

Permeationsmechanismus und intrazelluläre Aufnahme von p38 α -MAP-Kinase-Inhibitoren

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Nelli Klameth
aus Barnaul/Russische Föderation

Tübingen
2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	22.03.2016
Dekan:Prof.	Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin A. Wahl
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf Daniels

Zusammenfassung

Dibenzosuberonderivate, eine neue Klasse von hochpotenten und selektiven p38 α -MAPK-Inhibitoren, bieten neue und vielversprechende Wirkstoffkandidaten. Die p38 α -MAPK nimmt eine zentrale Rolle bei vielen Entzündungsprozessen auf molekularer Ebene ein, weshalb die selektive Inhibierung somit Therapieoptionen im Bereich der chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie RA und CED, sowie Morbus Alzheimer und Tumoren ermöglicht. Jedoch sind bislang nur wenige Informationen zum pharmakokinetischen Verhalten der Verbindungen verfügbar. Da die Beteiligung von aktiven Transportern am Permeationsmechanismus von Wirkstoffen großen Einfluss auf die Wirksamkeit und Sicherheit einer Pharmakotherapie nehmen kann, empfehlen die European Medicines Agency (EMA) und die Food and Drug Administration (FDA), neue Wirkstoffkandidaten auf Substrate von u.a. P-Gp und BCRP zu testen. Hierzu wird die gut etablierte Zelllinie Caco-2 als in vitro Modell empfohlen, da sie alle relevanten Transporter des menschlichen Dünndarmes exprimiert und insgesamt gute Korrelationen und Extrapolationen zur in vivo Situation getroffen werden können. Die Intention dieser Arbeit war daher die Aufklärung des Permeationsverhaltens, des Ausmaßes intrazellulärer Aufnahme und Affinitäten zu den aktiven Transportern P-Gp, BCRP und MRP2 von Skepinone-L, FS089, FS100 und SK807.

Die geringe Löslichkeit und Permeabilität der untersuchten Verbindungen erforderte eine Aufreinigung und Konzentrierung der gewonnenen Proben vor der Quantifizierung. Hierzu wurde eine Methode entwickelt, welche das Gefriertrocknen der Proben zur Entfernung der wässrigen Komponente beinhaltet. Durch anschließendes Homogenisieren des Rückstandes in Methanol konnte in einem Schritt eine Aufkonzentrierung des Analyten und Abtrennung von Puffer- und Zellbestandteilen erfolgen. Trotz einer Wiederfindung von nur 31 % bei SK807 nach den Aufreinigungsschritten, konnte das resultierende UV-metrische Signal nach HPLC-Analyse um den Faktor 4,6 erhöht werden (im Vergleich zu den nicht aufgereinigten Proben). Unter Verwendung interner Standards während der Aufreinigung, ermöglichte die entwickelte Methode eine robuste und zuverlässige Quantifizierung der untersuchten Verbindungen.

Um eine Vorhersage zur in vivo Absorption treffen zu können, wurde die Permeabilität der p38 α -MAPK-Inhibitoren an Caco-2/TC7 Zellen getestet. Hierbei ergab sich eine geringe Permeabilität für die Morpholinoethoxy-Regioisomere FS089, FS100 und SK807. Gleichzeitig

unterlagen die Verbindungen einem asymmetrischen Transport, welcher in einer erhöhten Effluxrate resultierte. Der Transport schien von allen drei untersuchten Transportern (P-Gp, BCRP und MRP2) abhängig zu sein, denn unter Inhibierung der Effluxtransporter ließ sich die Effluxrate wieder senken. Dass die Transporter P-Gp, BCRP und MRP2 simultan am Efflux beteiligt sind, konnte beispielhaft für FS089 gezeigt werden. Skepinone-L dagegen wies eine höhere Permeabilität auf und die Effluxrate konnte durch Inhibierung aktiver Transporter nicht beeinflusst werden. Die Wiederfindung der Verbindungen im System war herabgesetzt, insbesondere bei den Regioisomeren in absorptiver Richtung. Um zu untersuchen, ob eine intrazelluläre Anreicherung ursächlich für die geringe Wiederfindung war, wurden Aufnahmestudien durchgeführt. Diese ergaben eine ausgeprägte intrazelluläre Anreicherung der untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren, welche sich unter Inhibierung aktiver Transporter noch weiter steigern ließ. In besonderem Ausmaß ließ sich die Aufnahme von FS100 durch Inhibierung von P-Gp und SK807 durch Inhibierung von MRP2 steigern. Die Aufnahme von Skepinone-L fiel geringer aus und ließ sich nicht durch Inaktivierung aktiver Transporter beeinflussen.

Da die Gesamtpermeabilität an Caco-2/TC7 Zellen ausreichend hoch war, kann man für die untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren eine rasche in vivo Absorption nach peroraler Gabe erwarten. Die ausgeprägte intrazelluläre Anreicherung, welche in den hier durchgeführten Studien beobachtet wurde, ist eine wichtige Voraussetzung für gute Wirksamkeit aufgrund von ungehinderter Penetration in Zielgewebe. Allerdings unterlagen die Morpholinoethoxy-Derivate einem Transport durch P-Gp, BCRP und MRP2 und waren weiterhin auch in der Lage BCRP zu inhibieren, weshalb im praktischen Einsatz auf Wechselwirkungen mit Substraten dieser Transporter zu achten ist (u.a. Digoxin, HIV-Protease-Inhibitoren, Statine sowie viele Zytostatika). Skepinone-L ist zwar selbst kein Substrat für die drei untersuchten Transporter, hat jedoch inhibierenden Einfluss auf BCRP. Dieser beruht wahrscheinlich auf einer allosterischen Wechselwirkung, welche anders als bei kompetitiver Hemmung nicht durch das Vorhandensein eines weiteren Substrates verdrängt werden kann. Skepinone-L hat daher Potential, als BCRP-Inhibitor Einsatz zu finden und BCRP-vermittelten Arzneimittel-Resistenzen entgegenzuwirken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen	V
1 Allgemeiner Teil.....	6
1.1 p38 α -MAPK-Inhibitoren	7
1.2 Gastrointestinale Resorption	10
1.3 Caco-2 Zellkultur.....	30
1.4 Zielsetzung der Arbeit	35
2 Methoden.....	37
2.1 Zellkulturrpflege	37
2.2 Versuche	38
2.3 Statistik.....	47
2.4 Analytik.....	48
2.5 Verwendete Reagenzien und Geräte	52
3 Experimenteller Teil.....	54
3.1 Entwicklung einer Methode zur Probenaufreinigung und -konzentrierung	54
3.2 Permeationsstudien	59
3.3 Massenbilanz und unspezifische Adsorption	71
3.4 Dibenzosuberonderivate als Inhibitoren von BCRP	79
4 Diskussion	84
4.1 Morpholinoethoxy-Regioisomere FS089, FS100 und SK807.....	84
4.2 Skepinone-L.....	89
4.3 Schlussfolgernde Anmerkungen	91
5 Literaturverzeichnis	93

6	Anhang	I
6.1	Löslichkeit der Morpholinoethoxy-Derivate	I
6.2	pH-Spezies Verteilungen	III
6.3	Volumenverhältnisse im Transwellsystem	IV
6.4	Dichtigkeit und Vitalität von Caco-2/TC7 Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert... V	V
6.5	Fluoreszenzfärbungen	IX
6.6	Morphologische Entwicklung von Caco-2/TC7 Zellen	XII
	 Appendix	 XIV
	Abbildungsverzeichnis	XIV
	Diagrammverzeichnis	XV
	Formelverzeichnis.....	XVI
	Tabellenverzeichnis	XVI
	Veröffentlichungen	XVIII

