erhöhte Transferrin der mFcRn $-/-$ Mäuse erklärt werden. Beim Transferrin ist bemerkenswert, dass auch einzelne Tiere der Gruppen hFcRn(276) Tg $+/+$ ♂, hFcRn(276) Tg $+/+$ ♀, hFcRn(32) Tg $+/+$ ♀ stark erhöhte Transferrinwerte aufweisen (Abb. 15), obwohl die Linie hFcRn(276) Tg $+/+$ nur leicht erniedrigtes und die Linie hFcRn(32) Tg $+/+$ leicht erhöhtes Albumin zeigt. Andere Autoren fanden ebenfalls erhöhte Transferrinwerte (25 %) bei FcRn-defizienten Mäusen (Kim *et al.* 2006).

Die durchschnittliche Transferrinkonzentration und die von ihr abhängigen Eisenbindungskapazitäten (UIBC und TIBC) sowie die Eisenkonzentration im Serum waren bei Linien mit verändertem FcRn erhöht. Die gesamte Eisenbindungskapazität (TIBC) repräsentiert die maximale Konzentration an Eisen, die von Serumproteinen gebunden werden kann, und berechnet sich aus der

Summe des vorhandenen Eisens und der ungesättigten Eisenbindungskapazität. Der „Olympus AU400“ misst sie mit einem Kit. Da Transferrin das wichtigste Eisenbindungsprotein im Serum ist, entspricht eine hohe Transferrinkonzentration auch einer hohen gesamten Eisenbindungskapazität und umgekehrt. Die Transferrinsättigung ist nur bei der Gruppe hFcRn(32) Tg +/+ im Vergleich zu C57BL/6J signifikant erniedrigt. Bei den anderen genetisch modifizierten Gruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied, da bei ihnen sowohl die Transferrinkonzentration als auch die Eisenkonzentration erhöht sind.

5.2.2.14 Rotes Blutbild

Beim roten Blutbild zeigt die Linie mFcRn -/- im Vergleich mit C57BL/6J eine signifikant erhöhte Erythrozytenzahl, einen erhöhten Hämatokrit und eine erhöhte Hämoglobinkonzentration. Signifikant erniedrigt sind das Mittlere Korpuskuläre Volumen und das Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin (Abb.14). Diese Befunde sprechen für eine Aktivierung und Beschleunigung der Hämatopoese. Bei der Retikulozytenzahl zeigen die Mäuse keine signifikanten linienspezifischen Unterschiede. Eine alimentär bedingte Hämokonzentration kann ausgeschlossen werden, da den Tieren zu jeder Zeit Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung gestanden hat. Die Linien hFcRn(276) Tg +/+ und hFcRn(32) Tg +/+ zeigen ein unauffälliges rotes Blutbild; hier sind nur bei den Männchen von hFcRn(276) Tg +/+ der Hämatokrit und bei den Weibchen von hFcRn(32) Tg +/+ die Mittlere Korpuskuläre Hämatokrit-Konzentration leicht erhöht.

Es besteht die Möglichkeit, dass durch den niedrigen Albuminspiegel und den damit gesenkten kolloidosmotischen Druck das Blutvolumen der mFcRn -/- Mäuse beeinträchtigt ist. Die Standardmethode der Blutvolumenbestimmung mit Evans Blue (Gibson and Evans, 1937) konnte bei diesen Mäusen nicht angewendet werden, da diese Methode auf dem Prinzip beruht, dass der intravenös verabreichte Farbstoff an Albumin bindet und so die Blutgefäße nicht verlassen kann. Die Alternativmethoden beruhen auf dem Einsatz radioaktiver Isotope. Hierfür standen keine geeigneten Laborräume zur Verfügung.

Die Erythrozytenverteilungsbreite ist ein Maß für die Größenverteilung der Erythrozyten. Bei ihr sind keine signifikanten linienspezifischen Unterschiede nachzuweisen.

5.2.2.15 Thrombozyten

Der Vergleich von Thrombozytenzahlen mit publizierten Quellen ist sehr schwierig, da es drei hauptsächlich eingesetzte Methoden gibt, die nicht standardisiert sind und sehr unterschiedliche Ergebnisse erbringen (siehe z.B. Tab. 22). Zur Thrombozytenmessung werden immunologische Verfahren, optische Verfahren und Impedanzmessungen eingesetzt. Beim Vergleich der Verfahren zeigt sich, dass Impedanzmessungen größere Werte (~25 %) erbringen als immunologische Messungen, die ihrerseits wiederum größere Werte (~13 %) als optische Messungen ergeben. Die meisten Analysegeräte nutzen das Impedanzverfahren, von dem angenommen wird, dass es die Zahl an Thrombozyten überschätzt (Johannessen *et al.* 2001).

Ein weiteres methodisches Problem ist, dass die verwendete Antikoagulanz maßgeblich das Messergebnis beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass Messungen an EDTA-Blut 6 – 20 % größere Werte ergeben als Messungen an Citrat-Blut (Seghatchian, 2006).

Das in dieser Arbeit eingesetzte Analysegerät nutzt das Impedanzverfahren. Es wurden bei fast allen Mauslinien ähnliche Thrombozytenzahlen im Bereich von $1,2 * 10^6/\mu\text{l}$ gemessen. Nur die Gruppe hFcRn(276) Tg +/+ ♀ zeigt im Vergleich zu C57BL/6J einen signifikant erniedrigten Wert, diese Erniedrigung ist aber nur als geringgradig einzustufen (Abb. 14C).

Bei allen Mauslinien besitzen die männlichen Tiere höhere Thrombozytenzahlen als die Weibchen, dieser Geschlechtsdimorphismus ist bei Mäusen bekannt (Kile *et al.* 2003).

Beim Mittleren Thrombozytenvolumen sind zwischen den Linien keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen.

5.2.2.16 Leukozytenzahl

Es wurden große Varianzen der Leukozytenzahlen innerhalb und zwischen den Gruppen beobachtet (Abb. 14A). Schwankungen können nur ein Hinweis auf abnormale körperliche Zustände sein, da auch eine Vielzahl an physiologischen Geschehnissen (Erregungszustände, körperliche Belastung, Tachykardie, Geburt) eine Veränderung der Leukozytenzahl zur Folge haben kann (Kraft and Dürr, 2005).

Da alle eingesetzten Linien als genetischen Hintergrund C57BL/6J besitzen (Roopenian *et al.* 2010) und dieser Inzuchtstamm sehr stressanfällig ist (www.jaxmice.jax.org, 2007), kann vermutet werden, dass ein Teil der Schwankungen stressbedingt sind.

Bis auf die Linie hFcRn(32) Tg +/+ zeigt sich, dass männliche Mäuse eine höhere Leukozytenzahl besitzen als weibliche Tiere. Diese Beobachtung wird von anderen Autoren dadurch erklärt, dass es bei in Gruppen gehaltenen männlichen Mäusen häufiger zu Rankämpfen kommt, und durch die entstehenden Verletzungen ihr Immunsystem häufiger zur Bildung von neutrophilen Granulozyten angeregt wird (Kile *et al.* 2003).

5.2.2.17 Fazit

Die vorliegende Arbeit beweist, dass die genetische Manipulation des FcRn einen großen Einfluss auf die Serumkonzentration seiner Hauptliganden, IgG und Albumin hat. Mäuse ohne FcRn besitzen nur ca. 10 % des endogenen IgG von Kontrolltieren, da bei ihnen kein FcRn abhängiges Recycling von IgG stattfinden kann. Auch Mäuse, denen murines FcRn fehlt und die transgenes humanes FcRn exprimieren, zeigen nur 10 % des endogenen IgG von Kontrolltieren, da humanes FcRn praktisch keine Affinität zu murinem IgG besitzt.

Bei Mäusen, die kein FcRn besitzen, werden zusätzlich sehr niedrige Albuminspiegel gemessen, da dieses ebenfalls nicht recycelt werden kann. Mäuse, die den humanen FcRn exprimieren, zeigen relativ normale Albuminspiegel, da humanes FcRn eine gewisse Affinität zu murinem Albumin besitzt und es somit vor dem Abbau geschützt wird.

Die meisten anderen signifikanten Veränderungen der klinisch-chemischen Parameter sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Beeinflussung des Albuminspiegels zurückzuführen. Da dieses seine Aufgaben wie Substanztransport, Pufferfunktion und die Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Drucks nicht erfüllen kann.

Interessanterweise ist auch der Leberstoffwechsel der Linien hFcRn(276) Tg und hFcRn(32) Tg beeinflusst, obwohl sie annähernd normale Albuminwerte aufweisen. Dies zeigt sich vor allem an den zum Teil erhöhten Transferrinwerten dieser Tiere. Wahrscheinlich sind die annähernd normalen Albuminwerte ein Produkt aus FcRn abhängigem Recycling und erhöhter Synthese in der Leber.

Auch die hämatologischen Veränderungen der Linie mFcRn -/- sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf den erniedrigten Albuminwert zurückzuführen. Hinweisend dafür ist, dass auch bei Ratten mit Analbuminämie eine Anämie auftritt (Sugiyama *et al.* 1984). Zusätzlich ist bekannt, dass chronische Hypalbuminämie beim Menschen, verursacht durch nephrotisches Syndrom, Enteropathien oder Tumorerkrankungen eine Anämie zur Folge haben (Peters, 1996). Die Hämatologie der Linien hFcRn(276) Tg und hFcRn(32) Tg, die annähernd normale Albuminspiegel besitzen, ist unauffällig.

5.3 Pharmakokinetik therapeutischer Antikörper

Die Pharmakokinetik im engeren Sinn befasst sich mit dem zeitlichen Verlauf der Konzentration eines Pharmakons im Organismus (Forth *et al.* 2005). Pharmakokinetische Analysen sind ein essentieller Bestandteil bei der Medikamentenentwicklung. Problematisch ist allerdings, dass auf Antikörpern-basierende Therapeutika oft pharmakokinetische Eigenschaften zeigen, die viel komplexer sind als die von kleinen Molekülen (< 1 kDa) (Wang *et al.* 2008).

5.3.1 Kurvenverlauf pharmakokinetischer Profile

Nach der intravenösen Gabe von 2,5 bzw. 10 mg/kg der Antikörper werden diese in biphasischer Weise aus der Zirkulation der Mäuse entfernt (Abb. 18). Die Profile der Konzentrations-Zeit-Kurven der Antikörper sind in den unterschiedlichen Mäusen sehr ähnlich und differenzieren primär durch die Höhe der Serumkonzentrationen. Dieser Verlauf wird auch als linearer Verlauf bezeichnet, da bei halblogarithmischer Darstellung der Kurve die β -Phase eine Gerade beschreibt. Ein solcher biphasischer Verlauf ist für intravenös verabreichte IgGs typisch, wenn „Zielstruktur-vermittelte Medikamenten-Disposition“ (TMDD) keine Rolle spielt (Ghetie and Ward, 2002). Bei Antikörpern, die gegen zellgebundene Antigene gerichtet sind, ist eine TMDD häufig (Mould and Green, 2010). Durch TMDD kommt es zu komplexen nichtlinearen Kinetiken mit mehr als den üblichen zwei Phasen (Mager and Jusko, 2001; Mager, 2006). Zeigt sich beim Mensch eine TMDD, ist diese bei Labortieren nur zu sehen, wenn Kreuzreaktivität zwischen tierischem Antigen und therapeutischem Antikörper besteht. Bei Labortieren tritt sie häufig bei nichthumanen Primaten auf, da ihre Antigene den menschlichen sehr ähnlich sind; bei Mäusen ist sie eher selten (Mould and Green, 2010; Mahmood and Green, 2005; Mahmood, 2009b).

Auch eine Immunreaktion gegen das verabreichte Therapeutikum kann dessen Serumspiegel beeinflussen. Solche Konzentrations-Zeit-Kurven sind Kurven von Antikörpern, die TMDD zeigen, sehr ähnlich. In solchen Fällen kommt es nach ca. 7 Tagen zu einem sehr starken Antikörperverlust (Roopenian *et al.* 2010; Ling *et al.* 2009).

Bei den durchgeführten Versuchen an Mäusen konnten keine Kurvenverläufe beobachtet werden, die auf eine TMDD oder Immunreaktion hinweisen.

5.3.2 Vergleich Serum versus Plasma

In beiden Versuchsreihen, die mit Plasma und Serum durchgeführt wurden, zeigen Plasmaproben im mittleren Kurvenverlauf höhere Messergebnisse als Serumproben (Abb. 19).

Dies zeigt, dass die Plasmagewinnung, das verwendete Antikoagulant (Lithium-Heparin) oder die in der Probe enthaltenen Plasmaproteine den verwendeten ELISA beeinflussen. Die Ursache für diesen Unterschied ist unbekannt und wurde nicht weiter untersucht.

Mit diesem Vergleich konnte gezeigt werden, dass die Art des Probenmaterials einen Einfluss auf die Analyseergebnisse besitzen kann und beim Vergleich von Versuchsergebnissen solche Unterschiede berücksichtigt werden müssen. Wenn möglich, sollten alle zu vergleichenden Versuche mit dem gleichen Probenmaterial durchgeführt werden. Bei Plasma kommt erschwerend hinzu, dass viele verschiedene Antikoagulantien (z.B. EDTA, Heparin, Citrat) zur Plasmagewinnung eingesetzt werden können, diese können ihrerseits unterschiedliche Einflüsse besitzen. Zusätzlich kann aufgrund der schnellen Gerinnung von Mäuseblut eine partielle Gerinnung nicht immer ausgeschlossen werden.

5.3.3 Geschlechtervergleich

In der Literatur wird häufig davon ausgegangen, dass das Geschlecht die Pharmakokinetik therapeutischer Antikörpern nicht beeinflusst. Aus diesem Grund nehmen einige Arbeitsgruppen, die mit FcRn-modifizierten Mäusen arbeiten, keine Rücksicht auf deren Geschlecht (siehe z.B. Petkova *et al.*, 2006; Roopenian *et al.* 2003). Es existieren aber auch Berichte, dass das Geschlecht einen Einfluss auf die Clearance von monoklonalen Antikörpern besitzen kann (Mould and Green, 2010; Lu *et al.* 2008).

Um zu klären, ob das Geschlecht der Versuchstiere bei den eingesetzten Antikörpern einen Einfluss auf deren Pharmakokinetik hat, wurden die Versuche nach Geschlechtern getrennt durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentrations-Zeit-Kurven beider Geschlechter innerhalb der gleichen Mauslinie fast deckungsgleich verlaufen (Abb. 20). Trotz der sehr ähnlichen Kurvenverläufe ruft das Geschlecht bei einigen Versuchen eine nicht zufällige Mittelwertsänderung der Serumkonzentrationen hervor ($p < 0,05$) (Tab. 19). Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass es in manchen Mauslinie einen wirklichen Geschlechtsunterschied gibt und der gleiche Antikörper in anderen Mauslinien keinen Geschlechtsunterschied zeigt. Ein Trend, dass ein Geschlecht höhere und das andere niedrigere Werte zeigt, ist nicht zu erkennen.

Die pharmakokinetischen Parameter zeigen bei einigen Vergleichen große prozentuale Unterschiede, betrachtet man sich allerdings die Säulendiagramme der Parameter, so ist zu sehen, dass zwischen den Mauslinien die gleichen Tendenzen bestehen.

Diese großen prozentualen Unterschiede zeigen sich hauptsächlich bei Versuchen, bei denen sehr kleine Serumkonzentrationen gemessen wurden. Kleine Konzentrationsunterschiede führen hier zu sehr großen prozentualen Unterschieden der pharmakokinetischen Parameter. Dieses Phänomen ist vor allem bei huMAb<A> zu beobachten. Die Konzentrations-Zeit-Kurven dieses Antikörpers fallen in der α -Phase sehr stark ab und nähern sich in der β -Phase asymptotisch der Zeit-Achse an (Abb. 25B). Aus diesem Grund führen schon geringe Messungenauigkeiten zu sehr hohen Schwankungen der Parameter.

Aufgrund der fast deckungsgleichen Konzentrations-Zeit-Kurven zwischen den Geschlechtern kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass das Geschlecht die Pharmakokinetik der eingesetzten Antikörper nur unwesentlich beeinflusst. Diese Versuchsreihe zeigt allerdings, dass zur Beurteilung der Pharmakokinetik von Antikörpern, die sehr kleine Serumkonzentrationen zeigen, der Kurvenverlauf eine essentielle Rolle spielt.

Durch eine Verbesserung der Analysemethode und/oder durch Erhöhung der Tierzahl wäre es möglich, diese Schwankungen zu verringern.

5.3.4 Pharmakokinetische Parameter

Mit den bis dato publizierten Ergebnissen war es schwierig die FcRn-modifizierten Mauslinien direkt zu vergleichen, da in den meisten Arbeiten nur mit ein oder zwei ausgewählten Mauslinien gearbeitet wurde. Mit dieser Arbeit liegen nun Daten vor, die einen direkten Vergleich der Mäuse zulassen.

Es ist bekannt, dass die Verweilzeit von humanem IgG in hFcRn-transgenen Mäusen von der Anzahl an hFcRn abhängt. Diese wiederum hängt von der Anzahl an Kopien des hFcRn-Gens ab. Die Konsequenz ist, dass die Verweilzeit in hFcRn-heterozygoten Tieren verkürzt und in hFcRn-homozygoten Tieren verlängert ist. Des Weiteren ist offenkundig, dass humane IgGs in der Linie hFcRn(276) Tg kürzere Halbwertszeiten zeigen als in Linie hFcRn(32) Tg. Die Linie mFcRn $-/-$ zeigt die kürzesten Halbwertszeiten, da sie kein FcRn besitzt und somit kein FcRn-abhängiges Recycling stattfinden kann (Roopenian *et al.* 2010; Petkova *et al.* 2006). Diese in der Literatur beschriebenen Befunde können in der vorliegenden Arbeit für alle fünf eingesetzten Antikörper bestätigt und durch die pharmakokinetischen Parameter Verteilungsvolumen, Halbwertszeit, Clearance und Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve quantifiziert werden.

5.3.4.1 Verteilungsvolumen

Die Verteilung von Pharmaka im Körper wird bestimmt durch die Extravasation ins Gewebe, der Verteilung innerhalb von Geweben, der Antikörperbindung im Gewebe und der Elimination aus dem Gewebe (Wang *et al.* 2008). Das Verteilungsvolumen gibt an, welchen scheinbaren Verteilungsraum ein Pharmakon einnimmt. Über die Kenntnis dieser Größe ist es somit möglich, Rückschlüsse auf das Gewebe zu ziehen, in dem sich das Medikament verteilt.

Laut Definition ist das Verteilungsvolumen (V) ein Proportionalitätsfaktor zwischen der im Organismus vorhandenen Menge (M) eines Pharmakons und seiner Serum-/Plasmakonzentration (c). Es gilt die Beziehung: $V = M/c$. Das Verteilungsvolumen wird oft auf das Körpergewicht bezogen (l/kg). Am gebräuchlichsten ist das Verteilungsvolumen im Konzentrationsausgleich nach Infusion (V_{ss}). Dieses unterscheidet sich nur unwesentlich vom Verteilungsvolumen nach intravenösem Bolus (Forth *et al.* 2005) und kann daher bei den durchgeführten Vergleichen herangezogen werden.

Ein Verteilungsvolumen $\leq 0,2$ l/kg weist darauf hin, dass sich das Pharmakon im Wesentlichen extrazellulär verteilt, bei vollständiger Verteilung im gesamten Körperwasser beträgt es $0,55 - 0,6$ l/kg. Größere Werte bedeuten, dass sich das Pharmakon nicht nur auf die wässrige Phase des Organismus verteilt, sondern im Gewebe akkumuliert. Es stellt eine charakteristische Größe eines Pharmakons dar und zeigt nur selten tierartige Unterschiede (Loescher *et al.* 2006).

Da es sich bei Antikörpern um hydrophobe Moleküle mit großem Molekulargewicht handelt, zeigen die meisten eine geringe Gewebepenetration, wodurch sich ihre Verteilung meist auf das Blut und die extrazelluläre Flüssigkeit beschränkt (Ternant and Paintaud, 2005). Aus diesem Grund besitzen sie meist ein geringes Verteilungsvolumen in einer Größenordnung von $0,1$ l/kg (Mould and Green, 2010). Karanikas bewies, dass monoklonale Antikörper, die gegen zellgebundene Antigene gerichtet sind, eine gewisse Penetration von Zellen aufweisen können (Karanikas *et al.* 2002). IgG wird in den Geweben durch rezeptorvermittelte Endozytose oder Pinozytose verteilt. An der rezeptorvermittelten Endozytose sind Fc γ -Rezeptoren beteiligt. Für die Verteilung durch Pinozytose ist FcRn mit verantwortlich (Lobo *et al.* 2004; Wang *et al.* 2008).

Wie zu erwarten, liegt das Verteilungsvolumen bei huMAb<P>, huMAb<I>, huMAb<E> und huMAb<C> (Tab. 26-32) in beiden Geschlechtern und allen Mauslinien im Bereich von $0,1$ l/kg. FcRn scheint bei diesen Antikörpern keine große Rolle für die Gewebeverteilung zu spielen. Diese Annahme gründet sich auf der Tatsache, dass bei Linie mFcRn -/-, die keinen FcRn besitzt, bei allen vier Antikörpern nur gering niedrigere Werte zu beobachten sind als bei den Linien die FcRn besitzen.

HuMAb<A> verhält sich anders: bei diesem Antikörper scheint das Verteilungsvolumen maßgeblich von der FcRn-Anzahl abzuhängen. Dies bedeutet, dass mit steigender FcRn-Anzahl sich das Verteilungsvolumen vergrößert. So zeigt die Linie mFcRn -/-, die keinen Rezeptor besitzt, das geringste Verteilungsvolumen, die Linie(276) Tg +/+ ein mittleres und die Linie hFcRn(32) Tg +/+ das größte Verteilungsvolumen. (Abb. 21B). Die SPR-Messung (Tab. 14) beweist, dass huMAb<A> eine extrem starke Affinität zu hFcRn besitzt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist diese große Affinität auch für das FcRn-abhängige Verteilungsvolumen verantwortlich; da IgG im Gewebe durch hFcRn stark gebunden wird und so für eine scheinbare Gewebeverteilung sorgt.

5.3.4.2 Elimination

Unter Elimination versteht man in der Pharmakologie alle Mechanismen, die Pharmaka aus dem Körper entfernen. Zu ihnen zählen die Filtration, Sekretion und die Biotransformation (Wang *et al.* 2008). Pharmakokinetische Parameter, die die Elimination beschreiben, sind die Clearance und die Halbwertszeit.

Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts werden Antikörper nicht über die Niere filtriert oder durch hepatische Enzyme wie Cytochrom P450 abgebaut (Mould and Green, 2010; Wang *et al.* 2008). Die Sekretion in die Galle ist ein wichtiger Ausscheidungsweg für IgA, für IgG spielt sie aber keine Rolle (Wang *et al.* 2008). Der Hauptanteil der IgG-Elimination geschieht durch intrazellulären Katabolismus, der der pinozytotischen Aufnahme in Zellen folgt. Dieser Katabolismus findet vor allem an Stellen statt, die in schnellem Ausgleich mit dem Plasma stehen (Mould and Green, 2010; Waldmann and Strober, 1969). Sicher ist, dass FcRn IgG vor dem Abbau schützt, wodurch die lange Serumhalbwertszeit von IgG erklärt werden kann. Aus diesem Grund beeinflusst die speziespezifische Affinität von FcRn zu IgG (Ober *et al.* 2001) und die Rezeptoranzahl (Roopenian *et al.* 2010) direkt die Elimination von IgG. Einige Studien konnten zusätzlich nachweisen, dass eine Erhöhung der Bindungsaffinität von monoklonalen Antikörpern auf IgG-Basis zu einer verlangsamten Clearance und einer verlängerten Halbwertszeit führen (Ling *et al.* 2009; Hinton *et al.* 2006; Medesan *et al.* 1998).

Dieses Zusammenspiel von Affinität und FcRn-Anzahl macht es schwer, Mäuse mit murinem FcRn und Mäusen mit humanem FcRn zu vergleichen. Betrachtet man allerdings die Ergebnisse dieser Arbeit, so ist zu erkennen, dass C57BL/6J und hFcRn(32) Tg +/+, bei den hier untersuchten Antikörpern sehr ähnliche Pharmakokinetiken zeigen. Die geringere Affinität des hFcRn in Linie hFcRn(32) Tg +/+ wird vermutlich durch eine erhöhte Anzahl an hFcRn ausgeglichen.

Es konnte allerdings keine Studie zu FcRn-Anzahl und Gewebeverteilung in den unterschiedlichen Mäusen gefunden werden. Die Rezeptoranzahl bzw. Verhältnisse werden immer nur durch die pharmakokinetischen Parameter abgeschätzt (Roopenian *et al.* 2010).

5.3.4.2.1 Clearance

Die Clearance (Cl) ist der Proportionalitätsfaktor zwischen Ausscheidungsgeschwindigkeit und Serumkonzentration. Nach intravenöser Gabe einer Einzeldosis (M) lässt sich die Clearance wie folgt berechnen: $Cl = M/AUC$ (Forth *et al.* 2005). „WinNonlin 5.3“ nutzt die Formel: $Cl = M/AUC_{0-inf}$.

Bei therapeutischen Antikörpern, die gegen zellgebundene Antigene gerichtet sind, zeigt sich oft, dass das Zielantigen die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik beeinflusst (Mould and Green, 2010; Mahmood and Green, 2005; Mahmood, 2009b; Gibiansky and Gibiansky, 2009). Das Phänomen, bei dem ein Medikament mit hoher Affinität und zu einem signifikanten Anteil (relativ zur Dosis) an sein pharmakologisches Ziel (z.B. Rezeptor, Enzym, Transporter) gebunden wird und dies sich in der pharmakinetischen Charakteristik des Medikaments widerspiegelt, wird als „Zielstruktur-vermittelte Medikamenten-Disposition“, oder im Englischen „Target-mediated Drug Disposition“ (TMDD) bezeichnet (Mager and Jusko, 2001; Mager, 2006). Der Begriff wurde erstmals von Levy im Jahr 1994 geprägt (Levy, 1994). Da dieser Prozess oft eine signifikante Erhöhung der Clearance zur Folge hat, wird auch von Zielstruktur-vermittelter Clearance (engl.: Target-mediated Clearance) gesprochen (Gibiansky and Gibiansky, 2009). Durch eine solche Beeinflussung entstehen oft komplexe nichtlineare Pharmakokinetiken (Mager and Jusko, 2001; Mager, 2006). Prozesse wie rezeptorvermittelte Endozytose resultieren oft in der Elimination des Medikaments durch lysosomalen Abbau (Mager and Jusko, 2001; Mager, 2006). Da es sich um einen sättigbaren Prozesse handelt (Wang *et al.* 2008), besitzen Antikörper meist eine nichtlineare Clearance im niedrigen Dosisbereich und eine lineare Clearance im Bereich hoher Dosen (Mould and Green, 2010). Aus diesem Grund werden für Kinetiken oft Dosen > 1 mg/kg verwendet, da in diesem Dosisbereich die meisten Antikörper eine lineare Clearance besitzen (Ling *et al.* 2009).

An den Clearancewerten ist zu sehen, dass die Elimination von der FcRn-Anzahl abhängt (Abb. 22A). Mäuse, die keinen funktionellen FcRn exprimieren, zeigen eine ca. 10-fach höhere Clearance als ihre Kontrollen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren (Ternant and Paintaud, 2005; Israel *et al.* 1996; Roopenian *et al.* 2003; Junghans and Anderson, 1996; Ghetie *et al.* 1996; Junghans, 1997). Das Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass ohne FcRn kein FcRn-abhängiges Recycling von IgG stattfinden kann.

Bei den hFcRn-tragenden Mäusen ist die Clearance umgekehrt proportional der hFcRn-Anzahl. Mäuse mit wenig hFcRn weisen eine höhere Clearance als Mäuse mit viel hFcRn auf. Dies lässt sich damit erklären, dass das Recycling durch die FcRn-Anzahl limitiert wird.

Schon Brambell konnte beweisen, dass es sich um einen sättigbaren Prozess handelt (Brambell, 1966). Bei den standardmäßig applizierten Antikörperdosen von 0,5 – 10 mg/kg kann eine Sättigung von FcRn ausgeschlossen werden (Tabrizi *et al.* 2006; Mould and Green, 2010), da das gesamte IgG nur um 1 – 2 % erhöht wird (Wang *et al.* 2008). Werden hohe Antikörperdosen appliziert, lässt sich eine deutliche Dosisabhängigkeit des Metabolismus von IgG nachweisen: je höher die IgG Konzentration um so kürzer ist ihre Serumhalbwertszeit (Ternant and Paintaud, 2005; Morell *et al.* 1970). Bei den Ergebnissen dieser Arbeit sind weder bei huMAb<P> noch bei huMAb<A> relevante Dosiseffekte zu sehen, da 2,5 und 10 mg/kg unter dem Dosisbereich liegen, bei dem mit einer Rezeptorsättigung zu rechnen ist. Zusätzlich ist der Dosisunterschied mit 1 : 4 nicht sonderlich groß.

5.3.4.2.2 Halbwertszeit

Nach der Definition ist die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) diejenige Zeitspanne, in der die Konzentration eines Pharmakons um die Hälfte abgenommen hat. Der Zeitverlauf der Serumkonzentration von intravenös verabreichten IgGs in der halblogarithmischen Darstellung ist normalerweise biphasisch (Abb. 26), wenn sie keine TMDD zeigen. Der initiale rasche Abfall der Serumkonzentration (α -Phase) ist vor allem durch die Verteilung des Pharmakons in die Gewebe bedingt. Die sich anschließende langsame β -Phase ist Ausdruck der Elimination. Als dominierende Halbwertszeit wird die Halbwertszeit der Phase bezeichnet, die am meisten zur AUC beiträgt. Dies ist meist die Halbwertszeit des langsamsten Prozesses. Sie berechnet sich: $t_{1/2} = \ln 2 * V/Cl$ (Forth *et al.* 2005; Ghetie and Ward, 2002). In dieser Arbeit wurde die terminale Halbwertszeit berechnet; sie kann mit der Halbwertszeit der β -Phase gleichgesetzt werden.

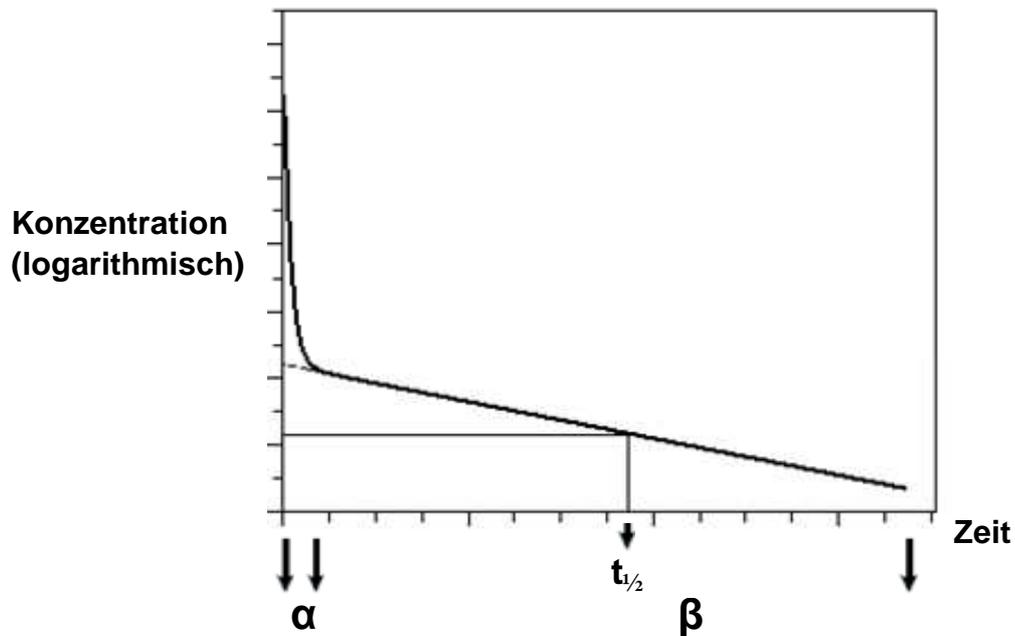


Abbildung 26: Schematische Kurve der biphasischen Clearance von IgG

- α) die α -Phase entspricht der Verteilungsphase des Pharmakons im Körper
- β) die β -Phase ist die Phase der Elimination
- $t_{1/2}$) Berechnung der Halbwertszeit der β -Phase.