Abkürzungen

ACN	<i>Acetonitril</i>	HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
ADME	<i>Absorption, Distribution, Metabolisierung, Eliminierung</i>	HPLC	<i>High Performance/Pressure Liquid Chromatography</i>
ANOVA	<i>Einfaktorielle Varianzanalyse</i>	ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
AP	<i>apikal</i>	k-o	<i>Knock-Out</i>
AP→BL	<i>Absorption, absorptive Richtung</i>	MAPK	<i>Mitogen Aktivierte Proteinkinasen, Mitogen Aktivierte Proteinkinasen</i>
API	<i>Aktiver Pharmazeutischer Wirkstoff/Inhaltsstoff</i>	MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney Cells</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>	MRP2	<i>Multidrug Resistance Associated Protein 2</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>	MXR	<i>Mitoxantron Resistance Associated Transporter</i>
BCS	<i>Biopharmaceutics Classification System</i>	NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
BHS	<i>Blut-Hirn-Schranke</i>	NBD	<i>Nukleotid-Bindungs-Domäne</i>
BL	<i>basolateral</i>	OATP	<i>Organic Anion Transporter Protein</i>
BL→AP	<i>Sekretion, sekretorische Richtung</i>	OCT	<i>Organic Cation Transporter</i>
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>	PE	<i>Polyethylen</i>
BSEP	<i>Bile Salt Efflux Pump</i>	P-Gp	<i>P-Glycoprotein</i>
Caco-2	<i>humane coloirektale Adenokarzinom-Epithelzellen</i>	PXR	<i>Pregnan-X-Rezeptor</i>
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>	QSAR	<i>quantitative structure-activity relationship</i>
DDI	<i>Drug-Drug Interaction</i>	RA	<i>Rheumatoide Arthritis</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	rF	<i>relative Luftfeuchte</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>	SLC	<i>Solute Carrier</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	spm	<i>shakes per minute</i>
Em	<i>Emission</i>	TEER	<i>Transepitheliale Elektrische Widerstand</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>	TMD	<i>Transmembran-Domäne</i>
Ex	<i>Excitation, Anregung</i>	UAW	<i>Unerwünschte Arzneimittelwirkung</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	V _k	<i>Verteilungskoeffizient</i>
FKS	<i>Fetales Kälberserum</i>	WST	<i>water soluble tetrazolium (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
GSH	<i>Glutathion</i>		
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>		
HCC	<i>Hepatozelluläres Karzinom</i>		
HCl	<i>Chlorwasserstoff, Salzsäure</i>		

1 Allgemeiner Teil

Eine neue Klasse an hochselektiven und potenten p38 α -MAPK-Inhibitoren, die Dibenzosuberonderivate, liefert vielversprechende neue Wirkstoffkandidaten zum Einsatz auf Gebieten wie chronisch-entzündlichen Erkrankungen (RA, CED, COPD), Alzheimer oder Tumorerkrankungen. Aufgrund von Resistenzentwicklungen und hohen Therapiekosten besteht bei der Pharmakotherapie der genannten Erkrankungen ein ständiger Bedarf an neuen Targets. Während noch keine pharmakokinetischen Daten zu den Dibenzosuberonderivaten FS089, FS100 und SK807 verfügbar sind, wurde Skepinone-L bereits in vivo (Maus) getestet und zeigte gute Bioverfügbarkeiten [1]. Bislang wurden jedoch noch keine Untersuchungen zu Transporteraffinitäten dieser Verbindungen unternommen.

Neu entwickelte APIs sollten vor dem Einsatz in klinischen Studien hinreichend auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften untersucht werden, um eine zufriedenstellende Wirksamkeit und Sicherheit beim Einsatz in Menschen zu gewährleisten. Da viele Transporter großen Einfluss auf die Pharmakokinetik vieler Pharmaka ausüben, ist es notwendig neue APIs auf Substrate bzw. Modulatoren bestimmter Transporter zu untersuchen. Eine große Rolle in ADME-Prozessen (Absorption, Distribution, Metabolisierung, Eliminierung/Exkretion) spielen Multidrug Resistance-(MDR-)Transporter, welche unter anderem im Gastrointestinaltrakt, der Blut-Hirn-Schranke oder der Leber exprimiert werden. Sie besitzen eine sehr breite Substrat- und Gewebeverteilung bei hoher Wirkeffizienz und Effektivität durch Synergismus beim Transport mit anderen Effluxtransportern und metabolisierenden Enzymen. Die Beteiligung von aktiven Transportern an der Absorption, Distribution oder Exkretion von Pharmaka kann großen Einfluss auf die Pharmakokinetik nehmen, indem die Absorption von Substraten limitiert, die Exkretion gefördert und die Penetration in Gehirn, Tumorzellen oder weitere Zielorgane verhindert wird [2]. Gleichzeitig kann die Pharmakokinetik bei Beeinträchtigung der beteiligten Transporter kompromittiert sein, sodass z.B. initial geschützte Gewebe wie das Gehirn nun von Xenobiotika, welche Substrate für aktive Transporter darstellen, penetriert werden können. Die Beeinträchtigung der Transporteraktivität kann durch interindividuelle Unterschiede in der Expression oder Induktion bzw. Inhibierung der Expression begründet sein. Ein weiterer verkomplizierender Faktor ist die Möglichkeit der indirekten Induktion bzw. Inhibierung der Expression durch Induktoren/Inhibitoren des CYP-Systems, was aufgrund einer Überlappung genetisch codierender Regulatoren für das CYP-System und ABC-Transporter

zustande kommt [3]. Die Häufigste Ursache für intraindividuelle Variabilitäten der Transporteraktivität ist jedoch die Coadministration von mehreren Substraten eines Transporters, welche häufig in Drug-Drug Interaktionen (DDIs) resultiert. Der Einfluss von Transportern auf ADME-Prozesse, wie sie bereits diskutiert wurden, kann sowohl in reduzierter Wirksamkeit (z.B. aufgrund limitierter Permeation in Zielgewebe) als auch reduzierter Sicherheit (z.B. aufgrund erhöhter Plasmakonzentration und resultierenden vermehrten unerwünschten Arzneimittelwirkungen und erhöhter Toxizität) einer Pharmakotherapie durch DDIs mit co-administrierten Substraten/Inhibitoren von Transportern resultieren. Die FDA und EMA empfehlen daher eine Testung neuer APIs auf Substrate für MDR-Transporter (u.a. P-Gp und BCRP), da eine frühe Aufklärung durch in vitro Testung häufig die Notwendigkeit für spätere klinische Studien verhindert [4, 5].

Um die oben beschriebene Problematik näher zu erleuchten, wird im Folgenden detaillierter auf die Eigenschaften der untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren eingegangen und die an der Permeation beteiligten Prozesse sowie MDR-Transporter ausführlicher diskutiert.

1.1 p38 α -MAPK-Inhibitoren

P38 ist eine Subgruppe aus der Superfamilie der Mitogen Aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Während die Funktionen der β -, δ - und γ - Isoform noch wenig verstanden sind, wird der α -Isoform eine zentrale Rolle in der Biosynthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-1 β und IL6 zugewiesen [6, 7]. Die p38 α -MAPK ist neben Prozessen wie Inflammation auch an der Regulierung von Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und Angiogenese beteiligt [8-10]. Daher ergeben sich durch die Adressierung der p38 α -MAPK eine Reihe innovativer Therapieansätze, z.B. bei Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis (RA), chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED, v.a. Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn), aber auch Morbus Alzheimer, COPD und Tumorerkrankungen [11-15]. Obwohl aktuell noch kein p38 α -MAPK-Inhibitor zugelassen ist, sind die Bestrebungen der Forschung in diese Richtung groß, und einige Wirkstoffkandidaten durchlaufen gerade Phase II und III Studien mit vielversprechenden Ergebnissen zu oben genannten Indikationen [16].

1.1.1 Dibenzosuberonderivate

Eine neue Klasse p38 α -MAPK-Inhibitoren, die Dibenzosuberonderivate, weisen eine sehr hohe Potenz bei gleichzeitiger Selektivität für die α -Isoform auf [1, 17]. Ein großer Vorteil der Dibenzosuberonderivate ist deren ausgeprägte Selektivität, da das Scheitern von bisher in klinischen Phase III Studien eingesetzten p38-MAPK-Inhibitoren in deren unspezifischer Toxizität (durch Inhibierung weiterer Isoformen und weiterer MAPK) begründet war [18, 19].

Das Dihydroxypropoxy-Dibenzosuberone Skepinone-L, welches über eine bemerkenswerte inhibitorische Potenz am isolierten Enzym (IC_{50} 5 nM) und aufgrund seiner Hydrophilie ebenfalls im Vollblutassay (IC_{50} 40 nM) verfügt, zeigte in vivo (Maus) eine gute Absorption nach peroraler Gabe [1]. Die Morpholinoethoxy-substituierten Dibenzosuberone FS089, FS100 und SK807 weisen ebenfalls eine ausgeprägte inhibitorische Potenz am isolierten Enzym auf (IC_{50} 10-30 nM), allerdings ist diese im Vollblutassay nur für das in Position 7 substituierte SK807 wiederzufinden, während die Aktivität von FS089 und FS100 stark reduziert ist [20]. Da dieser Effekt im Vollblutassay, jedoch nicht am isolierten Enzym auftrat, vermuten die Autoren, dass eine gesteigerte Plasmaproteinbindung, geringe Permeabilität durch Zellmembranen oder die Limitierung der Aufnahme aufgrund eines spezifischen Transporters mögliche Gründe für den Wirkverlust sind.

Tab. 1: Eigenschaften der Dibenzosuberone
Inhibitionsdaten aus [20], Mr und log D kalkuliert mit MarvinSketch Software.

	p38 α IC_{50} \pm SEM [μ M]	TNF α IC_{50} \pm SEM [μ M]	Mr [g/mol]	log D (pH 7.4)
Skepinone-L	0,005 \pm 0,002	0,04 \pm 0,01	425,432	4,24
SK807	0,01 \pm 0,00	0,08 \pm 0,02	464,513	5,35 ($pK_s = 5,76$)
FS089	0,03 \pm 0,00	200		
FS100	0,02 \pm 0,00	40,0 \pm 13,2		

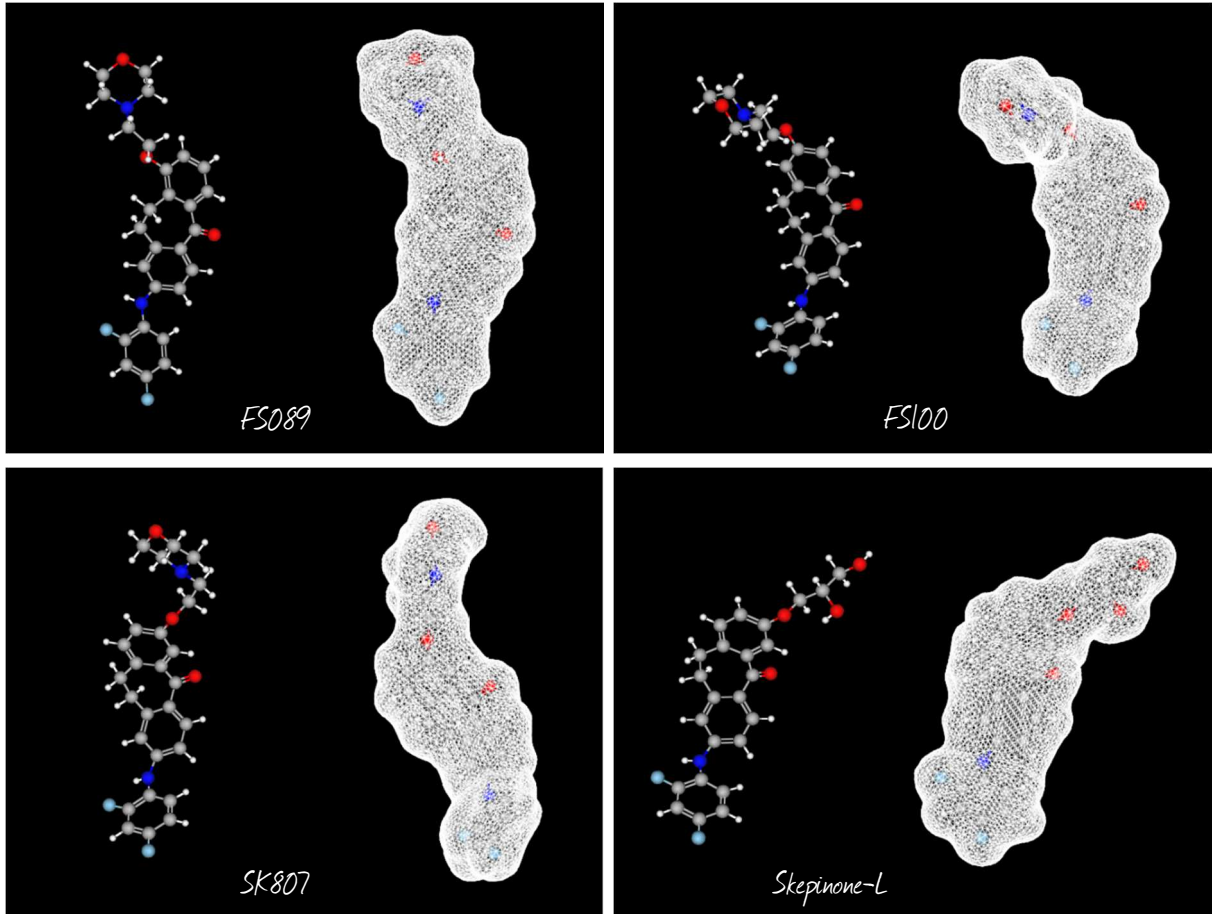
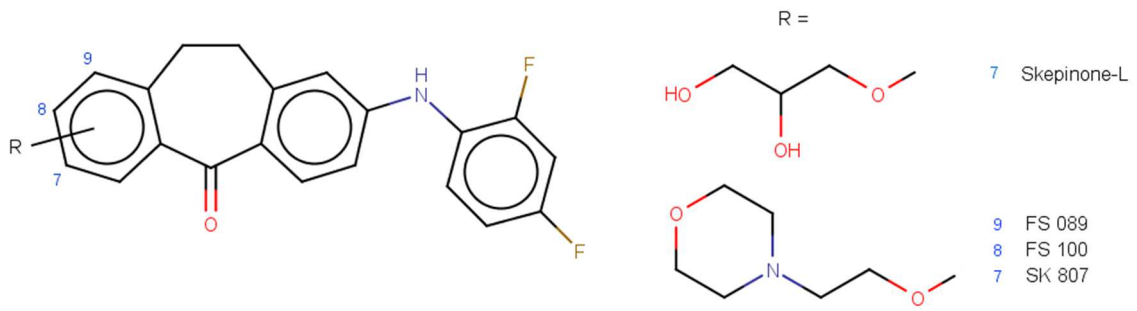


Abb. 1: Struktur von Skepinone-L und seiner Derivate
3D-Struktur erstellt mit Marvin Sketch Software

1.2 Gastrointestinale Resorption

Die Bioverfügbarkeit einer Substanz beschreibt das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der diese aus ihrer Arzneiform in den systemischen Kreislauf freigesetzt wird. Der Weg eines Arzneimittels von der Applikation einer Formulierung bis zur Exkretion des Arzneistoffes und/oder seiner Metabolite aus dem Körper wird als LADME-Prozess bezeichnet (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination). Nach Liberation der pharmakologisch wirksamen Substanz aus ihrer Formulierung kann diese erst in gelöstem Zustand zur Absorption zur Verfügung stehen. Daher ist eine gewisse Löslichkeit in Wasser obligate Voraussetzung für die systemische Wirkung eines Arzneistoffes. Der Absorptionsprozess findet nach peroraler Applikation an den Schleimhäuten des gesamten Gastrointestinaltraktes, jedoch vor allem im Dünndarm statt. Er beinhaltet die Permeation des Arzneistoffes durch Epithelzellen der Darmschleimhaut, Permeation durch Gefäßepithelien unter Eintritt in den systemischen Blutkreislauf, und nach erfolgtem Verteilungsprozess (der Distribution), die Permeation in die Zielzellen. Betrachtet man die Permeation als reinen Diffusionsprozess, wird dieser vor allem durch den Verteilungskoeffizienten (V_K) des Arzneistoffes bestimmt. Der V_K beschreibt das Ausmaß, in welchem sich eine Verbindung aus einer wässrigen Lösung heraus in Biomembranen umverteilt, und ebenso auch den Wiederaustritt aus der Zelle.