Quelle: modifiziert nach Ghetie and Ward, 2002

Die terminale Halbwertszeit ist ein Maß für die Elimination und ebenfalls wie die Clearance von der FcRn-Anzahl abhängig (Abb. 22B). Mäuse, die kein FcRn besitzen, zeigen bei der Applikation von IgG eine extrem kurze terminale Halbwertszeit. Dies kann durch das fehlende FcRn-abhängige Recycling von IgG erklärt werden. Mäuse, die wenig hFcRn besitzen (hFcRn(276) Tg +/-), zeigen kurze Halbwertszeiten, da bei ihnen weniger IgG recycelt werden kann als bei Mäusen, die viel hFcRn besitzen (hFcRn(32) Tg +/+).

Die terminale Halbwertszeit berechnet sich aus den Werten mit der geringsten Serumkonzentration, weshalb sie sehr anfällig für Messungenauigkeiten und interindividuelle Schwankungen ist. Geringe Konzentrationsunterschiede der letzten Messwerte führen zu großen Unterschieden der terminalen Halbwertszeit. Aus diesem Grund ist die Clearance bei der Beurteilung der Elimination zu bevorzugen; sie ist weniger störanfällig.

5.3.4.3 Exposition und Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve

Unter der Exposition versteht man in der Pharmakologie das Ausgesetztsein des Körpers gegenüber einem bestimmten Pharmakon. Eine Maßzahl, die die Exposition beschreibt, ist die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC). Sie ist proportional der Medikamentenmenge, die ins systemische Blut gelangt (Forth *et al.* 2005). Häufig wird die AUC von 0 Stunden bis unendlich ($AUC_{0-\infty}$) zur Beurteilung der Exposition eingesetzt. Dieser Wert war für die Beurteilung der durchgeführten Versuche ungeeignet, da ein Teil der Kurven nach kurzer Zeit auf Serumkonzentrationen von 0 $\mu\text{g/ml}$ abfielen und andere sich der Zeitachse nur asymptotisch annäherten. Bei diesen Kurven wurden sehr hohe Werte für $AUC_{0-\infty}$ extrapoliert. Aus diesem Grund wurden die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven von 0 bis 672 Stunden (AUC_{672}) zur Beurteilung der Exposition herangezogen. Das verwendete Computerprogramm nutzt zur Berechnung der AUC die lineare Trapez-Regel.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die AUC genau wie die Clearance und terminale Halbwertszeit von der FcRn-Anzahl abhängt (Abb. 23). Bei ihr besitzen Mäuse mit wenig FcRn kleine Werte, da wenig IgG recycelt werden kann, bei Mäusen mit viel FcRn werden hohe Werte gemessen. Bei der Beurteilung von sehr flachen Kurven, wie z.B. Kurven von huMAb<A>, muss bedacht werden, dass schon sehr kleine Konzentrationsänderungen sehr große prozentuale Veränderungen der AUC hervorrufen. Solche Schwankungen können sehr leicht zu Fehlinterpretationen führen.

5.3.4.4 Schwächen des Studiendesign und Auswertung

Pharmakokinetische Daten werden typischerweise mit 3 - 6 Tieren erstellt, diese sind normalerweise signifikant unterschiedlich (Ling *et al.* 2009). Auch in dieser Arbeit wurde bei den Pharmakokinetiken mit 3 – 5 Tieren pro Gruppe gearbeitet. Die geringe Tierzahl ermöglicht aber nur eine begrenzte statistische Auswertung. Aus diesem Grund wurde bei den berechneten pharmakokinetischen Parametern darauf verzichtet zu prüfen, ob es sich zwischen den Gruppen um signifikante Unterschiede handelt.

Erschwerend kommt hinzu, dass die meisten pharmakokinetischen Studien mit monoklonalen Antikörpern von großer interindividueller Variabilität berichten, deren Gründe bisher unbekannt sind (Ternant and Paintaud, 2005).

5.3.5 Vergleich Maus versus Primat

Es existieren einige gut etablierte Methoden für die Vorhersage humaner Pharmakokinetiken von kleinen Molekülen (< 1 kDa) basierend auf *in vivo* oder *in vitro* Daten (Mould and Green, 2010). Im Gegensatz dazu hat die Vorhersage humaner Pharmakokinetiken von Proteinen weit weniger Bedeutung, da sie schwieriger ist als bei kleinen Molekülen oder oft mit den vorhandenen Methoden unmöglich ist (Ling *et al.* 2009). Hauptgrund für diesen Unterschied ist, dass kleine Moleküle meist auf anderen Wegen aus dem Körper eliminiert werden als Proteine. Bei kleinen Molekülen spielen Prozesse wie z.B: Filtration durch die Niere, Metabolismus in der Leber oder biliäre Exkretion eine essentielle Rolle, bei großen Proteinen wie Antikörpern sind diese Prozesse von untergeordneter Bedeutung, hier tragen größtenteils rezeptorabhängige Vorgänge zur Elimination bei (Mould and Green, 2010).

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob Beobachtungen aus Versuchen mit Primaten und/oder Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie-Messungen sich mit Ergebnissen an FcRn-modifizierten Mäusen vergleichen lassen. Es wurden die Versuchsergebnisse von fünf sehr unterschiedlichen therapeutischen Antikörpern verglichen, um herauszufinden, inwieweit sich Befunde aus den unterschiedlichen Testsystemen übertragen lassen.

5.3.5.1 Einfluss der Körpergröße

Es ist seit langem bekannt, dass die basale Metabolismusrate von der Körpergröße abhängig ist. So zeigen kleine Tiere einen schnelleren Metabolismus als große Tiere (West and Brown, 2005; Kleiber, 1947; Kleiber, 1975). Dies trifft auch auf die Elimination vieler Medikamente, vor allem kleiner Moleküle, zu. Daher muss meist für die gleiche Wirkung bei kleinen Tieren mehr Substanz verabreicht werden als bei großen (Ling *et al.* 2009). Dieser Effekt ist bei huMAb<P>, huMAb<A> und huMAb<C> zu sehen, die Konzentrations-Zeit-Kurven der Primaten verlaufen deutlich über den Kurven der Mäuse (Abb. 24, 25).

Da es sich bei der Elimination von Antikörpern hauptsächlich um rezeptorbedingte Prozesse handelt (Mager and Jusko, 2001; Mager, 2006; Raghavan and Bjorkman, 1996) und die Rezeptordichte nicht immer mit der Körpergröße ansteigt (Holford, 1996), ist die Elimination von Antikörpern nicht immer von der Größe abhängig. Unterschiede der Clearance sind für monoklonale

Antikörper zwischen verschiedenen Spezies generell viel kleiner als Unterschiede, die bei kleinen Molekülen beobachtet werden. Bei einigen Antikörpern eliminierten Mäuse, Ratten und Affen mit gleicher Rate (Ling *et al.* 2009).

Bei huMAb<I> und huMAb<E> ist zu sehen, dass Primaten und Mäuse nahezu mit gleicher Rate eliminieren, die Kurven der Primaten verlaufen in der Kurvenschar der Mäuse (Abb. 25A und B).

5.3.5.2 Allometrische Skalierung

Auf eine Skalierung der erhobenen Daten wurde verzichtet, da der Datensatz hierfür ungeeignet ist. Die allometrische Skalierung soll im Folgenden dennoch Erwähnung finden, da an dieser Methode sehr gut Probleme erörtert werden können, die beim Vergleich von Daten aus Versuchen mit therapeutischen Antikörpern auftreten.

Ein Großteil der Methoden zur Vorhersage von Pharmakokinetiken beruht auf der sogenannten allometrischen Skalierung („allometrisch“ kommt aus dem Griechischen und bedeutet „verschiedenes Maß“). Eine fundamentale These der allometrischen Skalierung ist anatomische, physiologische und biochemische Ähnlichkeit zwischen Tierspezies und dem Menschen (Ling *et al.* 2009). Ihr liegt das allometrische Potenzmodell zugrunde (Mahmood, 2009b): $Y = a \cdot X^b$ (Y) repräsentiert die gesuchte biologische Größe, (X) eine bekannte biologische Größe, (a) den allometrischen Koeffizienten und (b) den allometrischen Exponenten. Am häufigsten werden kinetische Parameter (kP) mit der Körpermasse (KM) in Beziehung gebracht (Mahmood, 2009b). So ergibt sich die Formel: $kP = a \cdot KM^b$. Bei Anwendung dieser Formel spricht man von einfacher allometrischer Skalierung. Sie kann genutzt werden, um Clearance, Verteilungsvolumen und Halbwertszeit vorherzusagen. Einen universellen Exponenten für die Skalierung gibt es nicht, er ist von den eingesetzten Spezies und dem Therapeutikum abhängig (Ling *et al.* 2009) und hat keine physiologische Bedeutung (Mahmood, 2009b). Für monoklonale Antikörper liegt der optimale Exponent zur Skalierung der Clearance normalerweise zwischen 0,75 und 1 (Ling *et al.* 2009). Die Formel der einfachen allometrischen Skalierung kann durch Korrekturfaktoren (F) wie z.B. das „Potential der maximalen Lebenszeit“ oder das Gehirngewicht modifiziert werden (Mahmood, 2004; Mahmood, 2009a): $kP = (a \cdot KM^b) / F$

Es wird allgemein angenommen, dass die Daten von mindestens drei Spezies benötigt werden, um eine zuverlässige Vorhersage für eine 4. Spezies machen zu können (Mahmood, 2009b; Ling *et al.* 2009). Da nicht immer Daten von drei Spezies vorliegen, wurde schon häufiger versucht, von zwei oder nur einer Spezies Vorhersagen für den Menschen zu machen (Tang *et al.* 2007; Boxenbaum, 1982; Caldwell *et al.* 2004; Bachmann *et al.* 1996). Diese Versuche waren aber meist ohne großen Erfolg (Mahmood, 2009b). Da allgemein angenommen wird, dass drei Spezies für eine zuverlässige Vorhersage benötigt werden, wurde in dieser Arbeit von einer Skalierung abgesehen, da nur Daten von Mäusen und Primaten zur Verfügung stehen.

Lineares kinetisches Verhalten ist Voraussetzung für eine allometrische Skalierung (Ling *et al.* 2009; Holford, 1996). Für Proteine, die bei der Elimination eine nichtlineare Clearance zeigen, existiert keine Methode für eine Skalierung im nichtlinearen Bereich (Ling *et al.* 2009). Dies ist wichtig, da Antikörper häufig nichtlineare Kinetiken aufgrund von TMDD zeigen (hierzu siehe Kapitel 5.3.5.3 Speziespezifisches Verhalten).

5.3.5.3 Speziespezifisches Verhalten

Therapeutische Antikörper werden meist für den Einsatz gegen spezielle humane Antigene entwickelt. Diese Zielantigene werden von den meisten Labortieren nicht bzw. in anderem Maße exprimiert, oder es besteht keine Kreuzreaktivität zum Antigen der Labortiere. Dies führt dazu, dass in den meisten Tiermodellen ein lineares Verhalten der Pharmakokinetiken zu beobachten ist (Mould and Green, 2010). Unter den Nicht-Nager-Spezies ist der Affe die gebräuchlichste Spezies zur pharmakokinetischen Charakterisierung, da die meisten therapeutischen Antikörper die Zielantigene von Affen mit hoher Affinität binden können (Ling *et al.* 2009). Primaten (Mensch und Affe) zeigen somit oft nichtlineares Verhalten der Pharmakokinetiken und andere Labortiere lineares Verhalten. Aus diesem Grund ist es oft schwer, von Beobachtungen in Nagern und Hasenartigen auf Affe und Mensch zu schließen (Mould and Green, 2010).

Bei Antikörpern, von denen ein lineares Verhalten der Pharmakokinetik in allen verwendeten Spezies erwartet wird, kann das allometrische Modell (Holford, 1996) eingesetzt werden. Wenn eine nichtlineare Clearance erwartet wird, sind Daten von Tiermodellen, die das Zielantigen exprimieren, wichtig um auf das

Verhalten im Menschen schließen zu können (Mould and Green, 2010). So kann z.B. TMDD von Antikörpern gegen zellgebundene Antigene beim Menschen vorhergesagt werden (Ling *et al.* 2009).

Von allen eingesetzten Antikörpern ist bekannt, dass sie Kreuzreaktivität zum Antigen von *Macaca fascicularis* besitzen. HuMAb<P> und huMAb<I> sind nicht kreuzreaktiv zum Antigen von Mäusen. Bei huMAb<A> ist Kreuzreaktivität irrelevant, da das Antigen in gesunden Individuen nicht vorkommt. Für huMAb<E> und huMAb<C> konnten keine Angaben zur Kreuzreaktivität mit murinem Antigen gefunden werden.

Antikörper können grundsätzlich danach eingeteilt werden, ob sie gegen lösliche Antigene oder unlösliche bzw. zellgebundene Antigene gerichtet sind (Mould and Green, 2010). Antikörper gegen lösliche Antigene zeigen überwiegend eine lineare Clearance. Bei der Gruppe der Antikörper, die gegen zellgebundene Antigene gerichtet sind, ist nichtlineares Verhalten häufig (Mould and Green, 2010; Mahmood and Green, 2005; Mahmood, 2009b). Für die nichtlineare Clearance von Antikörpern ist meist TMDD verantwortlich. Da es sich bei TMDD um sättigbare Prozesse handelt, ist die Clearance von Antikörpern im niedrigen Dosisbereich meist nicht linear und im hohen Bereich linear (Mould and Green, 2010). Aus diesem Grund werden oft Dosen > 1 mg/kg miteinander skaliert, da in diesem Dosisbereich die meisten Antikörper eine lineare Clearance besitzen (Ling *et al.* 2009). Solche Hoch-Dosis Studien sind für die pharmakokinetische Beurteilung allerdings nur von bedingtem Nutzen, wenn bekannt ist, dass Antikörper bei niedrigen Dosen im Primaten TMDD besitzen (Ling *et al.* 2009), da es sich um die Überlagerung von mindestens zwei Prozessen handelt.

Bei allen eingesetzten Antikörpern handelt es sich um Antikörper, die gegen zellgebundene Antigene gerichtet sind. Von huMAb<I> und huMAb<E> ist bekannt, dass sie im Primaten bei niedrigen Dosen TMDD zeigen, von huMAb<C> wird es nur vermutet, da die späten Zeitpunkte von einer Immunreaktion gegen huMAb<C> beeinflusst sind. Bei der verwendeten Dosis von 10 mg/kg wurde im Primaten für keinen der eingesetzten Antikörper eine TMDD beobachtet.

Eine besondere Ausnahme ist huMAb<A>, da er *in vitro* stark an humanes FcRn bindet (Tab. 14), wurde erwartet, dass er *in vivo* aufgrund besonders gutem FcRn-abhängigen Recyclings eine besonders lange Halbwertszeit und geringe Clearance zeigt. In allen untersuchten Mäusen wurde hingegen ein extrem starker Abfall der Serumkonzentration in der α -Phase nachgewiesen (Abb. 24B). Die β -Phase verläuft dann auf sehr niedrigem Niveau. Dies führt rechnerisch zu einer sehr kurzen gesamten Halbwertszeit und einer großen Clearance. Einige Autoren beobachteten, dass Antikörper mit sehr starker FcRn-Affinität *in vivo* verkürzte Halbwertszeiten besitzen. Sie vermuten, dass aufgrund der starken Affinität die Dissoziation des IgG vom FcRn behindert wird und deshalb die Antikörper abgebaut und nicht in den Extrazellularraum abgegeben werden (Yeung *et al.* 2009).

Im Primaten zeigt huMAb<A> keinen so starken initialen Abfall der Serumspiegel. Datta-Mannan beobachtete 2007 ebenfalls einen unerklärlichen speziesspezifischen Verlust eines therapeutischen Antikörpers, bei ihr war die Clearance im Primaten schneller als in der Maus. Als mögliche Ursachen nennt sie Unterschiede in der proteolytischen Stabilität, Bindung an Blutzellen und biophysikalische Eigenschaften wie Aggregation (Datta-Mannan *et al.* 2007b). Unspezifische Bindungen sind relativ unwahrscheinlich, da solche Effekte normalerweise nicht speziesspezifisch sind. Eine weitere Möglichkeit ist, dass nur bestimmte Glykosilierungsvarianten des Antikörpers durch FcRn vor dem Abbau geschützt werden und daher ein Großteil des Antikörpers schnell aus der Zirkulation entfernt wird.