1.2.1 Epitheliale Transportmechanismen

Bei der Permeation von endogenen Substraten und Xenobiotika durch gastrointestinale Endothelien kann grundsätzlich zwischen passivem (konzentrations-abhängigem) und aktivem (konzentrations-unabhängigem), an ATP-Hydrolyse gebundenen Transport, unterschieden werden. Der Transport von apikal (AP) nach basolateral (BL), also aus dem Darmlumen zur Blutseite hin wird als Absorption, und die umgekehrte Richtung als Sekretion bezeichnet.

Zu den passiven Routen gehört die Diffusion, der parazelluläre Transport und die erleichterte Diffusion beziehungsweise Carrier-vermittelter Transport, während der sekundär aktive Transport eine Sonderstellung einnimmt. Passiver Transport erfolgt nur in Richtung eines chemischen und/oder elektrischen Gradienten hin (z.B. Konzentrationsunterschied).

Schnell und vollständig resorbierte Verbindungen sind meist lipophil und werden passiv transzellulär aufgenommen, was durch die dargebotene, extrem große Oberfläche der

Bürstensaummembran der Darmepithelzellen gefördert wird. Passive Diffusion erfolgt unselektiv in gleichem Ausmaß in absorptiver und sekretorischer Richtung und kann durch das erste Fick'sche Diffusionsgesetz beschrieben werden.

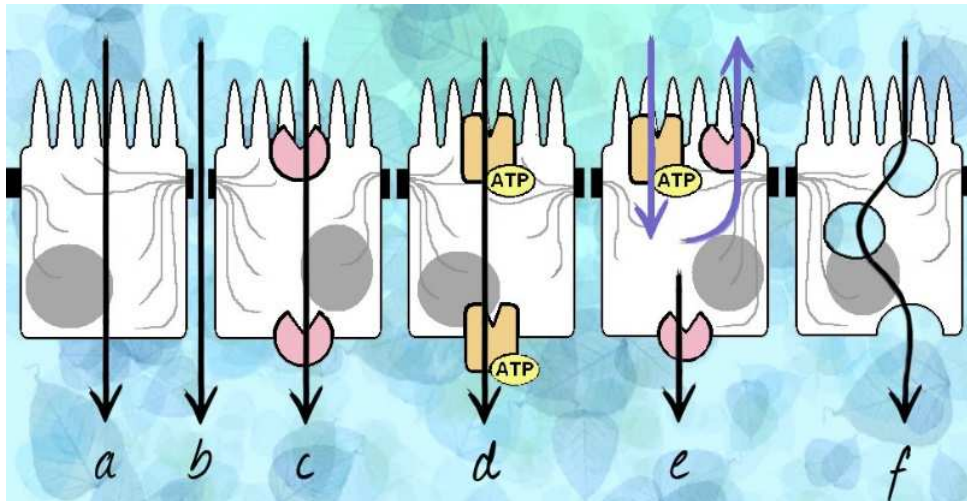


Abb. 2: Epitheliale Transportmechanismen

a: passive Diffusion **b:** parazellulärer Transport durch Tight Junctions **c:** Carrier-vermittelte Diffusion (vermitteln stark hydrophilen Molekülen (z.B. Ionen) temporär lipophilere Eigenschaften und befähigen so zur passiven Diffusion entlang eines elektrochemischen Gradienten) **d:** aktiver Transport, **e:** sekundär aktiver Transport unter Ausnutzung eines durch primär aktiven Transport entstandenen elektrochemischen Gradienten (blau) **f:** Endozytose / Pinozytose

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = D \times V_k \times \frac{A}{d} \times (C_a - C_i)$$

$$D = \frac{K_B \times T}{6\pi\eta \times r}$$

Formel 1: 1. Fick'sches Diffusionsgesetz

Formel 2: Diffusionskoeffizient

$\Delta m/\Delta t$	Diffundierte Menge pro Zeit [$\mu\text{g}/\text{s}$]
V_k	Verteilungskoeffizient zwischen Membran und Außenmedium
A	Diffusionsfläche [cm^2]
d	Dicke der Membran [cm]
$C_a - C_i$	Konzentrationsgradient an der Membran [$\mu\text{g}/\text{mL}$]

K_B	Boltzmannkonstante [J/K]
T	Temperatur [K]
η	dynamische Viskosität des Diffusionsmediums [Ns/m^2]
r	Radius der diffundierenden Teilchen [m]

$$V_k = \frac{C_{\text{org}}}{C_{\text{wässrig}}}$$

C_{org} Konzentration in organischer Phase
 $C_{\text{wässrig}}$ Konzentration in wässriger Phase

Formel 3: Verteilungskoeffizient

V_k wird meist logarithmisch als $\log P$ angegeben und beschreibt das Verteilungsausmaß einer Substanz zwischen einer organischen (Octanol) und wässrigen Phase. Bei ionisierbaren Substanzen ist der $\log D$ -Wert aussagekräftiger, welcher die Verteilung bei einem definierten pH beschreibt. Ist der $\log P$ -Wert einer Substanz kleiner als 4, kann eine gute Permeation angenommen werden. Bei größeren Werten ist aufgrund der hohen Lipophilie mit einer Akkumulierung in den Membranen zu rechnen [21].

Faktoren wie Diffusionsfläche, Dicke der zu überwindenden Membranen, Temperatur und Viskosität des Diffusionsmediums (1. Fick'sches Diffusionsgesetz) sind bei Betrachtung eines Individuums weitgehend konstant. Daher ist die Größe des Moleküls, Konzentration und der Verteilungskoeffizient (a) Extrazellularmedium zu apikaler Membran, b) apikale Membran zu Intrazellularmedium und c) Intrazellularmedium zu basolateraler Membran) maßgeblich für die Diffusionsgeschwindigkeit.

Möglich ist auch parazellulärer Transport über die Tight Junctions des Epithels, wenngleich seltener. Dieser tritt bei hydrophilen Wirkstoffen und Peptiden auf und der Transport erfolgt aufgrund der ca. 1000x geringeren Oberfläche im Vergleich zur Bürstensaummembran langsam und unvollständig. Endozytose wird zum Transport von Feststoffpartikeln und Flüssigkeiten (in diesem Fall Pinozytose) von der Zelle aufgebracht, was wahrscheinlich bei der Aufnahme von großen Peptid-Verbindungen eine Rolle spielt [22].

Sekundär aktiver Transport (erleichterte Diffusion) erfolgt unter Ausnutzung eines durch primären Transport entstandenen Gradienten. Hierbei wird ein Co-Substrat entlang seines elektrochemischen Gradienten, welcher durch einen aktiven Mechanismus aufgebaut wurde, transportiert und stellt dadurch Energie bereit, mit der ein anderes Substrat entgegen seinem elektrochemischen Gradienten transportiert werden kann. Verläuft der Transport von Co-Substrat und Substrat in die gleiche Richtung, spricht man von Symport, verläuft er entgegengesetzt, von Antiport. Ein bekannter Symporter ist der Na^+ /Glucose-Carrier, welcher unter Ausnutzung eines durch die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase entstandenen, nach innen gerichteten Na^+ -Gradienten, Na^+ und Glucose auf der apikalen Membran in die Zelle befördert. Einen Antiporter stellt der Na^+/H^+ -Austauscher dar, welcher einen nach außen gerichteten H^+ -Gradienten aufrechterhält. Dieser bedingt zum einen das Mikroklima von pH 6.0 – 6.5 in unmittelbarer Nähe zu Enterozyten, und ist zum anderen die treibende Kraft für den Carrier-vermittelten Transport von Peptiden in die Zelle durch den H^+ /Oligopeptidtransporter PepT, welcher in apikalen Membranen des Dünndarms und in renalen Epithelien des proximalen Tubulus exprimiert wird [23]. PepT spielt eine Rolle bei der Aufnahme von peptidomimetischen Wirkstoffen wie zum Beispiel β -Lactam Antibiotika [24].

Aktiver Transport ist immer an ATP-Hydrolyse gebunden. Hierbei können wie bei Carriern eine Konformationsänderung mit darauf folgender Translokation oder Porendurchtritt Möglichkeiten zur Überwindung der Plasmamembran darstellen. Da Energie aufgebracht wird,

können Substanzen auch entgegen ihrem elektrochemischen Gradienten transportiert werden, Beispiele sind die oben bereits erwähnte Na^+/K^+ -ATPase, diverse Protonenpumpen und ABC-Transporter, auf die im Folgenden noch näher eingegangen wird (siehe 1.2.5).

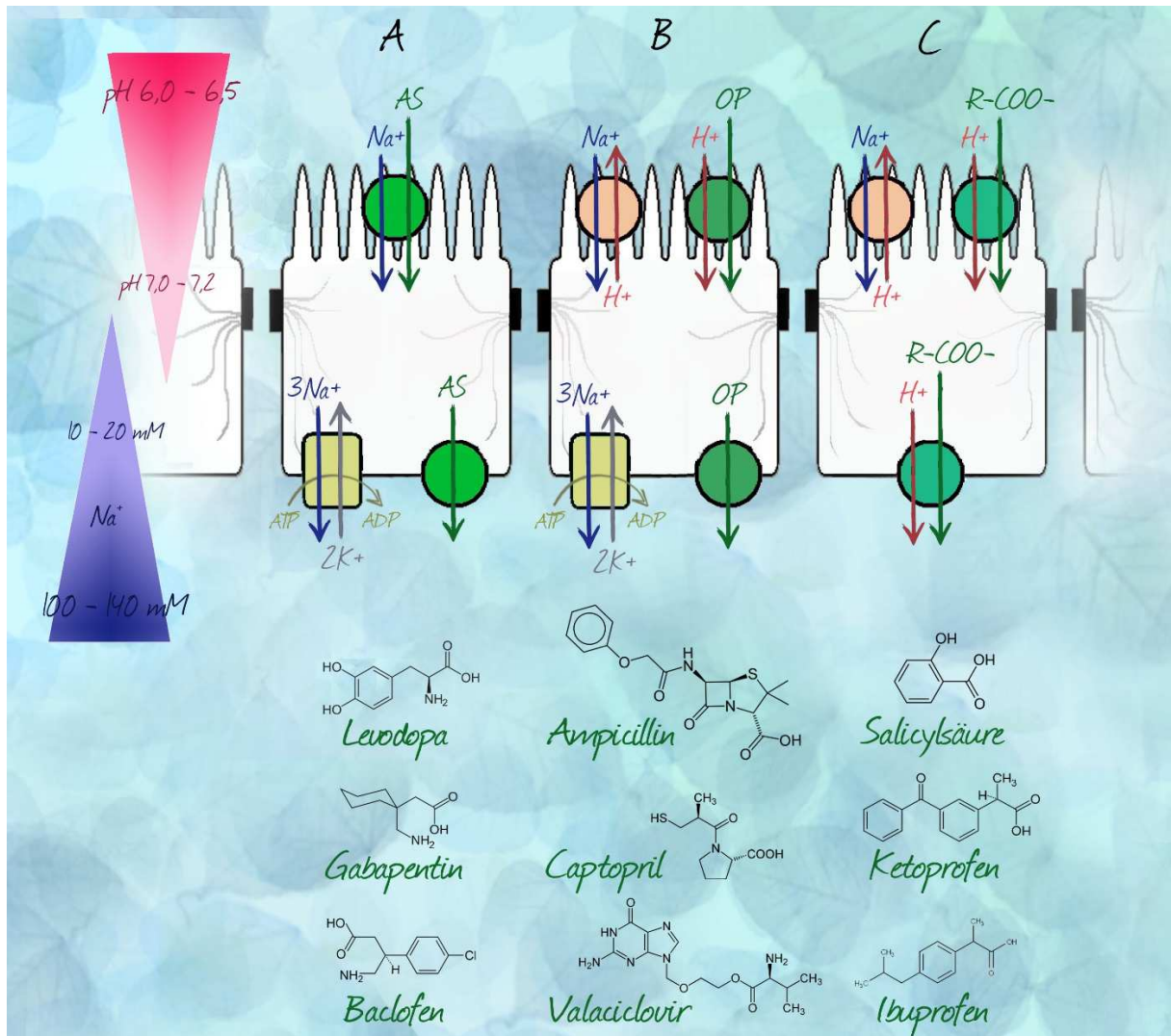


Abb. 3: Beispiele für gastrointestinale Transporter und ihre Substrate

AS = Aminosäure, OP = Oligopeptid, R-COO⁻ = organische Säure. **A:** AS-Transporter, transportiert AS im Cotransport mit Na^+ , Na^+ -Gradienten aufgebaut durch Na^+/K^+ -ATPase. **B:** OP-Transporter (hier PepT-1), Symport von Di- und Tripeptiden mit H^+ , H^+ -Gradienten durch Na^+/H^+ -Austauscher aufgebaut. **C:** Monocarboxylattransporter (hier MCT-1), äquimolarer Symport von Monocarboxylaten mit H^+ .

1.2.2 Transporter in ADME-Prozessen von endogenen Substraten und Xenobiotika

Die Aufnahme, Distribution und Exkretion von Xenobiotika ist ein Prozess, an dem neben der passiven Diffusion häufig auch Transportproteine beteiligt sind. In den letzten Jahrzehnten wurden immer mehr humane Transportproteine in zahlreichen Geweben entdeckt und viele ihrer Substrate aufgeklärt, sodass inzwischen die Involvierung von Transportern in ADME-Prozesse eher als Regel denn als Ausnahme angenommen wird [2, 25].

Einige Transporter können in vielen Zellen wiedergefunden werden, während andere eine spezifischere Gewebeverteilung aufweisen. Für viele Transporter besteht eine Korrelation zwischen dem Ausmaß ihrer Expression und dem Differenzierungsfortschritt der exprimierenden Zellen. So nimmt die Dichte der Transporter in Enterozyten über die Krypten-Zotten-Achse zu, da in den Polen der Krypten undifferenzierte Zellen sitzen, welche erst nach Differenzierung zu den Zotten hin wandern. Ebenfalls ist die Ausprägung von Transportern an der apikalen Bürstensaummembran höher als an der basolateralen Membran. Zwei Gruppen von aktiven Transportern spielen eine große Rolle beim Transport von Xenobiotika: Die SLC- und ABC-Superfamilie, welche im Folgenden (siehe 1.2.4 und 1.2.5) detaillierter diskutiert werden.

1.2.3 Klinische Bedeutung von Transporter-Interaktionen

Seit einigen Jahren finden Transporter Beachtung in den Guidelines der EMA und FDA, welche die Testung neuer APIs auf Substrate von 9 bzw. 7 Transportern empfehlen (die Efflux-Transporter P-Gp und BCRP; die hepatischen Uptake-Transporter OATP1B1 und 1B3 (Organic Anion Transporter); die renalen Uptake-Transporter OAT1, 3, und OCT2 (Organic Cation Transporter); zusätzlich von EMA: der hepatische Uptake-Transporter OCT1 und der Efflux-Transporter BSEP (Bile Salt Efflux Pump) [4, 5]. Vor allem bei neuen Wirkstoffen ist es wichtig zu wissen, worauf man bei einer klinischen Studie zu achten hat (z.B. die häufige Interaktion von OATP-Inhibitoren und Statinen). Weiterhin können Transporter die Pharmakokinetik von Verbindungen in großem Ausmaß beeinflussen, indem sie die intestinale Absorption limitieren, die Exkretion via Galle und Urin fördern und die Penetration in Gehirn, Plazenta und Tumorzellen verhindern. Somit entsteht ein signifikanter Einfluss auf die Effizienz und Sicherheit einer Pharmakotherapie. Bei der Co-Administration von Pharmaka, welche Substrate/Inhibitoren von Transportern sind, muss die Dosis angepasst werden, v.a. bei

geringer therapeutischer Breite (z.B. das P-Gp-Substrat Digoxin). Auf der anderen Seite ergeben sich auch Chancen für neue drug-delivery-Strategien durch Uptake-Transporter wie OATPs, PepTs (Peptid Transporter) und Aminosäuren-Transporter, welche eine Rolle in der Aufnahme von Aminosäuren-basierten Wirkstoffen und Prodrugs einnehmen könnten.