5.3.5.4 Immunogenität therapeutischer Antikörper

Auch eine Immunreaktion mit Bildung von Anti-Antikörpern kann die Pharmakokinetik beeinflussen, in solchen Situationen kann die Exposition unter- oder überschätzt werden. Sie führt meist zu einer Erhöhung der Clearance (Mould and Green, 2010; Mahmood and Green, 2005; Griffiths and Lumley, 1998). Es ist wichtig, dass die verwendeten Tierdaten für Vergleiche oder Skalierungen nicht durch eine Immunreaktion gegen das verabreichte Protein beeinflusst sind. Solche Immunreaktionen besitzen keine Aussagekraft für die Situation am Menschen oder einer anderen Spezies. Falls eine Immunreaktion auftritt, sollten Daten von Zeitpunkten vor der Immunreaktion verwendet werden. Ein solches Beispiel ist in Richter *et al.* 1999 zu finden. Die meisten Antikörper zeigen im Tiermodell eine

geringe Immunogenität. Wenn Anti-Antikörper gebildet werden, zeigen sich diese nach ca. 7 Tagen nach i.v. Applikation. Da bei therapeutischen Antikörpern die Exposition der ersten 7 Tage, gemessen in AUC, den größten Teil der $AUC_{0-\infty}$ stellt, reichen diese Daten meist um eine Beurteilung durchzuführen (Ling *et al.* 2009). Solche Komplikationen können durch den Einsatz immundefizienter Tiere verhindert werden (Roopenian *et al.* 2010).

Bei den verwendeten Vergleichsdaten von Mensch und Affe können Effekte von Anti-Antikörpern bei huMAb<P>, huMAb<A>, huMAb<E> und huMAb<I> ausgeschlossen werden, da die Probanden und Affen auf solche Antikörper getestet wurden, und im positiven Fall die Messwerte nicht zur weiteren Beurteilung herangezogen wurden. Bei den Primaten-Daten von huMAb<C> ist eine Immunreaktion zu sehen. In der Konzentrations-Zeit-Kurve zeigt sich dies durch den starken Konzentrationsabfall ab Tag 9 (Abb. 25C). Die Tiere mit Immunreaktion konnten von der Beurteilung nicht ausgeschlossen werden, da der Versuch nur aus zwei Individuen bestand und beide eine Immunreaktion zeigen.

5.3.6 Korrelation von *in vitro* mit *in vivo* Daten

Da in der Literatur Uneinigkeit herrscht, ob Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie-Messungen mit pharmakokinetischen Daten vergleichbar sind, wurden in dieser Arbeit die erhobenen Werte für Clearance und terminale Halbwertszeit mit solchen Messungen verglichen. Zwischen Clearance und apparenter Dissoziationskonstante (k_d) konnte bei allen Mauslinien ein starker wechselseitiger statistischer Zusammenhang festgestellt werden (Tab. 20). Ob es sich bei diesem Ergebnis um eine formale oder kausale Korrelation handelt, muss in weiteren Versuchen nachgewiesen werden, da zum Vergleich nur die Ergebnisse von fünf Antikörpern zur Verfügung standen. Wenn sich dieser Befund bestätigt, ist es möglich, mit (k_d) die Clearance von Mäusen vorherzusagen. Beim Versuch terminale Halbwertszeiten mit Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie-Messungen zu korrelieren wurde festgestellt, dass bei einigen Gruppen ein starker statistischer Zusammenhang besteht und bei anderen nicht. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind die Schwankungen der terminalen Halbwertszeit, verursacht durch die sehr kleinen Gruppengrößen von 3 – 5 Tieren, für dieses Ergebnis verantwortlich. Für einen solchen Vergleich müssten Versuche mit größeren Tierzahlen durchgeführt werden, um den Einfluss interindividueller Unterschiede gering zu halten.

5.3.7 Fazit

Die vorliegende Arbeit beweist, dass die Art des Probenmaterials einen Einfluss auf den eingesetzten ELISA hat. Aus diesem Grund sollte für Vergleiche mit standardisiertem Probenmaterial gearbeitet werden. Häufig wird Serum bevorzugt, da Plasma mit diversen Antikoagulantien gewonnen werden kann und diese die Analysemethoden beeinflussen können. Zusätzlich kann aufgrund der schnellen Gerinnung von Mäuseblut eine partielle Gerinnung nicht immer ausgeschlossen werden.

Für die fünf verwendeten Antikörper konnte in allen verwendeten Mauslinien gezeigt werden, dass die Konzentrations-Zeit-Kurven beider Geschlechter nach einer Einmalapplikation fast deckungsgleich verlaufen. Daher wird davon ausgegangen, dass bei den verwendeten Antikörpern kein relevanter Geschlechtsunterschied der Pharmakokinetik besteht.

Es ist bekannt, dass murines FcRn eine größere Affinität zu humanem IgG besitzt als humanes FcRn. Aus diesem Grund ist es schwierig, von den Pharmakokinetiken in Wildtyp-Mäusen auf die Verhältnisse in Primaten zu schließen. In der pharmazeutischen Forschung werden daher verstärkt hFcRn-transgene Mäuse eingesetzt. Neben der Affinität zu FcRn spielt aber auch die Anzahl an FcRn eine Rolle für die Pharmakokinetik therapeutischer Antikörper. Dies konnte für die fünf verwendeten Antikörper in Mäusen bestätigt werden. Die Elimination von humanem IgG ist in Tieren, die für das hFcRn-Gen heterozygot sind, und daher weniger hFcRn exprimieren als homozygote Tiere, erhöht. Des Weiteren ist ersichtlich, dass die Linie hFcRn(276) Tg humanes IgG schneller eliminiert als die Linie hFcRn(32) Tg, da die Linie hFcRn(276) Tg weniger hFcRn besitzt.

Für vier der fünf eingesetzten Antikörper wurde ein geringes Verteilungsvolumen bestimmt. An diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass FcRn für die Gewebeverteilung keinen großen Einfluss besitzt. HuMAb<A> stellt eine Ausnahme dar. Bei diesem Antikörper scheint das Verteilungsvolumen von FcRn abzuhängen. Der Grund ist mit großer Wahrscheinlichkeit seine hohe Affinität zu FcRn.

Die Pharmakokinetiken in Linie hFcRn(32) Tg +/+ ähneln sehr stark denen der C57BL/6J-Kontrollen. Bei der Linie hFcRn(32) Tg +/+ wird vermutlich die geringere Affinität des hFcRn durch eine vergrößerte Anzahl an hFcRn ausgeglichen, wodurch vergleichbare Kinetiken der Antikörper entstehen. Bei den anderen Linien verlaufen die Kurven flacher, da sie weniger FcRn besitzen.

Es ist bekannt, dass endogenes IgG die Pharmakokinetik von therapeutischen Antikörpern beeinflusst; da es am FcRn als kompetitiver Antagonist wirkt. Ein niedriger endogener IgG-Spiegel führt daher zu einer verringerten Elimination therapeutischer Antikörper. Dies ist von Relevanz, da die hFcRn modifizierten Linien nur etwa 10 % des für Mäuse üblichen endogenen IgG-Spiegels besitzen. Somit konkurrieren in diesen Tieren weniger endogene IgGs mit den verabreichten humanen IgGs um das vorhandene FcRn.

Die hFcRn-transgenen Mäuse können eingesetzt werden, um den Mechanismus zwischen FcRn und IgG besser zu verstehen. Bei den durchgeführten pharmakokinetischen Versuchen konnte aber für die hFcRn-transgenen Mäuse kein nennenswerter Vorteil gegenüber Wildtyp-Mäusen beobachtet werden.

Es besteht die theoretische Annahme, dass humane Antikörper, die für ein verbessertes Recycling durch humanes FcRn modifiziert wurden, in hFcRn-transgenen Mäusen eine dem Primaten ähnllichere Kinetik zeigen, als normale Mäuse. Daher wird in der Literatur dieses Modell als Methode angepriesen, um die Verhältnisse bei Primaten zu beschreiben. Es finden sich aber meist nur Vergleiche zwischen *in vitro* Modellen (z.B. SPR) und Mäusen. Im direkten Vergleich zwischen Maus und Primat ist ersichtlich, dass beim Primat mehrere Effekte einen Einfluss auf die Pharmakokinetik besitzen. FcRn ist zwar ein wichtiger Faktor, beim Primat spielt aber „Target-mediated Drug Disposition“ eine essentielle Rolle, die im Nager meist nicht abgebildet werden kann. Es ist zwar möglich, retrospektiv durch Computermodelle die „Target-mediated Drug Disposition“ aus der Kinetik von Primaten herauszurechnen. Eine direkte Voraussage der Kinetik von Primaten aus Mäusedaten ist aber nicht möglich. Aus diesem Grund stellen hFcRn transgene Mäuse zurzeit keine wirkliche Alternative zum Primaten dar.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen wäre, die Tiere genetisch so zu verändern, dass sie neben humanem FcRn auch das humane Zielantigen exprimieren. Eine Alternative wäre in hFcRn-transgene Mäuse humanes Gewebe mit dem entsprechenden Antigen einzubringen. Solche sogenannten Maus-Xenograft-Modelle werden z.B. in der onkologischen Forschung häufig verwendet. Um eine Abstoßungsreaktion des fremden Gewebes zu verhindern, ist es allerdings nötig, immundefiziente Mäuse einzusetzen.

Im Vergleich von pharmakokinetischen Parametern mit Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie-Messungen konnte gezeigt werden, dass zwischen der Clearance und der apparenten Dissoziationskonstante bei allen Mauslinien ein starker wechselseitiger statistischer Zusammenhang besteht. Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei diesem Ergebnis um eine formale oder kausale Korrelation handelt, da zum Vergleich nur die Ergebnisse von fünf Antikörpern zur Verfügung standen. Mit der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie könnte es also in der Zukunft möglich sein, Pharmakokinetiken von humanen Antikörpern in Mäusen vorherzusagen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Klinische Labordiagnostik und Pharmakokinetik humanisierter therapeutischer Antikörper in human FcRn transgenen Mäusen

Präklinische Tests zur Beurteilung der Pharmakokinetik (PK) humanisierter therapeutischer Antikörper werden üblicherweise an Mäusen durchgeführt. Konventionelle Nagetiermodelle spiegeln aber nicht die Antikörperkinetik im Menschen angemessen wider, da der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn), der eine wichtige Rolle bei der Regulation der Homöostase von Immunglobulin Gamma (IgG) spielt, speziesspezifische Unterschiede in der IgG-Bindung zeigt. Die Vorhersage humaner Pharmakokinetiken wird daher üblicherweise in Primaten durchgeführt. Folglich besteht Bedarf an einem verbesserten präklinischen Nagetiermodell, das die Funktion von humanem FcRn (hFcRn) adäquat nachahmt.

Um zu klären, ob hFcRn-transgene Mäuse ein geeignetes Nagetiermodell zur Entwicklung therapeutischer humanisierter IgGs (hIgG) darstellen, wurde die PK von fünf funktionell und strukturell verschiedenen hIgG-Antikörpern *in vivo* untersucht. Hierfür wurden Wildtyp-Mäuse, FcRn-defiziente Mäuse und zwei unterschiedliche transgene Mauslinien eingesetzt. Beide transgenen Linien sind für das murine FcRn (mFcRn) defizient, stattdessen tragen sie das hFcRn-Gen als cDNA- oder genomisches DNA-Insert. Zusätzlich wurden die Mausdaten mit Primatendaten und *in vitro* Bindungsstudien an hFcRn verglichen, die durch den Einsatz von Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) ermittelt wurden.

Bei Betrachtung der PKs zeigt sich, dass alle hIgG-Antikörper biphasische Konzentrations-Zeit-Profile in Mäusen besitzen. Es gibt keine Anzeichen einer beschleunigten Clearance, die auf eine Immunreaktion oder Zielstrukturvermittelte Medikamenten-Disposition (TMDD) hinweisen. Wie erwartet sind die Clearance, die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven und die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der therapeutischen IgGs, die an FcRn-modifizierte Mäuse appliziert wurden, von der Anwesenheit von FcRn abhängig und sind proportional der Anzahl des Transgens. Interessanterweise scheint das Verteilungsvolumen nur eines der fünf getesteten Antikörper von FcRn beeinflusst zu sein.

hFcRn-transgene Mäuse können erfolgreich eingesetzt werden, um den hFcRn-Einfluss *in vivo* zu bewerten. Aus den Daten der vorliegenden Studie lässt sich allerdings kein Vorteil für den Einsatz hFcRn-transgener Mäuse bei der Evaluation der PK der untersuchten hIgGs ablesen. Im Besonderen war es mit den Mäusen nicht möglich die PK von Primaten vorherzusagen. Mögliche Gründe:

- 1) Dies lässt sich darauf zurückführen, dass FcRn eine wichtige Rolle bei der Pharmakokinetik von hIgG in Mäusen und Primaten spielt. Die PKs von IgGs, die auf membrangebundene Antigene abzielen, sind bei Primaten oft durch TMDD beeinflusst, dies wurde bei Mäusen nicht beobachtet.
- 2) Des Weiteren ist die Clearance kleiner Moleküle oft von der Körpergröße abhängig. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings, dass die Clearance von hIgGs nicht immer dieses Verhalten zeigt.
- 3) Auch die niedrigen endogenen IgG-Spiegel der hFcRn-transgenen Mäuse könnten mit ursächlich sein, da bei niedrigem endogenen IgG keine Konkurrenz mit dem therapeutischen IgG um Bindungsstellen am FcRn besteht.

Der Vergleich muriner *in vivo* Daten mit SPR-Messungen demonstriert in allen Vergleichen eine hohe Korrelation zwischen der Clearance und der Dissoziationskonstante, während keine klare Korrelation zwischen $t_{1/2}$ und Assoziationskonstante oder $t_{1/2}$ und Gleichgewichtskonstante gesehen wurde.

FcRn-defiziente Mäuse und FcRn-humanisierte Mäuse werden oft als Tiermodell bei der pharmakokinetischen Analyse monoklonaler Antikörper eingesetzt. Phänotypische Parameter solcher Mäuse wurden allerdings nur in wenigen Studien untersucht. Daher wurden in dieser Arbeit das Körperwachstum sowie klinisch-chemische und hämatologische Parameter analysiert.

Wildtyp-Mäuse, FcRn-defiziente Mäuse und die genomische hFcRn-transgene Linie lassen in den ersten 100 Lebenstagen ein ähnliches Körperwachstum erkennen. Im Gegensatz dazu besitzt die cDNA-tragende hFcRn-transgene Linie ein signifikant niedrigeres Wachstum. Zusätzlich zeigen Nachkommen dieser Linie eine hohe Mortalität, wenn sie am 18. Tag routinemäßig abgesetzt werden.

Da FcRn-abhängiges Recycling Albumin und IgG vor dem intrazellulären Abbau schützt, weisen FcRn-defiziente Mäuse, denen dieser Mechanismus fehlt, niedrige Serumkonzentrationen beider Proteine auf. Es wird angenommen, dass die Hypalbuminämie der FcRn-defizienten Mäuse die meisten anderen Veränderungen des Blutes wie z.B. Anämie, Hyperlipoproteinämie, Hyperkalzämie und Hypoproteinämie verursacht.

Die endogene murine IgG-Konzentration von hFcRn-transgenen Mäusen betrug nur 10 % der Konzentration von Wildtyp-Mäusen. Grund hierfür ist, dass hFcRn kaum in der Lage ist murines IgG zu binden und zu recyceln. Der Albuminspiegel, der hFcRn-transgenen Mäuse, war nicht so stark beeinträchtigt wie der der FcRn-defizienten Mäuse.

Generell ist zu sagen, dass die pharmakokinetischen Untersuchungen zeigen, dass FcRn ein wichtiger, aber nicht der einzige Einflussfaktor der Pharmakokinetik therapeutischer hIgGs in Primaten und Mäusen darstellt. Daher sind hFcRn-transgene Mäuse nicht das ideale Modell für die Vorhersage humaner Pharmakokinetiken *in vivo*.

Die Blutanalyse FcRn-modifizierter Mäuse demonstriert, dass FcRn Albumin und IgG vor dem Abbau schützt und Albumin essentiell für die Homöostase einer Vielzahl hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter ist.

7 SUMMARY

Clinical laboratory diagnostics and pharmacokinetics of humanized therapeutic antibodies in human FcRn transgenic mice

Preclinical assessments of humanized therapeutic antibodies are frequently carried out in mice to evaluate pharmacokinetics (PK). However, conventional rodent models do not appropriately reflect human antibody PK, because the neonatal Fc receptor (FcRn), playing a critical role in regulating IgG homeostasis, shows species-specific differences in IgG binding. Prediction of human PK is therefore routinely done in primates. Consequently, there is a need for improved preclinical rodent models, which suitably mimic human FcRn (hFcRn) function.

To determine whether hFcRn-transgenic mice are a suitable rodent model for humanized IgG (hIgG) therapeutic development, the PK of five functional and structural different hIgG antibodies were tested *in vivo* using wild-type mice, FcRn-deficient mice and two different transgenic mouse lines, both deficient in murin FcRn (mFcRn), but carrying the hFcRn gene as cDNA or genomic DNA insertion. In addition, the mouse data were compared to data obtained from primates and to *in vitro* binding studies to hFcRn, determined by surface plasmon resonance (SPR).

PK assessment showed that all hIgG antibodies had biphasic serum concentration time profiles in mice. No indication for accelerated clearance due to an immune response or due to target-mediated drug disposition (TMDD) was observed. As expected, clearance, area under the curve, and terminal half life ($t_{1/2}$) of the used therapeutic IgGs administered to FcRn-modified mice, were dependent on the presence of FcRn and were proportional to the number of transgen copies. Interestingly only one of five tested antibodies had a volume of distribution, which seemed to be affected by FcRn.

HFcRn-transgenic mice can successfully be used to evaluate hFcRn influence *in vivo*, but based on data of the present investigation, there was no benefit in using hFcRn-transgenic mice to evaluate the PK of hIgG. In particular, it was not possible to predict primate PK from the mice. Reasons for that are:

1) This is because FcRn plays an important role in the PK of hIgG in mice and primates, but PK of IgG antibodies, targeting membrane bound antigens, are often influenced by TMDD in primates, which was not observed in mice.

2) Further more, body size is often regarded to be a predictor of clearance of small molecules. However, the results of the present study indicate that hIgG clearance do not always match with this observation.

3) Also this might be due to the low endogenous IgG levels of hFcRn-transgenic mice, because if there is low endogenous IgG it can not compete with the therapeutic IgG for binding sites on FcRn.

The comparison of the mouse *in vivo* data with SPR-measurements demonstrates high correlation between clearance and dissociation rate in all cases, while no clear correlation was seen between $t_{1/2}$ and complex formation rate or $t_{1/2}$ and equilibrium constant.

FcRn-deficient mice as well as FcRn-humanized mice have often been used as animal models in the pharmacokinetic analysis of monoclonal antibodies. However, only few studies investigated the phenotypic parameters in such mice. Thus, in this study the range of growth, as well as clinical chemistry and hematologic parameters were analyzed.

Wild-type mice, FcRn-deficient mice, and the genomic hFcRn-transgenic line showed similar growth in the first 100 days of life. In contrast the cDNA hFcRn-transgenic line showed significant lower growth and pups of this line showed high mortality when weaned routinely on day 18.

Since FcRn-mediated recycling prevents albumin and IgG from an intracellular degradation, FcRn-deficient mice lacking such a FcRn-mediated recycling process show decreased serum concentrations of both proteins. It is hypothesized that hypoalbuminemia causes most of the other alterations seen in the blood of FcRn-deficient mice such as anemia, hyperlipoproteinemia, hypercalcemia and hypoproteinemia. The endogenous murin IgG concentrations of hFcRn-transgenic mice were only one-tenth of levels observed in wild-type mice because hFcRn is not able to bind and to recycle murin IgG. The albumin level of hFcRn-transgenic mice was not so much affected as in FcRn-deficient mice.

In conclusion, the results of the pharmacokinetic investigation demonstrate that FcRn is an important, but not the only determining factor of the pharmacokinetic of therapeutic hIgGs in primates and mice. Therefore, hFcRn-transgenic mice are not the ideal model for the prediction of human PK *in vivo*.

The blood analysis of FcRn-modified mice demonstrates that FcRn protects albumin and IgG from degradation and that albumin is essential for the homeostasis of much hematologic and clinical chemical parameters.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aigner B, Rathkolb B, Mohr M, Klempt M, Hrabec de AM, Wolf E (2007) Generation of ENU-induced mouse mutants with hypocholesterolemia: novel tools for dissecting plasma lipoprotein homeostasis. *Lipids*, 42, 731-737.

Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS (2007) Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J.Immunol.*, 179, 4580-4588.

Akilesh S, Huber TB, Wu H, et al (2008) Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105, 967-972.

Bachmann K, Pardoe D, White D (1996) Scaling basic toxicokinetic parameters from rat to man. *Environ.Health Perspect.*, 104, 400-407.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol.Dis.*, 16, 1-13.

Boehm H, Dimigen J, Gerold S, Haemisch A, Luebbe R, Ott S. (2007a) Tiergerechte Haltung: Labormäuse. Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung/GV-SOLAS. *LA - ger*.

Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, Zacharowski K (2007b) Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol.Chem.*, 388, 547-554.

Borvak J, Richardson J, Medesan C, et al (1998) Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int.Immunol.*, 10, 1289-1298.

Boxenbaum H (1982) Comparative pharmacokinetics of benzodiazepines in dog and man. *J.Pharmacokinet.Biopharm.*, 10, 411-426.

Brambell FW (1966) The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet*, 2, 1087-1093.

Brambell FW, Hemmings WA, Morris IG (1964) A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature*, 203, 1352-1354.

Caldwell GW, Masucci JA, Yan Z, Hageman W (2004) Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: can human CL, Vss and t1/2 be predicted from in-vivo rat data? *Eur.J.Drug Metab Pharmacokinet.*, 29, 133-143.

Cashion AK, Driscoll CJ, Sabek O (2004) Emerging genetic technologies in clinical and research settings. *Biol.Res.Nurs.*, 5, 159-167.

Cervenak J, Kacs Kovics I (2009) The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, 128, 171-177.

Chamat S, Walsh EE, Anderson D, et al (1999) Human monoclonal antibodies isolated from spontaneous Epstein-Barr virus-transformed tumors of Hu-SPL-SCID mice and specific for fusion protein display broad neutralizing activity toward respiratory syncytial virus. *J.Infect.Dis.*, 180, 268-277.

Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, Anderson CL (2003) The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J.Exp.Med.*, 197, 315-322.

Crowley H, Alroy J, Sproule TJ, Roopenian D, Huber BT (2006) The MHC class I-related FcRn ameliorates murine Lyme arthritis. *Int.Immunol.*, 18, 409-414.

Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H (2006) Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J.Biol.Chem.*, 281, 23514-23524.

Datta-Mannan A, Witcher DR, Tang Y, Watkins J, Jiang W, Wroblewski VJ (2007a) Humanized IgG1 variants with differential binding properties to the neonatal Fc receptor: relationship to pharmacokinetics in mice and primates. *Drug Metab Dispos.*, 35, 86-94.

Datta-Mannan A, Witcher DR, Tang Y, Watkins J, Wroblewski VJ (2007b) Monoclonal antibody clearance. Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor. *J.Biol.Chem.*, 282, 1709-1717.

Dickinson BL, Badizadegan K, Wu Z, et al (1999) Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J.Clin.Invest.*, 104, 903-911.

Dietschy JM, Turley SD (2002) Control of cholesterol turnover in the mouse. *J.Biol.Chem.*, 277, 3801-3804.

Donovan J, Brown P (2006) Animal identification. *Curr.Protoc.Immunol.*, Chapter 1, Unit.

Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ (1969) The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 63, 78-85.

European Union (1986) European Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the member states regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities L 358*, 18/12/1986.

Forth W, Henschler D, Rummel W (2005) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier GmbH, München.

Freeman HC, Hugill A, Dear NT, Ashcroft FM, Cox RD (2006) Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 55, 2153-2156.

- Gailus-Durner V, Fuchs H, Adler T, et al (2009) Systemic first-line phenotyping. *Methods Mol.Biol.*, 530, 463-509.
- Gallagher SR, Desjardins PR (2008) Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr.Protoc.Protein Sci.*, Appendix 3, Appendix.
- Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, Tsen MF, Lee Y, Ward ES (1996) Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Eur.J.Immunol.*, 26, 690-696.
- Ghetie V, Popov S, Borvak J, et al (1997) Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat.Biotechnol.*, 15, 637-640.
- Ghetie V, Ward ES (2000) Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu.Rev.Immunol.*, 18, 739-766.
- Ghetie V, Ward ES (2002) Transcytosis and catabolism of antibody. *Immunol.Res.*, 25, 97-113.
- Gibiansky L, Gibiansky E (2009) Target-mediated drug disposition model: relationships with indirect response models and application to population PK-PD analysis. *J.Pharmacokinet.Pharmacodyn.*, 36, 341-351.
- Gibson JG, Evans WA (1937) Clinical studies of the blood Volume. I. Clinical application of a method employing the azo dye "Evans Blue" and the spectrophotometer. *J.Clin.Invest*, 16, 301-316.
- Goodman GE, Beaumier P, Hellstrom I, Fernyhough B, Hellstrom KE (1985) Pilot trial of murine monoclonal antibodies in patients with advanced melanoma. *J.Clin.Oncol.*, 3, 340-352.
- Griffiths SA, Lumley CE (1998) Non-clinical safety studies for biotechnologically-derived pharmaceuticals: conclusions from an international workshop. *Hum.Exp.Toxicol.*, 17, 63-83.
- Haymann JP, Levraud JP, Bouet S, et al (2000) Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult human kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.*, 11, 632-639.
- Hedrich H (2004) The Laboratory Mouse. (ed Hedrich H), Elsevier Academic Press, London.
- Hinton PR, Johlfs MG, Xiong JM, et al (2004) Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J.Biol.Chem.*, 279, 6213-6216.
- Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N (2006) An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *J.Immunol.*, 176, 346-356.
- Holford NH (1996) A size standard for pharmacokinetics. *Clin.Pharmacokinet.*, 30, 329-332.

Horky J, Vacha J, Znojil V (1978) Comparison of life span of erythrocytes in some inbred strains of mouse using ¹⁴C-labelled glycine. *Physiol Bohemoslov.*, 27, 209-217.

Inaba M, Morii H, Katsumata T, et al (2000) Hyperparathyroidism is augmented by ovariectomy in Nagase analbuminemic rats. *J.Nutr.*, 130, 1543-1547.

Israel EJ, Patel VK, Taylor SF, Marshak-Rothstein A, Simister NE (1995) Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice. *J.Immunol.*, 154, 6246-6251.

Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, Schoenfeld D, Simister NE (1996) Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology*, 89, 573-578.

Jakobovits A (1995) Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 6, 561-566.

Johannessen B, Haugen T, Scott CS (2001) Standardisation of platelet counting accuracy in blood banks by reference to an automated immunoplatelet procedure: comparative evaluation of Cell-Dyn CD4000 impedance and optical platelet counts. *Transfus.Apher.Sci.*, 25, 93-106.

Jones EA, Waldmann TA (1972) The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J.Clin.Invest*, 51, 2916-2927.

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321, 522-525.

Junghans RP (1997) Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. *Immunol.Res.*, 16, 29-57.

Junghans RP, Anderson CL (1996) The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 5512-5516.

Jungi TW (1996) Zelluläre und molekulare Grundlagen der Immunologie.

Karanikas G, Ulrich-Pur H, Becherer A, Wiesner K, Dudczak R, Raderer M, Kletter K (2002) Uptake of indium-111-labeled human polyclonal immunoglobulin G in pancreatic cancer: in vivo and in vitro studies. *Oncol.Rep.*, 9, 353-357.

Keller F (1993) Statistik für naturwissenschaftliche Berufe. pmi Verlagsgruppe GmbH, Frankfurt am Main.

Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF (1994) Human immune response to monoclonal antibodies. *J.Immunother.Emphasis.Tumor Immunol.*, 15, 42-52.

Kile BT, Mason-Garrison CL, Justice MJ (2003) Sex and strain-related differences in the peripheral blood cell values of inbred mouse strains. *Mamm.Genome*, 14, 81-85.

Kim J, Bronson CL, Hayton WL, Radmacher MD, Roopenian DC, Robinson JM, Anderson CL (2006) Albumin turnover: FcRn-mediated recycling saves as much albumin from degradation as the liver produces. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, 290, G352-G360.

Kim JK, Tsen MF, Ghetie V, Ward ES (1994) Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. *Eur.J.Immunol.*, 24, 542-548.

Kleiber M (1947) Body size and metabolic rate. *Physiol Rev.*, 27, 511-541.

Kleiber M (1975) Metabolic turnover rate: a physiological meaning of the metabolic rate per unit body weight. *J.Theor.Biol.*, 53, 199-204.

Klempt M, Rathkolb B, Fuchs E, de Angelis MH, Wolf E, Aigner B (2006) Genotype-specific environmental impact on the variance of blood values in inbred and F1 hybrid mice. *Mamm.Genome*, 17, 93-102.

Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y (2002) FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, 282, F358-F365.

Kohler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.

Kraft W, Dürr UM (2005) Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany.

Kuo TT, de Muinck EJ, Claypool SM, et al (2009) N-Glycan Moieties in Neonatal Fc Receptor Determine Steady-state Membrane Distribution and Directional Transport of IgG. *J.Biol.Chem.*, 284, 8292-8300.

Kuroiwa Y, Kasinathan P, Sathiyaseelan T, et al (2009) Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle. *Nat.Biotechnol.*, 27, 173-181.

Ladenson JH, Lewis JW, McDonald JM, Slatopolsky E, Boyd JC (1979) Relationship of free and total calcium in hypercalcemic conditions. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 48, 393-397.

Levy G (1994) Pharmacologic target-mediated drug disposition. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 56, 248-252.

Ling J, Zhou H, Jiao Q, Davis HM (2009) Interspecies scaling of therapeutic monoclonal antibodies: initial look. *J.Clin.Pharmacol.*, 49, 1382-1402.

Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP (2004) Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J.Pharm.Sci.*, 93, 2645-2668.

Loeb WF, Quimby FW (1989) The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. (eds Loeb WF, Quimby FW), Pergamon Press, Inc, New York.

Loescher W, Ungemach FR, Kroker R (2006) Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Parey, Stuttgart, Germany.

- Lu JF, Bruno R, Eppler S, Novotny W, Lum B, Gaudreault J (2008) Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 62, 779-786.
- MacKenzie PI, Messer M (1976) Studies on the origin and excretion of serum alpha-amylase in the mouse. *Comp Biochem.Physiol B*, 54, 103-106.
- Mager DE (2006) Target-mediated drug disposition and dynamics. *Biochem.Pharmacol.*, 72, 1-10.
- Mager DE, Jusko WJ (2001) General pharmacokinetic model for drugs exhibiting target-mediated drug disposition. *J.Pharmacokinet.Pharmacodyn.*, 28, 507-532.
- Mahmood I (2004) Interspecies scaling of protein drugs: prediction of clearance from animals to humans. *J.Pharm.Sci.*, 93, 177-185.
- Mahmood I (2009a) Pharmacokinetic allometric scaling of antibodies: application to the first-in-human dose estimation. *J.Pharm.Sci.*, 98, 3850-3861.
- Mahmood I (2009b) Role of fixed coefficients and exponents in the prediction of human drug clearance: how accurate are the predictions from one or two species? *J.Pharm.Sci.*, 98, 2472-2493.
- Mahmood I, Green MD (2005) Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins. *Clin.Pharmacokinet.*, 44, 331-347.
- Martin MG, Wu SV, Walsh JH (1997) Ontogenetic development and distribution of antibody transport and Fc receptor mRNA expression in rat intestine. *Dig.Dis.Sci.*, 42, 1062-1069.
- Medesan C, Cianga P, Mummert M, Stanescu D, Ghetie V, Ward ES (1998) Comparative studies of rat IgG to further delineate the Fc:FcRn interaction site. *Eur.J.Immunol.*, 28, 2092-2100.
- Meredith RF, LoBuglio AF, Plott WE, et al (1991) Pharmacokinetics, immune response, and biodistribution of iodine-131-labeled chimeric mouse/human IgG1,k 17-1A monoclonal antibody. *J.Nucl.Med.*, 32, 1162-1168.
- Montoyo HP, Vaccaro C, Hafner M, Ober RJ, Mueller W, Ward ES (2009) Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*
- Morell A, Skvaril F, Hitzig WH, Barandun S (1972) IgG subclasses: development of the serum concentrations in "normal" infants and children. *J.Pediatr.*, 80, 960-964.
- Morell A, Terry WD, Waldmann TA (1970) Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J.Clin.Invest*, 49, 673-680.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 81, 6851-6855.