Die EMA und FDA schlagen verschiedene Möglichkeiten zur Untersuchung von Transportern vor [4, 5]: a) Nicht-klinisch: Zell-basierte Studien, ATPase Aktivitätsuntersuchungen, Vesikel und Knock-Out(k-o)-Tiere. b) Klinisch: Vergleichende Pharmakokinetik-Studien und Untersuchungen des Polymorphismus. Aus der nicht-klinischen Auswahl sind die Zell-basierten Studien zu bevorzugen, da sie schnell und kostengünstig präzise Informationen liefern können. Verwendet werden können Zelllinien wie (k-o) Caco-2 und MDR-transfizierte MDCK-Zellen. Eine weitere Möglichkeit bieten bildgebende Verfahren, wie die Positronen-Emissions-Tomographie, welche patientenindividuell und nicht-invasiv Vorhandensein und Verteilung von Transportern in Organen wie Leber, Niere und Tumoren aufzeigen kann [2].

Drug-Drug Interaktionen (DDIs)

Während durch metabolisierende Enzyme entstandene Interaktionen bereits ausführlich untersucht wurden, gewinnen Transporter-Interaktionen noch an Beachtung und Verständnis. DDIs (Drug-Drug Interaktionen) können sich aus Inhibierung, Induktion oder beidem ergeben, und es können Efflux-und/oder Uptake-Transporter während Absorption, Distribution und/oder Exkretion involviert sein, welche nicht nur die Toxizität, sondern auch die Wirksamkeit des betroffenen Pharmakons (Substrat) beeinträchtigen [2]. Zusätzlich unterliegt die Expression von aktiven Transportern einem stark ausgeprägten genetischen Polymorphismus und einer großen Variation der Ausprägung in verschiedenen phänotypischen und ethnischen Gruppen. Als Konsequenz empfiehlt die FDA z.B. als Startdosis für Rosuvastatin (OATP1B1- und BCRP-Substrat) 10 mg für Kaukasier und 5 mg für Asiaten. Weitere klinisch relevante Interaktionen treten unter anderem vermehrt bei der Therapie mit Digoxin (P-Gp-Substrat), Repaglinid oder Cerivastatin und Itraconazol oder Gemfibrozil (CYP3A4-, BCRP- und OATP1B1-Interaktion) auf und resultieren in verminderter Wirksamkeit und erhöhter Toxizität.

Tab. 2: Beispiele klinischer, Transporter-verursachter DDIs
modifiziert nach [26]

interagierender Wirkstoff	Klinische Konsequenz		Involvierter Transporter und Effekt
Chinidin	Digoxin Exposition	↑	P-Gp Inhibierung
Rifampicin	Digoxin Exposition	↓	P-Gp Induktion
Dronedaron	Digoxin Exposition	↑	P-Gp Inhibierung
Probenecid	Cephadrin Exposition	↑	OAT Inhibierung
Cimetidin	Metformin Exposition	↑	OCT Inhibierung
Cyclosporin A	Rosuvastatin Exposition	↑	OATP / BCRP Inhibierung
Lopinavir / Ritonavir	Rosuvastatin Exposition	↑	OATP Inhibierung

Die Plasmakonzentration von Wirkstoffen ist bei durch metabolisierende Enzyme ausgelösten DDIs ein guter Marker. Nicht so bei Interaktionen mit Transportern: Die Konzentration in einem bestimmten Organ (z.B. Gehirn, Leber, Plazenta) kann sehr stark ansteigen, ohne dass eine starke Konzentrationsveränderung im systemischen Kreislauf auftritt. So manifestieren sich Enzym-basierte DDIs in einer Über- oder Unterdosierung, während Transporter-vermittelte DDIs meist in einer Gewebe-spezifischen Toxizität resultieren [26]. Pharmaka, welche mit einem Transporter interagieren, interagieren jedoch typischerweise meist auch mit weiteren Transportern. Dies ermöglicht mehrere Möglichkeiten für Clearance und Elimination für Transporter-Substrate, sodass solche Substanzen trotzdem verabreicht werden können (z.B. Estradiol-17 β -Glucuronid, Methotrexat und Pravastatin, welche Substrate für P-Gp, BCRP, OATP1B1 und 1B2 darstellen) [27].

Multidrug Resistance (MDR)

MDR steht für Multidrug Resistance und beschreibt das Phänomen der limitierten Plasma- und Gewebekonzentrationen von Arzneistoffen nach (wiederholter) Applikation. Diese Beobachtung trifft vor allem für Chemotherapeutika zu und die „Resistenz“ besteht meist nicht nur für das bereits applizierte Pharmakon, sondern betrifft oft eine große Reihe an strukturell und pharmakologisch unverwandten Verbindungen. Die Ursache liegt in einer Überexpression von Effluxtransportern (MDR-Transporter), stimuliert durch die Applikation eines Xenobiotikums, welches ein Substrat darstellt. Für Multidrug Resistance im humanen Intestinum sind vor allem die drei aktiven Transporter P-Gp, MRP2 und BCRP verantwortlich [25, 28]. Obwohl die starke Überexpression hauptsächlich in Tumorzellen zu beobachten ist, finden sich aktive Effluxtransporter auch in gesundem Gewebe wieder, vor allem in

Barriereepithelien wie dem Gastrointestinaltrakt oder der Blut-Hirn-Schranke und erfüllen neben dem Transport von vielen endogenen Substraten eine wichtige Schutzfunktion im Körper. Ein veranschaulichendes Beispiel für die physiologische Funktion von MDR-Transportern bieten Collie-Hunde, welche häufig an einem Gendefekt des *mdr1*-Gens leiden. Dieses codiert für P-Gp und folglich reagieren betroffene Hunde extrem sensitiv auf Ivermectin-induzierte Neurotoxizität aufgrund des Fehlens des Effluxproteins in der Blut-Hirn-Schranke [29].

MDR-Transporter zeigen eine sehr breite Substrataffinität. Ein einzelner Transporter ist in der Lage, viele chemisch stark diverse Substrate verschiedener Wirkstoff- und Substanzklassen zu transportieren – gleichzeitig können einzelne Moleküle von mehreren Proteinen als Substrate akzeptiert werden [30-33]. Zu den Substraten zählen neben zahlreichen Zytostatika eine Reihe von weiteren Pharmaka verschiedenster Substanzklassen (siehe *Tab. 3*). Viele MDR-Transporter wie das P-Gp haben eine ausgesprochen breite Gewebeverteilung [34]. Gleichzeitig kann die Expressionsrate verschiedener Transporter innerhalb eines Organs variieren. So steigt die P-Gp-Expression longitudinal im Intestinum mit geringster Expression im Magen und höchster im Colon. MRP2 und BCRP werden dagegen stärker im Jejunum und proximalen Duodenum exprimiert, während im Ileum geringere Dichten auftreten [35-38]. Neben der überlappenden Substratspezifität und Co-Lokalisation zu metabolisierenden Enzymen resultieren diese ergänzenden Expressionsmuster in einer kooperativen und effektiven Detoxifikation, jedoch gleichzeitig auch in einem klinisch relevanten Wirksamkeitsverlust vieler Zytostatika und anderer Substrate. Die klinisch relevantesten Transporter gehören zur SLC- oder ABC-Superfamilie, welche folgend ausführlicher betrachtet werden.