- Mould DR, Green B (2010) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development. *BioDrugs*, 24, 23-39.
- Nagase S, Shimamune K, Shumiya S (1979) Albumin-deficient rat mutant. *Science*, 205, 590-591.
- Neuberger MS, Williams GT, Fox RO (1984) Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature*, 312, 604-608.
- Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B (2002) Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*, 36, 20-42.
- Nuster R, Paltauf G, Burgholzer P (2007) Comparison of surface plasmon resonance devices for acoustic wave detection in liquid. *Opt.Express*, 15, 6087-6095.
- Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES (2001) Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int.Immunol.*, 13, 1551-1559.
- Ochriotor JD, Harrison KA, Zahedi K, Mortensen RF (2000) Role of STAT3 and C/EBP in cytokine-dependent expression of the mouse serum amyloid P-component (SAP) and C-reactive protein (CRP) genes. *Cytokine*, 12, 888-899.
- Peters T (1996) All about Albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Academic Press, San Diego.
- Petkova SB, Akilesh S, Sproule TJ, et al (2006) Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int.Immunol.*, 18, 1759-1769.
- Popov S, Hubbard JG, Kim J, Ober B, Ghetie V, Ward ES (1996) The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn. *Mol.Immunol.*, 33, 521-530.
- Qiao SW, Kobayashi K, Johansen FE, et al (2008) Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105, 9337-9342.
- Raghavan M, Bjorkman PJ (1996) Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 12, 181-220.
- Raghavan M, Chen MY, Gastinel LN, Bjorkman PJ (1994) Investigation of the interaction between the class I MHC-related Fc receptor and its immunoglobulin G ligand. *Immunity*, 1, 303-315.
- Rathkolb B, Decker T, Fuchs E, et al (2000) The clinical-chemical screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: screening for clinically relevant phenotypes. *Mamm.Genome*, 11, 543-546.

- Reff ME, Heard C (2001) A review of modifications to recombinant antibodies: attempt to increase efficacy in oncology applications. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 40, 25-35.
- Richter WF, Gallati H, Schiller CD (1999) Animal pharmacokinetics of the tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin fusion protein lenercept and their extrapolation to humans. *Drug Metab Dispos.*, 27, 21-25.
- Roberts DM, Guentert M, Rodewald R (1990) Isolation and characterization of the Fc receptor from the fetal yolk sac of the rat. *J.Cell Biol.*, 111, 1867-1876.
- Roopenian DC, Akilesh S (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat.Rev.Immunol.*, 7, 715-725.
- Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ (2010) Human FcRn Transgenic Mice for Pharmacokinetic Evaluation of Therapeutic Antibodies. *Methods Mol.Biol.*, 602, 93-104.
- Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, et al (2003) The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J.Immunol.*, 170, 3528-3533.
- Schlachetzki F, Zhu C, Pardridge WM (2002) Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. *J.Neurochem.*, 81, 203-206.
- Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC, Jr. (1985) Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res.*, 45, 879-885.
- Seghatchian J (2006) A new platelet storage lesion index based on paired samples, without and with EDTA and cell counting: comparison of three types of leukoreduced preparations. *Transfus.Apher.Sci.*, 35, 283-292.
- Sesarman A, Vidarsson G, Sitaru C (2010) The neonatal Fc receptor as therapeutic target in IgG-mediated autoimmune diseases. *Cell Mol.Life Sci.*
- Shah U, Dickinson BL, Blumberg RS, Simister NE, Lencer WI, Walker WA (2003) Distribution of the IgG Fc receptor, FcRn, in the human fetal intestine. *Pediatr.Res.*, 53, 295-301.
- Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, Dillman RO (1985) Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J.Immunol.*, 135, 1530-1535.
- Simister NE (2003) Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*, 21, 3365-3369.
- Simister NE, Mostov KE (1989) An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature*, 337, 184-187.
- Simister NE, Rees AR (1985) Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur.J.Immunol.*, 15, 733-738.

- Story CM, Mikulska JE, Simister NE (1994) A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *J.Exp.Med.*, 180, 2377-2381.
- Sugiyama K, Emori T, Shumiya S, Nagase S (1984) Anemia and potassium permeability of red blood cells in analbuminemic rats. *Jikken Dobutsu*, 33, 307-318.
- Tabrizi MA, Tseng CM, Roskos LK (2006) Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discov.Today*, 11, 81-88.
- Tang H, Hussain A, Leal M, Mayersohn M, Fluhler E (2007) Interspecies prediction of human drug clearance based on scaling data from one or two animal species. *Drug Metab Dispos.*, 35, 1886-1893.
- Ternant D, Paintaud G (2005) Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert.Opin.Biol.Ther.*, 5 Suppl 1, S37-S47.
- Tiwari B, Junghans RP (2005) Functional analysis of the mouse Fcgrt 5' proximal promoter. *Biochim.Biophys.Acta*, 1681, 88-98.
- Trion A, de Maat MP, Jukema JW, et al (2005) No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis development in apolipoprotein E*3-leiden/human C-reactive protein transgenic mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25, 1635-1640.
- Vaccaro C, Bawdon R, Wanjie S, Ober RJ, Ward ES (2006) Divergent activities of an engineered antibody in murine and human systems have implications for therapeutic antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103, 18709-18714.
- Van Tol A, Jansen EH, Koomans HA, Joles JA (1991) Hyperlipoproteinemia in Nagase analbuminemic rats: effects of pravastatin on plasma (apo)lipoproteins and lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J.Lipid Res.*, 32, 1719-1728.
- Vaughn DE, Bjorkman PJ (1996) The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron*, 16, 261-273.
- Vidarsson G, Stemerding AM, Stapleton NM, et al (2006) FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood*, 108, 3573-3579.
- Wagner CL, Schantz A, Barnathan E, et al (2003) Consequences of immunogenicity to the therapeutic monoclonal antibodies ReoPro and Remicade. *Dev.Biol.(Basel)*, 112, 37-53.
- Wagner G, Wyss DF (1994) Cell surface adhesion receptors. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 4, 841-851.
- Waldmann TA, Strober W (1969) Metabolism of immunoglobulins. *Prog.Allergy*, 13, 1-110.
- Wang W, Wang EQ, Balthasar JP (2008) Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 84, 548-558.

Ward ES, Ober RJ (2009) Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn. *Adv.Immunol.*, 103, 77-115.

Ward ES, Zhou J, Ghetie V, Ober RJ (2003) Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int.Immunol.*, 15, 187-195.

West GB, Brown JH (2005) The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. *J.Exp.Biol.*, 208, 1575-1592.

Williams AF, Barclay AN (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu.Rev.Immunol.*, 6, 381-405.

www.biacore.com (2010) About Biacore Life Sciences; Technology.

www.gv-solas.de (2009) Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. *Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT.*

www.jaxmice.jax.org (2007) Physiological Data Summary - C57BL/6J (000664).

www.taconic.com (2004) B6 Physiological Data Summary.

Yeung YA, Leabman MK, Marvin JS, et al (2009) Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. *J.Immunol.*, 182, 7663-7671.

Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, et al (2004) Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity.*, 20, 769-783.

Yoshida M, Kobayashi K, Kuo TT, et al (2006) Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J.Clin.Invest.*, 116, 2142-2151.

Zhou J, Mateos F, Ober RJ, Ward ES (2005) Conferring the binding properties of the mouse MHC class I-related receptor, FcRn, onto the human ortholog by sequential rounds of site-directed mutagenesis. *J.Mol.Biol.*, 345, 1071-1081.

Zhu X, Meng G, Dickinson BL, et al (2001) MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J.Immunol.*, 166, 3266-3276.

9 ANHANG

9.1 Tabellen

Tabelle 21A: Durchschnittliche Gewichte der Mauslinien 0 – 40 Tage

Alter (d)	C57BL/6J		mFcRn -/-		hFcRn (276) Tg +/-		hFcRn (276) Tg +/+		hFcRn (32) Tg +/-		hFcRn (32) Tg +/+	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
0	1,4		1,4		1,2		1,3		1,2		1,0	
1	1,5		1,4		1,4		1,4		1,3		1,2	
2	1,3		2,0		2,0		1,5		1,5		2,0	
3	2,2		1,8		2,0		2,5		1,9		2,9	
4	2,4		3,3		3,0		2,0		2,8		2,8	
5	3,3				3,0		2,4		3,3		3,5	
6	3,4		2,7		3,3		3,2		4,0		3,9	
7	4,5				3,7		3,1		3,5		3,5	
8	4,3		3,5		4,2		4,2		5,0		5,1	
9	5,4		4,8		4,9		4,9		5,9		6,5	
10	5,7		4,9		5,8		4,5		5,1		6,0	
11	6,4		5,4		5,8		5,0		6,2		6,0	
12	5,7				6,6		5,8		7,8		6,6	
13	7,2				7,7		6,6		8,6			
14	6,6		6,5		7,3		5,2				7,6	
15	6,2		7,4				4,4				6,8	
16	6,7		7,3		8,8		5,8		7,4		7,8	
17	7,1		7,0		7,9		5,9		9,8		7,6	
18	7,5	7,8		10,8	9,0		7,0	6,0	9,0	10,0	9,3	
19	7,4	6,8	9,0	7,6			7,0				7,9	8,8
20	8,3	7,8	9,4	9,6	9,9	8,5	7,2	6,0	9,9	9,3	9,8	9,0
21	9,4	8,3	8,0	7,8	9,8	9,0	7,7	7,0			10,7	9,2
22	11,6	9,0	9,4	10,5	10,0	10,3	9,0	8,2	11,3	10,7	8,3	8,2
23	10,3	9,8	11,5	11,0	11,3	10,8	11,3		9,7	10,8	10,5	10,0
24	11,1	10,8	10,4	9,4	10,8	11,1	11,0	9,5				8,0
25	12,4	11,0	14,7	12,8			12,0	9,8	14,7	15,0	12,5	10,9
26	13,7	11,5	15,1	14,1	12,8	12,0	14,2	13,4	16,0	15,0	14,3	13,5
27	14,5	13,2	15,4	14,6	17,0	14,0	15,9	12,7	16,9	13,6	15,3	15,8
28	16,8	14,0	17,6	15,5	16,5	14,7	14,0		18,0	18,0	15,7	15,7
29	16,8	14,6	18,5	15,5	17,4	14,8			16,2	15,8		13,2
30	17,4	15,0	18,7	16,1	18,0	15,6	16,0	12,5	20,0	15,3	17,7	15,0
31	18,4	16,3	18,9	15,4	18,3	16,0	16,7	14,8		16,0		
32	19,7		20,9	17,3			17,3	13,5	19,0		19,0	16,8
33	20,0	16,3	21,5	17,7	22,3	17,5					18,7	15,0
34	20,6	17,0	22,2	18,1	18,5	18,0	19,1	16,5	22,1	18,3	19,5	18,5
35	19,5	17,8	21,8	18,2	20,0	19,5	17,7	14,7	22,4	19,2	21,0	18,5
36	21,1	17,2	21,7	17,7		17,7	17,5	14,8	22,3	18,1	23,0	19,3
37	20,8	19,7	21,6	18,2	21,0	17,8			20,1	17,9		
38	20,8	16,7	21,9	18,1	21,4	18,5	20,9	18,1	22,4	17,7		17,6
39	21,6	19,3	23,6	18,2	23,0	17,5	20,9		22,0	19,0	22,3	18,3
40	21,7		23,3	18,9	23,0	18,3	20,8		25,3			18,4

Von Tag 0 – 17 handelt es sich um gemischtgeschlechtliche Werte.

Fortsetzung siehe Folgeseite

Tabelle 21B: Durchschnittliche Gewichte der Mauslinien 41 – 80 Tage

Alter (d)	C57BL/6J		mFcRn -/-		hFcRn (276) Tg +/-		hFcRn (276) Tg +/+		hFcRn (32) Tg +/-		hFcRn (32) Tg +/+	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
41	22,0		22,4	20,0	24,2	18,8	19,0	17,0	24,0	18,4	22,4	19,7
42	21,6	19,9	24,1	18,9	23,3	19,5	20,4	17,5	24,2	18,3	23,3	19,4
43	21,3	18,0	25,3	18,6	23,9	19,1			22,8	18,4	23,7	20,0
44	21,6	20,5	22,3	21,0	22,8	19,4	21,1	18,5	24,8	18,8		
45	23,3	20,5		18,2	22,0	17,9	22,2	17,6	21,4	18,8	25,0	19,5
46	24,3	19,5	24,2		23,1	18,3	21,0		26,0	18,4	24,2	21,4
47	22,8			19,8	23,8	18,6			26,5		23,3	20,0
48	23,3		25,0	20,5	24,7	19,5	20,0	17,3	25,8	19,6	24,7	20,3
49	22,8	19,0	25,8	20,5	24,6	19,5			25,1	18,2	23,9	20,7
50	23,1	19,7	24,5	21,3	25,0	19,1	21,3	17,7	24,6	20,2	25,8	20,0
51	22,8	20,0	24,7	19,5	25,1	19,4	23,5	17,8	24,5	20,0	25,3	20,3
52	23,9				25,5	19,9	22,9		26,4	19,8	24,0	20,3
53	25,1	19,2	24,2	21,0	24,4	20,1	23,2	19,0		19,8	22,9	18,7
54	24,4		24,0		25,6	19,9	24,5	18,8	26,3	20,0		20,6
55	25,8	20,7	25,9	20,1	24,6	20,0	22,3	18,8		20,0	23,7	19,6
56	25,3	20,4	24,8	19,8	24,9	20,3	23,4	17,3	25,9	20,0		
57	25,2	19,7	27,7	20,3	26,3	19,0	23,3	18,8	26,0	20,1		19,7
58	25,6	19,4	29,0	19,3	24,3	19,6	25,0		26,5	20,7	27,5	21,3
59	24,3	22,0	26,0	19,4	26,0	20,0		19,2	27,8	20,0	25,0	20,2
60	25,7	20,6	27,5	20,7	24,7	19,6	25,0	18,0	23,8	20,3	25,0	20,0
61	27,0	20,7	27,2		26,0	21,3				20,4		21,0
62	25,2	18,8	27,0	21,1	26,7	20,3	24,5	19,2		22,0	26,4	20,3
63	26,8		26,8	21,0	24,9	20,7	24,8	18,6	27,2	21,0	27,0	22,2
64	25,8	20,7			25,4	20,4	24,9	20,2	26,5	19,1	26,8	20,7
65	27,0	20,3	28,0	19,3	26,0	22,0	24,3	19,0	27,6	21,0		21,2
66	27,4	20,7	28,3	21,0	27,0	21,0	25,5			20,8		21,7
67	26,0	21,0	27,6		26,7	21,0	25,8	20,0		20,6	26,3	21,4
68	28,0	21,3	29,3	21,0	27,5	22,3	23,0	19,8	30,5	22,4		21,7
69	26,2	20,7	28,3	21,0	28,6	20,8	25,3	20,6	30,0	21,4	27,0	20,5
70	26,5	21,0	27,0	21,1	26,3	21,1	24,9	21,3	26,8	20,4		20,7
71	25,9	20,6	29,0	22,3	24,7	20,3	24,4	19,7	27,1	21,1	28,3	21,3
72	26,3	21,0	28,7	19,3	27,5		24,9	20,0	28,7	21,0	27,3	23,5
73	27,8	20,8	28,0	19,0	30,0	22,8	25,6	19,6	27,3	21,3	27,8	21,4
74	27,8	20,4	29,2	22,0	27,2	20,7	26,6	20,2	28,0	21,5		22,2
75	28,5	22,7	28,5		28,5	22,3	25,6	20,4	27,3	21,7	27,0	20,1
76	29,3	21,8	29,6	21,4	25,7	21,2	26,6	20,5	31,0	22,8		22,7
77	28,0	22,1			29,0	23,3	26,1	20,5	29,7	20,5		22,4
78	27,2	21,5	30,7	22,5	27,4	21,7	24,0	20,0	27,5	21,8	28,2	
79	27,6	22,5	27,8	20,6	28,3	21,3	24,9	21,0	28,0	21,8	30,0	20,6
80	27,1	21,5	28,0	20,4	28,8	21,3	26,5	20,6	31,5	21,6		21,2