Tab. 3: MDR-Transporter

modifiziert nach [25]. BHS = Blut-Hirn-Schranke; LTC4 = Leukotrien C4; DNP-SG = 2,4-dinitrophenyl-S-glutathion

ABC-Transporter	Lokalisation	Expression im Gewebe	Endogene Substrate	Exogene Substrate (Beispiele)
P-Gp ABC B1	AP	Niere, Nebenniere, Leber, Pankreas, Intestinum, Lunge, BHS, Plazenta	Phospholipide, Steroide, Cytokine	Digoxin, Chinidin, Verapamil, Tetracyclin, Zytostatika (Antimetabolite, Taxane, Vinka-Alkaloide), HIV-Protease-Inhibitoren (Indinavir, Saquinavir, Nelfinavir), Ciclosporin A, Antikonvulsiva (Phenobarbital, Phenytoin, Topiramal)
MRP1 ABC C1	BL (außer Plazenta und BHS)	Niere, Lunge, Testikel, Skelett- und Herzmuskel, Plazenta	Glutathion, Glutathionkonjugate (LTC4, DNP-SG), Bilirubin-Glucuronide, Gallensalze	Makrolide, Chloroquin

MRP2 ABC C2	AP	Leber, Niere, Dünndarm, Plazenta	LTC4, DNP-SG, Bilirubin- Glucuronide, sulphatierte Gallensalze, Estradiol-17- β-Glucuronid	Doxorubicin, Methotrexat, Vinka-Alkaloide, Cisplatin u.a. Indinavir, Ritonavir, Fexofenadin, Pravastatin, Azithromycin
MRP3 ABC C3	BL	Nebenniere, Intestinum, Pankreas, Gallenblase, Plazenta	Gallensalze, LTC4, Estradiol-17β-Glucuronide, Bilirubin-Glucuronide	Morphin-Glucuronid
MRP4 ABC C4	AP + BL	Nieren, BHS Prostata, Plexus choroideus	cAMP, cGMP, Gallensalze, Folat, konjugierte Steroide, Prostaglandine (PGE1, PGE2)	Ganciclovir, Topoisomerase I-Inhibitoren, Mefloquin
MRP5 ABC C5	BL (außer BHS)	Skelett- und Herzmuskel, Testikel	cAMP, cGMP, Folat, DNP- SG	Methotrexat, Adefovir
MRP6 ABC C6	BL	Leber, Niere, Haut, Lunge, Herz, Intestinum, Pankreas, Magen	LTC4, DNP-SG	Etoposid, Doxorubicin, Daunorubicin
MRP7 ABC C7	?		Estradiol-17-β-Glucuronid, LTC4	Vinka-Alkaloide, Daunorubicin
BCRP ABC G2	AP	Plazenta, Brust, BHS; Leber, Intestinum	Vitamine (Riboflavin, Biotin), Porphyrine, Estrogen-Sulfat-Konjugate	Nifedipin, Nitrofurantoin, Diclofenac

1.2.4 SLC-Superfamilie

Die SLC-Superfamilie (Solute Carrier) beinhaltet 43 Unterfamilien, von denen einige in Geweben exprimiert werden, welche in den Transport von Xenobiotika involviert sind, wie Leber, Nieren, Intestinum und das Gehirn [39, 40]. Der Organic Anion Transporter OATP1B1 (zur SLC21/SLCO-Familie gehörend) ist das am besten charakterisierte Mitglied. Er wird vorwiegend in der basolateralen Membran von Hepatozyten exprimiert und endogene Substrate sind Bilirubin und seine Glucuronide, Gallensalze, Schilddrüsenhormone und Steroide. Die klinisch relevantesten exogenen Substrate sind die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine). Die Aufnahme von Statinen durch OATP1B1 in Hepatozyten ist der erste Schritt der hepatischen Elimination und gleichzeitig Voraussetzung für den therapeutischen Effekt. Die Beeinträchtigung von OATP1B1 durch Co-Administration von Substraten/Inhibitoren (z.B. Rifampicin) oder aufgrund von genetischen Polymorphismen kann zu einer verminderten Konzentration von Statinen in der Leber und zu einer Erhöhung im Plasma führen, was in einem Verlust von Wirksamkeit auf Kosten von erhöhter Toxizität und unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAWs) resultiert.

Zur Unterfamilie der SLC22 gehören OATs und OCTs (Organic Anion und Cation Transporter), welche die Aufnahme von organischen Anionen, Kationen und Zwitterionen durch Austausch mit intrazellulären Dicarboxylaten (z.B. α-Ketoglutarat) vermitteln.

1.2.5 ABC-Superfamilie

ABC-Proteine (ATP binding Cassette) transportieren eine große Auswahl von Pharmaka, Nährstoffen und Metaboliten. Durch die Expression in Geweben wie Darmepithel, Gehirn, Lunge, Plazenta und Leber kommt ihnen neben der Rolle in der Aufnahme und dem Transport von Nährstoffen und Xenobiotika eine Barrierefunktion zu. Von den bislang 48 identifizierten humanen ABC-Transportern werden insbesondere 9 mit dem Phänomen der Multidrug Resistance (MDR) assoziiert. Eine auffallende Eigenschaft dieser MDR-Transporter ist ihre fehlende Substratspezifität und die Fähigkeit eine große Anzahl von chemisch unterschiedlichsten Verbindungen zu transportieren, was Vorhersagen zu Affinitäten zu diesen Transportern extrem schwierig macht.

Expression im Gewebe und physiologische Funktion

Die Transporter P-Gp (ABC B1, MDR1, Multidrug Resistance Protein 1), BCRP (ABC G2, MXR) und MRP2 (ABC C1) nehmen eine besondere Stellung beim Transport von Pharmaka ein. Sie werden in apikalen Membranen polarisierter Zellen exprimiert (u.a. des intestinalen Epithels), wo sie die Absorption von Xenobiotika limitieren, einschließlich vielen klinisch relevanten Wirkstoffen. In der canalikulären Membran von Hepatozyten und dem renalen Epithel sind sie an der Exkretion von Stoffen in Galle und Urin beteiligt. In der apikalen Membran des Kapillarendothels im Gehirn funktionalisieren P-Gp und BCRP die Barriere der Blut-Hirn-Schranke.

Apikal gelegene Transporter tragen durch Exkretion von Xenobiotika in Darmlumen, Galle und Urin zur Detoxifikation der Zelle bei, während die basolateral gelegenen die (Re-)Absorption von Verbindungen aus der Zelle ins Blut vermitteln [3, 41]. In polarisierten Zellen von Barrieregeweben wie dem Kapillargewebe der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta sind ABC-Transporter zur Blutseite hin orientiert, um Xenobiotika vom Organ abgewandt zurück ins Blut zu transportieren. Durch die breite Gewebeverteilung und Substratvielfalt sind die Transporter kooperativ an der Detoxifikation von Geweben beteiligt.