Fortsetzung siehe Folgeseite

Tabelle 21C: Durchschnittliche Gewichte der Mauslinien 81 – 100 Tage

Alter (d)	C57BL/6J		mFcRn -/-		hFcRn (276) Tg +/-		hFcRn (276) Tg +/+		hFcRn (32) Tg +/-		hFcRn (32) Tg +/+	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
81	29,1	21,1	29,3	22,3	25,3	20,5	26,7	21,0	28,3	22,5		22,7
82	27,5	22,3	28,3	20,0	29,5	22,8	25,4	20,9		21,0	27,5	
83	28,5	21,3	28,8	22,0		21,7	26,5	20,3				24,0
84	30,3	22,7			26,7	21,2	27,5	20,7	29,5	22,3	27,6	22,0
85	28,5	21,7	29,7	23,0	27,9	21,8	26,0	20,8	28,2	19,0		
86	29,7	23,7	28,0	20,8	27,2	23,0	25,8	20,6	28,3	22,0	28,7	20,9
87	28,5	21,2	29,0	21,3	28,3	21,3	25,6	21,0		21,7	29,3	22,0
88	27,3	21,7	28,8	22,3	27,3	21,2	27,8	20,5	29,0	22,5		21,0
89	28,8	21,2	29,5		29,3	22,2		20,9		22,3	31,0	
90	29,2	23,7	30,3	20,0	29,0	21,3	27,9	21,5			27,4	23,0
91	28,0	21,5	29,4		27,0	22,3	26,3	21,7	28,2	23,0	29,8	22,3
92	27,1	21,4		21,3	28,6	23,3	26,0	20,4	28,5	23,0	30,0	24,0
93	28,9	22,4	28,0		27,0	21,7	26,6	20,5	29,0	21,7	31,0	23,0
94	28,5	21,5			30,0	24,0	26,0	20,2	28,5	20,0	29,7	24,8
95	29,8	21,8	30,7	21,2		21,6	25,0	21,3	28,5	22,1	29,5	22,9
96	29,7	21,5	28,4	23,0	26,8	21,7		20,8	27,3	21,4	29,3	22,0
97	28,1	22,8		20,4	28,2	22,7	26,7	20,3		22,0		21,7
98	28,3	21,9	28,7	22,7	29,3	23,0	28,9	21,0	29,0	23,5	28,0	23,0
99	28,3	22,6	29,9	21,4	27,8	24,7	27,3	20,9	29,0	22,8	30,5	21,7
100	29,1	21,6	29,3	23,3	28,2	24,0	28,8	20,7	29,2	22,8	29,9	23,3

Dargestellt sind Mittelwerte der Körpergewichte in Gramm der einzelnen Mauslinien nach Geschlechtern getrennt. Die Tabelle stellt die Grundlage zu Abbildung 14 dar.

Tabelle 22: Vergleichsdaten der Hämatologie von C57BL/6 aus der Literatur

Parameter (Einheit)	Kile et al, 2003		Klemp et al, 2006		Klemp et al, 2006		Champy et al, 2008		Taconic		Jackson	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
WBC	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
($\cdot 10^7/\mu\text{l}$)	6,2 ± 2,7	5,9 ± 1,1	3,4 ± 0,1	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2	5,3 ± 0,3	7,8 ± 0,3	7,8 ± 0,4	6,6 ± 2,6	4,5 ± 1,8	2,6	3,5
RBC	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
($\cdot 10^9/\mu\text{l}$)	9,6 ± 0,3	10,2 ± 0,3	9,1 ± 0,04	9,1 ± 0,1	9,8 ± 0,1	10,0 ± 0,2	9,8 ± 0,1	9,5 ± 0,1	8,4 ± 0,6	9,9 ± 0,4	10,6	10,8
HGB	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
(g/dl)	14,8 ± 0,5	15,4 ± 0,3	13,2 ± 0,9	13,6 ± 0,1	14,8 ± 0,2	15,9 ± 0,1	14,8 ± 0,1	14,7 ± 0,1	13,1 ± 0,9	15,2 ± 0,6	16,2	17,0
PCV	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
(%)	45,4 ± 1,7	46,2 ± 1,2					42,4 ± 0,3	41,8 ± 0,3	41,8 ± 3,3	48,8 ± 1,8	52,1	51,5
RETI	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
(%)											3,8	3,6
PLT	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
($\cdot 10^3/\mu\text{l}$)	1311 ± 79	1080 ± 79	633 ± 11	518 ± 16	727 ± 19	706 ± 13	1613 ± 18	1509 ± 48	1775 ± 171	1336 ± 82	1157	1019
MCHC	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
(g/dl)	32,6 ± 0,5	33,4 ± 0,3					34,9 ± 0,2	35,2 ± 0,2	31,5 ± 0,7	31,2 ± 0,4	31,2	33,2
MCV	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
(fl)	47,2 ± 1,5	45,1 ± 0,5	48,6 ± 0,1	49,0 ± 0,2	45,0 ± 0,2	44,8 ± 0,2	43,4 ± 0,1	44,1 ± 0,2	50,0 ± 2,0	49,0 ± 1,0	49,2	47,8
MCH	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
(pg)	15,4 ± 0,3	15,1 ± 0,2					15,1 ± 0,1	15,5 ± 0,1	15,7 ± 0,3	15,4 ± 0,3	15,4	15,8
MPV	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
(fl)	4,1 ± 0,1	4,2 ± 0,2									7,0	6,7
RDW	MW ± SD		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SD		MW	
(%)	18,8 ± 1,2	17,5 ± 0,7										

Hämatologische Werte von C57BL/6 aus diversen wissenschaftlichen Arbeiten und Angaben von Züchtern. Ein Teil der Werte sind Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung des Mittelwerts (SD), ein anderer Teil sind Mittelwerte (MW) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Tabelle 23: Qualität der Vergleichsdaten der Hämatologie von C57BL/6

Quelle	Stamm	Alter	Fütterung	Ort der Blutentnahme	Antikoagulant	Analysegerät
Kile et al, 2003	C57BL/6J	12 - 16 Wochen	?	retrobulbärer Venenplexus	EDTA	?
Klemp et al, 2006	C57BL/6	12 Wochen	nüchtern	retrobulbärer Venenplexus	EDTA	ABC Animal Blood Counter von Scil
Champy et al, 2008	C57BL/6J	12 Wochen	nüchtern	retrobulbärer Venenplexus	EDTA	Act Diff Vet
www.taconic.com	C57BL/6NTac	7 Wochen	nüchtern	Herzpunktion	EDTA	Celldyne 3500
www.jaxmice.jax.org	C57BL/6J	8 Wochen	gefüttert	retrobulbärer Venenplexus	EDTA	?

Da die Messwerte von Methoden und Geräten abhängig sind, wurden hier die veröffentlichten Angaben der Vergleichswerte zusammengestellt.

Tabelle 24: Vergleichsdaten Klinische Chemie von C57BL/6 aus der Literatur

Parameter	Einheit	Zhou, 2004		Klempf, 2006		Klempf, 2006		Champy et al 2008		Jackson		Boehm 2007		Taconic	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Natrium	mmol/l	151 ± 2,5	156 ± 10,0					150 ± 0,5	150 ± 0,3			155	158		
Kalium	mmol/l	6,35 ± 0,3	5,8 ± 0,5					4,6 ± 0,1	4,6 ± 0,1			4,3	4,6		
Kalzium	mmol/l			2,1 ± 0,01	2,2 ± 0,02	2,2 ± 0,02	2,2 ± 0,02	2,4 ± 0,03	2,4 ± 0,02	2,6	2,7	2,0	2,1	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,1
Eisen	µmol/l							10,6 ± 0,44	12 ± 0,38						
Chlorid	mmol/l							113 ± 0,5	113 ± 0,5						
Phosphat	mmol/l			2,3 ± 0,03	2,2 ± 0,05	2,2 ± 0,05	1,9 ± 0,04	2,07 ± 0,1	2,01 ± 0,10	3,3	3,3			3,4 ± 0,3	2,6 ± 0,3
TP	g/l	49,1 ± 2,7	46,9 ± 3,2	55 ± 0,2	53 ± 0,3	55 ± 0,4	55 ± 0,5	55 ± 0,7	55 ± 0,8	60	61	40	40		
Albumin	g/l	30,1 ± 1,2	29,6 ± 2,1					31 ± 0,3	31 ± 0,3	37	39			61 ± 4	62 ± 3
ALT	U/l	27,2 ± 5,0	26,5 ± 4,7	15,3 ± 0,8	13,8 ± 0,5	14,8 ± 0,8	12,5 ± 0,9	42 ± 4,9	44 ± 7,2	57	43	21	22	86 ± 160	90 ± 150
AST	U/l	32,2 ± 8,0	43,2 ± 9,5	31,5 ± 1,5	31,9 ± 1,3	30,8 ± 1,5	31,3 ± 2,2	194 ± 34	157 ± 17			45	51		
AP	U/l			178 ± 3,0	239 ± 5,9	149 ± 4,0	214 ± 4,2	127 ± 9,9	129 ± 7,2			153	129	165 ± 17	259 ± 58
α-Amylase	U/l	3035 ± 679	2595 ± 213	3220 ± 39	3414 ± 86	3651 ± 135	3542 ± 174	789 ± 39	721 ± 32			1942	1940		
CK	U/l	107 ± 33	119 ± 22,9	104 ± 8	77 ± 5	120 ± 13	107 ± 21			799	720	139	102		
LDH	U/l							675 ± 101	532 ± 39			348	293		
Glukose	mmol/l	8,69 ± 1,3	5,88 ± 1,22	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,22	6,6 ± 0,4	6,0 ± 0,39	4,9 ± 0,2	5,2 ± 0,2	8,7	9,8	8,3	9,9	9,3 ± 1,6	8,6 ± 0,8
Cholesterin	mmol/l	2,91 ± 0,3	2,03 ± 0,31	2,4 ± 0,03	2,0 ± 0,05	2,9 ± 0,1	2,5 ± 0,13	2,8 ± 0,1	2,5 ± 0,09	2,6	2,1	2,3	2,0		
TG	mmol/l	0,94 ± 0,2	0,78 ± 0,17	2,5 ± 0,1	2,8 ± 0,16	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,33	1,87 ± 0,1	2,1 ± 0,12	2,1	2,4	1,1	1,1		
Harnstoff	mmol/l			25,6 ± 0,4	27,1 ± 0,36	21,4 ± 0,7	19,9 ± 1,07	13,1 ± 0,4	11,3 ± 0,46			9,0	8,7		
Harnsäure	mmol/l			71,4 ± 3,6	77,4 ± 5,36	155 ± 11,3	137 ± 5,36					89	107		
HDL	mmol/l	2,2 ± 0,3	1,4 ± 0,14					1,97 ± 0,08	1,68 ± 0,08	2,3	1,8				
LDL	mmol/l							0,57 ± 0,03	0,56 ± 0,02						
Kreatinin	µmol/l	17,8 ± 2,2	16,8 ± 2,1	26,5 ± 0,9	24,8 ± 0,9	22,1 ± 0,9	20,3 ± 0,9	26,3 ± 0,7	26,5 ± 0,4			17	15		

Klinisch-chemische Werte von C57BL/6 aus diversen wissenschaftlichen Arbeiten und Angaben von Züchtern. Ein Teil der Werte sind Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung des Mittelwerts (SD), ein anderer Teil sind Mittelwerte (MW) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und eine Quelle zeigt Median-Werte.

Tabelle 25: Qualität der Vergleichsdaten der Klinischen Chemie von C57BL/6

Quelle	Stamm	Alter	Fütterung	Ort der Blutentnahme	Material	Analysegerät
Boehm et al, 2007	C57BL/6	10 - 12 Wochen	?	Herzpunktion	Serum	COBAS MIRA S Roche/Eppendorf EFOX 5053
Zhou et al, 2004	C57BL/6J	6 Wochen	?	Herzpunktion	Serum	Vitros DT60II Chemistry System Ortho-Clinical Diagnostics
Klemp et al, 2006	C57BL/6	12 Wochen	nüchtern	retrobulbärer Venenplexus	Li-Hep Plasma	Olympus AU400
Champy et al, 2008	C57BL/6J	12 Wochen	nüchtern	retrobulbärer Venenplexus	Li-Hep Plasma	Olympus Analysesystem
www.facominc.com	C57BL/6NTac	7 Wochen	nüchtern	Herzpunktion	Serum	Hitachi 717 automated analyzer
www.jaxmicejax.org	C57BL/6J	8 Wochen	gefüttert	retrobulbärer Venenplexus	Serum	Olympus Analysesystem

Da die Messwerte von Methoden und Geräten abhängig sind, wurden hier die veröffentlichten Angaben der Vergleichswerte zusammengestellt.
 ? = keine Angabe

Tabelle 26: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<P> 10 mg/kg

Linie, Geschlecht (Anzahl)	Material	AUC _{0-inf} (h*µg/ml)	AUC ₀₋₇₂ (h*µg/ml)	Cl (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)	t _{1/2} (h)
C57BL/6J ♀ (n = 5)	Serum	48084 ± 7057	37089 ± 3224	0,0034 ± 0,0005	0,0968 ± 0,0100	304,6 ± 85,9
C57BL/6J ♂ (n = 5)	Serum	61303 ± 14075	43740 ± 1982	0,0029 ± 0,0004	0,0823 ± 0,0126	401,0 ± 194,3
C57BL/6J ♀ (n = 5)	Plasma	69095 ± 11583	48574 ± 4325	0,0028 ± 0,0008	0,0672 ± 0,0148	367,9 ± 190,6
mFcRn -/- ♀ (n = 3)	Serum	9144 ± 1097	9146 ± 1105	0,0184 ± 0,0022	0,0606 ± 0,0051	41,2 ± 6,3
mFcRn -/- ♂ (n = 3)	Serum	9838 ± 1633	9842 ± 1633	0,0173 ± 0,0029	0,0506 ± 0,0046	37,1 ± 2,8
mFcRn -/- ♀ (n = 3)	Plasma	11479 ± 273	11474 ± 272	0,0145 ± 0,0003	0,0501 ± 0,0027	39,1 ± 1,4
hFcRn(276) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	34137 ± 2628	31281 ± 1797	0,0049 ± 0,0004	0,0776 ± 0,0010	187,8 ± 19,1
hFcRn(276) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	32671 ± 1276	30357 ± 894	0,0051 ± 0,0002	0,0755 ± 0,0009	176,4 ± 11,3
hFcRn(276) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	46003 ± 5590	33544 ± 3898	0,0037 ± 0,0005	0,1073 ± 0,0115	330,6 ± 38,0
hFcRn(276) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	42222 ± 1341	35471 ± 596	0,0040 ± 0,0001	0,0862 ± 0,0080	252,1 ± 47,1
hFcRn(32) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	35369 ± 3739	30827 ± 2804	0,0047 ± 0,0005	0,0928 ± 0,0184	214,8 ± 60,4
hFcRn(32) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	40753 ± 4051	32858 ± 4027	0,0041 ± 0,0004	0,0975 ± 0,0133	211,7 ± 36,0
hFcRn(32) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	44256 ± 2372	35105 ± 743	0,0038 ± 0,0002	0,0940 ± 0,00672	288,6 ± 39,3
hFcRn(32) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	53434 ± 6503	43072 ± 1378	0,0031 ± 0,0004	0,0743 ± 0,00573	285,7 ± 53,5
Mensch (Infusion 2h) ♂/♀ (n = 6)	Plasma	(174366) ± (20602)	(88347) ± (3100)	(0,0010) ± (0,0001)	(0,0541) ± (0,0046)	(674,8) ± (130,4)

Mittelwerte ± Standardabweichung der pharmakokinetischen Parameter nach einer intravenösen Applikation von 10 mg/kg huMAb<P>. Bei den Mäusen handelt es sich um Bolusapplikationen, beim Mensch wurde über zwei Stunden infundiert; daher Angaben in Klammern.

Legende siehe Tabelle 27

Tabelle 27: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<P> 2,5 mg/kg

Linie, Geschlecht (Anzahl)	Material	AUC _{0-inf} (h*µg/ml)	AUC ₀₋₇₂ (h*µg/ml)	Cl (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)	t _{1/2} (h)
C57BL/6J ♂ (n = 3)	Serum	14634 ± 3269	11708 ± 1715	0,0029 ± 0,0006	0,0684 ± 0,0049	290,58 ± 37,5
mFcRn -/- ♂ (n = 3)	Serum	2493 ± 174	2569 ± 187	0,0168 ± 0,0012	0,0428 ± 0,0007	41,12 ± 3,6
hFcRn(276) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	9758 ± 507	8739 ± 416	0,0043 ± 0,0002	0,0745 ± 0,0047	216,92 ± 9,5
hFcRn(276) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	14211 ± 1785	11073 ± 663	0,0030 ± 0,0003	0,0738 ± 0,0026	304,22 ± 34,2
hFcRn(32) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	12581 ± 398	10075 ± 648	0,0033 ± 0,0001	0,0787 ± 0,0153	285,54 ± 54,2
hFcRn(32) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	12930 ± 833	10457 ± 749	0,0032 ± 0,0002	0,0756 ± 0,0055	276,58 ± 7,7
Macaca fascicularis ♂ (n = 3)	Plasma	23700 ± 2554		0,0018 ± 0,0002	0,0535 ± 0,0124	364,79 ± 47,6

Mittelwerte ± Standardabweichung der pharmakokinetischen Parameter nach einer intravenösen Applikation von 2,5 mg/kg huMAb<P>. Die AUC₀₋₇₂ der Primaten fehlt, da zum Zeitpunkt 672 Stunden kein Messpunkt vorlag.

AUC_{0-inf} Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von 0 Stunden bis unendlich
AUC₀₋₇₂ Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von 0 bis 672 Stunden
Cl Clearance
V_{ss} Verteilungsvolumen im Konzentrationsausgleich
t_{1/2} terminale Halbwertszeit
n Versuche mit je 2 - 4 Tieren

Tabelle 28: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<A> 10 mg/kg

Linie, Geschlecht (Anzahl)	Material	AUC _{0-inf} (h*µg/ml)	AUC ₀₋₇₂ (h*µg/ml)	Cl (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)	t _{1/2} (h)
C57BL/6J ♀ (n = 5)	Serum	4060 ± 684	3623 ± 299	0,0416 ± 0,0053	0,5913 ± 0,1052	170,9 ± 49,6
C57BL/6J ♂ (n = 5)	Serum	2529 ± 47	2274 ± 168	0,0702 ± 0,0067	0,7894 ± 0,0553	181,8 ± 26,6
C57BL/6J ♂ (n = 5)	Plasma	2306 ± 219	2097 ± 228	0,0766 ± 0,0099	0,7913 ± 0,1348	154,0 ± 12,0
mFcRn -/- ♀ (n = 3)	Serum	400 ± 56	403 ± 56	0,4217 ± 0,0565	0,1006 ± 0,0182	8,1 ± 0,8
mFcRn -/- ♂ (n = 3)	Serum	770 ± 8	773 ± 8	0,2165 ± 0,0022	0,0280 ± 0,0037	9,1 ± 0,4
mFcRn -/- ♂ (n = 3)	Plasma	506 ± 45	508 ± 44	0,3313 ± 0,0298	0,0757 ± 0,0143	9,6 ± 1,5
hFcRn(276) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	729 ± 124	729 ± 122	0,2333 ± 0,0417	0,2691 ± 0,0832	31,5 ± 3,9
hFcRn(276) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	841 ± 25	841 ± 25	0,1982 ± 0,0060	0,2777 ± 0,0555	58,0 ± 19,9
hFcRn(276) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	1948 ± 198	1936 ± 183	0,0862 ± 0,0085	0,3634 ± 0,0196	106,3 ± 36,1
hFcRn(276) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	1796 ± 128	1801 ± 126	0,0931 ± 0,0069	0,3005 ± 0,0304	72,8 ± 18,7
hFcRn(32) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	1849 ± 138	1830 ± 116	0,0905 ± 0,0070	0,4876 ± 0,1014	108,9 ± 50,6
hFcRn(32) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	2862 ± 279	2842 ± 293	0,0586 ± 0,0057	0,3002 ± 0,0460	94,6 ± 26,6
hFcRn(32) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	1602 ± 301	1518 ± 241	0,1063 ± 0,0180	1,0407 ± 0,0701	176,7 ± 84,0
hFcRn(32) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	2000 ± 18	1790 ± 166	0,0833 ± 0,0007	1,1986 ± 0,0744	317,3 ± 226,9

Mittelwerte ± Standardabweichung der pharmakokinetischen Parameter nach einer intravenösen Applikation von 10 mg/kg huMAb<A>

Legende siehe Tabelle 27

Tabelle 29: Pharmakokinetische Parameter von huMab<A> 2,5 mg/kg

Linie, Geschlecht (Anzahl)	Material	AUC _{0-inf} (h*µg/ml)	AUC ₆₇₂ (h*µg/ml)	Cl (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)	t _{1/2} (h)
C57BL/6J ♂ (n = 3)	Serum	621 ± 109	580 ± 43	0,0687 ± 0,0133	0,5875 ± 0,2779	190,18 ± 128,6
mFcRn -/- ♂ (n = 3)	Serum	118 ± 10	123 ± 8	0,3555 ± 0,0333	0,0244 ± 0,0119	3,96 ± 0,6
hFcRn(276) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	385 ± 31	391 ± 32	0,1088 ± 0,0092	0,0887 ± 0,0171	22,12 ± 9,9
hFcRn(276) Tg+/+ ♂ (n = 3)	Serum	399 ± 25	414 ± 23	0,1048 ± 0,0065	0,2462 ± 0,0083	47,62 ± 9,0
hFcRn(32) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	376 ± 28	385 ± 31	0,1111 ± 0,0079	0,3604 ± 0,1046	64,23 ± 9,8
hFcRn(32) Tg+/+ ♂ (n = 3)	Serum	598 ± 87	564 ± 58	0,0706 ± 0,0098	0,5786 ± 0,1461	161,41 ± 27,4
Macaca fascicularis ♂ (n = 5)	Plasma	13413 ± 3065,95	11205 ± 2969,99	0,0033 ± 0,0008	0,0723 ± 0,0280	296,53 ± 50,1

Mittelwerte ± Standardabweichung der pharmakokinetischen Parameter nach einer intravenösen Applikation von 2,5 mg/kg huMab<A>

AUC_{0-inf} Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von 0 Stunden bis unendlich

AUC₆₇₂ Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von 0 bis 672 Stunden

Cl Clearance

V_{ss} Verteilungsvolumen im Konzentrationsausgleich

t_{1/2} terminale Halbwertszeit

n Versuche mit je 2 - 4 Tieren

Tabelle 30: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<I> 10 mg/kg

<i>Linie, Geschlecht (Anzahl)</i>	<i>Material</i>	<i>AUC_{0-inf}</i> (h*µg/ml)	<i>AUC₀₋₇₂</i> (h*µg/ml)	<i>Cl</i> (ml/min/kg)	<i>V_{ss}</i> (l/kg)	<i>t_{1/2}</i> (h)
<i>C57BL/6J</i> ♀ (<i>n</i> = 5)	Serum	53392 ± 4395	37355 ± 3721	0,0033 ± 0,0003	0,0979 ± 0,0124	369,3 ± 74,4
<i>C57BL/6J</i> ♂ (<i>n</i> = 5)	Serum	60758 ± 14727	33728 ± 3750	0,0031 ± 0,0007	0,1193 ± 0,0125	458,6 ± 134,3
<i>mFcRn</i> -/- ♀ (<i>n</i> = 3)	Serum	6469 ± 365	6481 ± 361	0,0258 ± 0,0014	0,0422 ± 0,0023	23,1 ± 1,2
<i>mFcRn</i> -/- ♂ (<i>n</i> = 3)	Serum	5337 ± 737	4925 ± 127	0,0339 ± 0,0009	0,0519 ± 0,0069	35,1 ± 12,0
<i>hFcRn</i> (276) <i>Tg</i> +/- ♀ (<i>n</i> = 3)	Serum	18269 ± 231	17967 ± 285	0,0091 ± 0,0001	0,0888 ± 0,0031	114,3 ± 7,1
<i>hFcRn</i> (276) <i>Tg</i> +/- ♂ (<i>n</i> = 3)	Serum	17290 ± 2608	16578 ± 2438	0,0098 ± 0,0015	0,1116 ± 0,0129	127,3 ± 12,8
<i>hFcRn</i> (276) <i>Tg</i> +/+ ♀ (<i>n</i> = 3)	Serum	30186 ± 1273	26165 ± 759	0,0055 ± 0,0002	0,1093 ± 0,0059	240,2 ± 35,8
<i>hFcRn</i> (276) <i>Tg</i> +/+ ♂ (<i>n</i> = 3)	Serum	29316 ± 2256	25608 ± 1819	0,0057 ± 0,0004	0,1075 ± 0,0069	225,4 ± 17,8
<i>hFcRn</i> (32) <i>Tg</i> +/- ♀ (<i>n</i> = 3)	Serum	38029 ± 6055	32539 ± 2193	0,0045 ± 0,0008	0,0893 ± 0,0113	211,9 ± 96,4
<i>hFcRn</i> (32) <i>Tg</i> +/- ♂ (<i>n</i> = 3)	Serum	32777 ± 4136	27025 ± 2350	0,0051 ± 0,0007	0,1038 ± 0,0094	216,2 ± 50,5
<i>hFcRn</i> (32) <i>Tg</i> +/+ ♀ (<i>n</i> = 3)	Serum	41549 ± 1825	33737 ± 2018	0,0040 ± 0,0002	0,0950 ± 0,0082	285,0 ± 24,4
<i>hFcRn</i> (32) <i>Tg</i> +/+ ♂ (<i>n</i> = 3)	Serum	46407 ± 3925	36647 ± 1536	0,0036 ± 0,0003	0,0891 ± 0,0100	299,1 ± 46,6
<i>Macaca fascicularis</i> ♂ (<i>n</i> = 2)	Serum	23911 ± 4356	23904 ± 4346	0,0071 ± 0,0013	0,0473 ± 0,0014	53,7 ± 23,6
<i>Mensch (Infusion 2h)</i> ♂/♀ (<i>n</i> = 6)	Serum	(64300) ± (6880)				(61,2) ± (5,19)

Mittelwerte ± Standardabweichung der pharmakokinetischen Parameter nach einer intravenösen Applikation von 10 mg/kg huMAb<I>. Bei den Mäusen und Affen handelt es sich um Bolusapplikationen, beim Mensch wurde über zwei Stunden infundiert; daher Angaben in Klammern.

Legende siehe Tabelle 27

Tabelle 31: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<E> 10 mg/kg

Linie, Geschlecht (Anzahl)	Material	AUC _{0-inf} (h*µg/ml)	AUC ₀₋₇₂ (h*µg/ml)	Cl (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)	t _{1/2} (h)
C57BL/6J ♀ (n = 3)	Serum	33739 ± 1065	28283 ± 1208	0,0049 ± 0,0002	0,0995 ± 0,0162	248,0 ± 28,7
C57BL/6J ♂ (n = 5)	Serum	34187 ± 2288	28786 ± 2975	0,0050 ± 0,0004	0,0979 ± 0,0126	211,4 ± 56,8
mFcRn -/- ♂ (n = 3)	Serum	2325 ± 269	2351 ± 262	0,0723 ± 0,0080	0,0434 ± 0,0127	10,0 ± 3,1
hFcRn(276) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	10984 ± 473	11162 ± 384	0,0152 ± 0,0007	0,0777 ± 0,0040	74,0 ± 7,3
hFcRn(276) Tg+/+ ♂ (n = 3)	Serum	19739 ± 1502	19118 ± 1400	0,0085 ± 0,0006	0,0836 ± 0,0113	133,2 ± 23,7
hFcRn(32) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	17809 ± 4313	16655 ± 3125	0,0097 ± 0,0021	0,0982 ± 0,0208	123,4 ± 55,6
hFcRn(32) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	19299 ± 1328	18760 ± 2047	0,0087 ± 0,0006	0,0717 ± 0,0100	96,2 ± 18,9
hFcRn(32) Tg+/+ ♀ (n = 3)	Serum	27417 ± 754	25120 ± 1377	0,0061 ± 0,0002	0,0918 ± 0,0212	181,7 ± 62,6
hFcRn(32) Tg+/+ ♂ (n = 3)	Serum	31500 ± 1853	30351 ± 2895	0,0053 ± 0,0003	0,0552 ± 0,0153	126,6 ± 40,1
Macaca fascicularis ♂ (n = 2)	Serum	24489 ± 225		0,0068 ± 0,0001	0,0330 ± 0,0010	60,2 ± 29,6

Mittelwerte ± Standardabweichung der pharmakokinetischen Parameter nach einer intravenösen Applikation von 10 mg/kg huMAb<E>

Legende siehe Tabelle 27

Tabelle 32: Pharmakokinetische Parameter von huMAb<C> 10 mg/kg

Linie, Geschlecht (Anzahl)	Material	AUC_{0-24} (h* μ g/ml)	AUC_{0-72} (h* μ g/ml)	Cl (ml/min/kg)	V_{ss} (l/kg)	$t_{1/2}$ (h)
C57BL/6J ♀ (n = 3)	Serum	55990 ± 5488	42826 ± 2675	0,0030 ± 0,0003	0,0804 ± 0,0121	334,3 ± 82,9
C57BL/6J ♂ (n = 3)	Serum	40693 ± 6314	29832 ± 3052	0,0042 ± 0,0007	0,1135 ± 0,0050	313,3 ± 95,9
mFcRn -/- ♂ (n = 3)	Serum	1768 ± 188	1774 ± 191	0,0949 ± 0,0096	0,0380 ± 0,0066	5,2 ± 0,3
hFcRn(276) Tg+/- ♀ (n = 3)	Serum	6082 ± 435	6107 ± 382	0,0275 ± 0,0019	0,0678 ± 0,0078	75,9 ± 31,4
hFcRn(276) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	6701 ± 504	6808 ± 544	0,0250 ± 0,0018	0,0355 ± 0,0025	33,9 ± 4,5
hFcRn(276) Tg+/+ ♀ (n = 3)	Serum	11126 ± 829	11296 ± 512	0,0150 ± 0,0011	0,0606 ± 0,0113	68,3 ± 29,0
hFcRn(276) Tg+/+ ♂ (n = 3)	Serum	16655 ± 440	16571 ± 388	0,0100 ± 0,0003	0,0484 ± 0,0018	97,3 ± 19,4
hFcRn(32) Tg+/- ♂ (n = 3)	Serum	25414 ± 3630	24524 ± 2809	0,0066 ± 0,0009	0,0594 ± 0,0080	122,0 ± 32,6
hFcRn(32) Tg+/+ ♀ (n = 3)	Serum	29039 ± 442	26132 ± 476	0,0057 ± 0,0001	0,0905 ± 0,0058	201,4 ± 11,8
hFcRn(32) Tg+/+ ♂ (n = 3)	Serum	32198 ± 2662	26982 ± 1013	0,0052 ± 0,0005	0,1061 ± 0,0156	287,2 ± 63,8

Mittelwerte ± Standardabweichung der pharmakokinetischen Parameter nach einer intravenösen Applikation von 10 mg/kg huMAb<C>

Legende siehe Tabelle 27

9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie durchführen zu können, danken. Danke auch für die unkomplizierte Zusammenarbeit und konstruktive Kritik.

Insbesondere möchte ich Dr. Lothar Kling für die Bereitstellung des Themas sowie die Betreuung dieser Arbeit bei Roche danken.

Ein besonders herzliches Dankeschön gebührt Thomas Stuchly, Beatrice Weinreich und Andreas Wolfert, die mir bei meinen Laborarbeiten tatkräftig zur Seite gestanden haben.

Dankend zu erwähnen ist an dieser Stelle Frau Juliane Braun, die mich in die Molekularbiologie eingeführt hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein ebenfalls ganz herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. Rathkolb und ihrem Team sowie Marc Zaetschky, die mich bei der Messung der Klinischen Chemie und Hämatologie unterstützt haben.

Bei Frau Dr. Sabine Bader und Prof. Dr. Ohse bedanke ich mich sehr für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Bei Dr. Thomas Emrich, Dr. Kay-Gunnar Stubenrauch, Dr. Tilman Schlothauer und Dr. Roland Staack möchte ich mich für die Überlassung der umfangreichen Daten sowie auch für die jederzeit gewährte Hilfe und Beratung während dieser Arbeit bedanken.