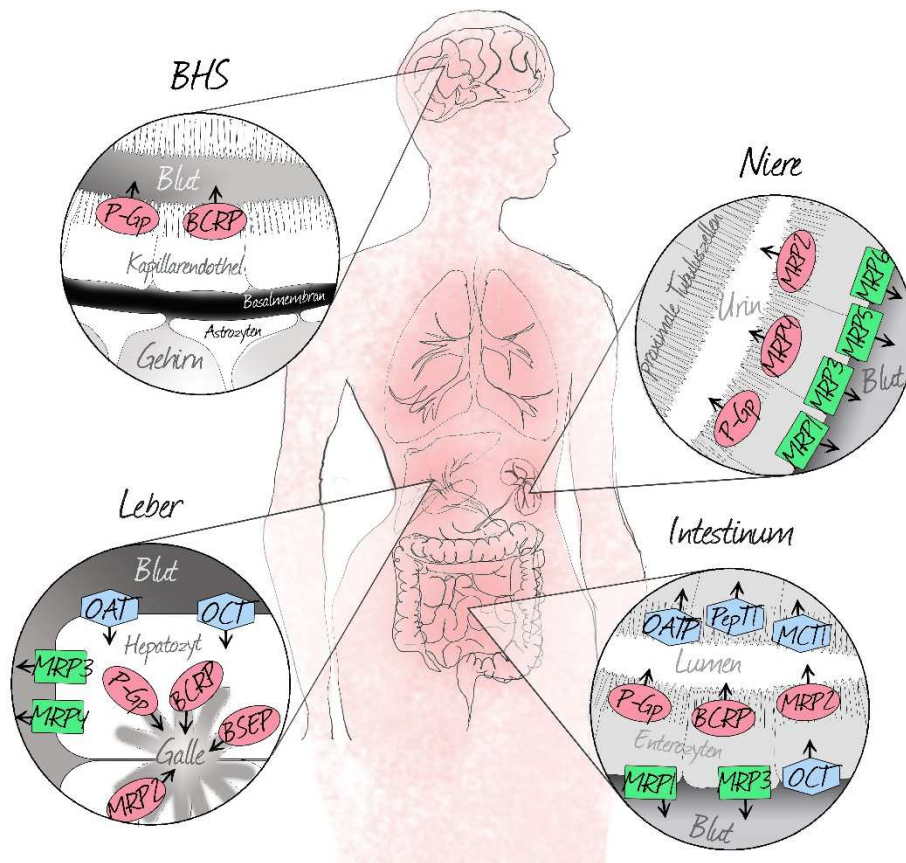


Abb. 4: Gewebeverteilung von Transportern

BHS = Blut-Hirn-Schranke, BCRP = Breast Cancer Resistance Protein, OAT = Organic Anion Transporter, OCT = Organic Cation Transporter, MRP = Multidrug Resistance Protein, BSEP = Bile Salt Efflux Protein, PepT = Peptide Transporter, MCT = Monocarboxylate Transporter

Topologie

ABC-Proteine setzen sich aus folgenden Untereinheiten zusammen [40]: Den Transmembran Domänen (TMD) und den cytosolischen Nukleotid Bindungs Domänen (NBD). Jeweils 2 NBDs bilden als Dimer das cytosolische ATP-Hydrolyse-Zentrum eines ABC-Proteins, insbesondere gebildet durch die Walker A und Walker B Region innerhalb der NBDs [42]. Charakteristisch für ABC-Proteine ist eine stark konservierte Aminosäuresequenz, welche sich zwischen der Walker A und B Region befinden (ABC signature motif/C motif). Die NBDs aller Proteine der ABC-Superfamilie weisen eine 25%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz auf. Die TMDs hingegen bestehen jeweils aus typischerweise 6 transmembran lokalisierten α -Helices und sind hauptsächlich für die Spezifität des Proteins verantwortlich. Gleichzeitig weisen sie jedoch eine viel höhere Variabilität in ihrer Aminosäuresequenz und der Verankerung innerhalb der Membran als die NBDs auf.

Während sich die meisten ABC-Proteine typischerweise aus jeweils zwei TMDs und zwei NBDs zusammensetzen, gehören das BCRP als Halbtransporter (nur je eine TMD und NBD) und das MRP2 mit einer zusätzlichen TMD zu den Ausnahmen von dieser Regel (Abb. 5).

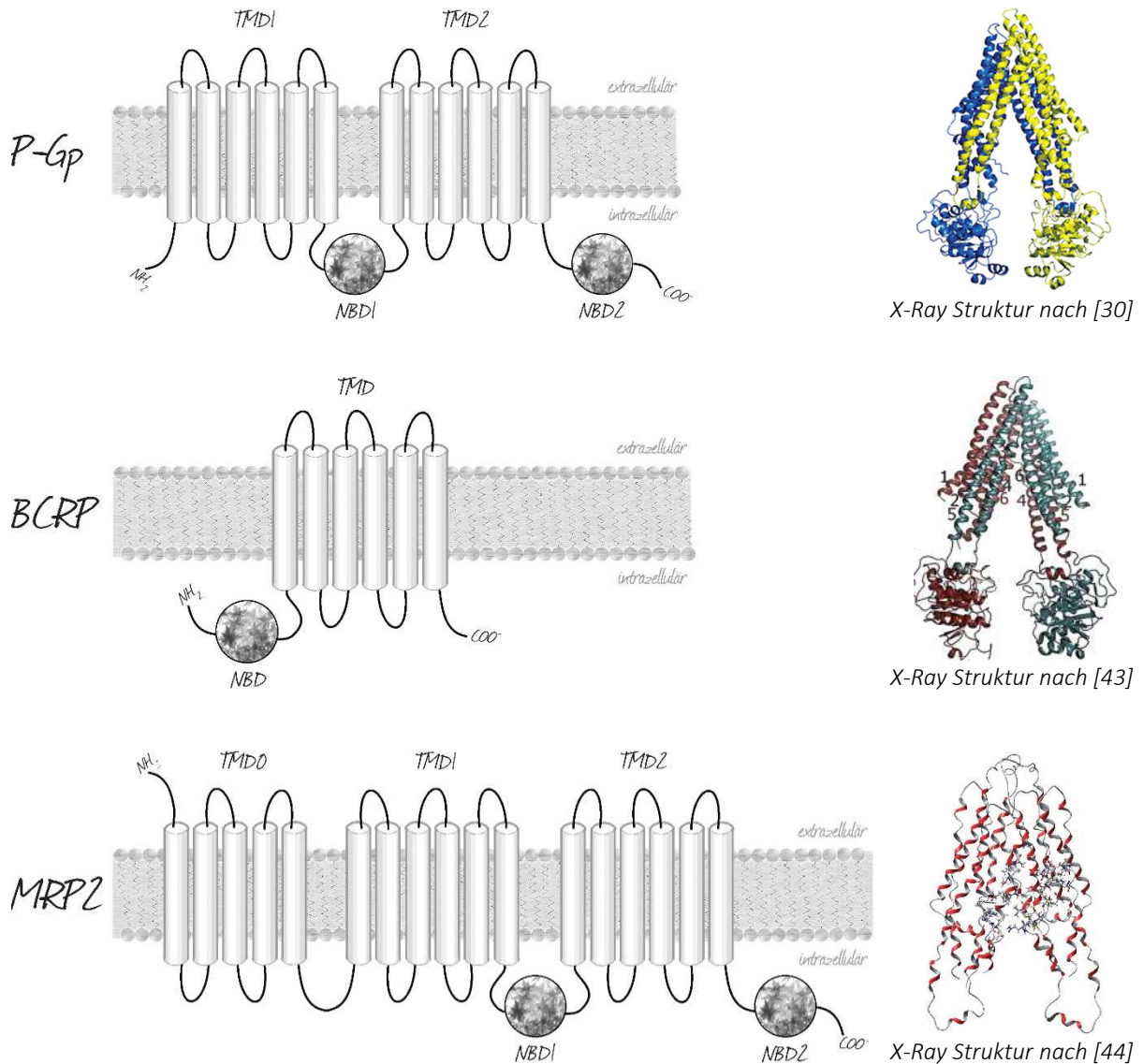


Abb. 5: Topologie von ABC-Transportern

P-Gp: 2 Transmembran-Domänen (TMDs) mit jeweils 6 transmembranären Helices und 2 Nukleotid-Bindungs-Domänen (NBDs). **BCRP:** Halbtransporter mit 1 TMD (6 Transmembran Segmente) und 1 NBD am N-Terminale Ende. **MRP2:** 3 TMDs (zusätzliche TMD0 mit 5 transmembranären Helices und einem extrazellulären N-Terminus) und 2 NBDs.

Der Translokationsmechanismus [40] wird wahrscheinlich durch die Bindung eines Substrates ausgelöst, welches das Cross-linking zwischen den 2 NBDs erhöht und somit ihre Dimerisation bewirkt. In dieser Form können 2 ATP-Moleküle gebunden werden, was eine geringfügige Ausrichtung der helikalen Regionen der NBDs bewirkt. Diese interagieren

daraufhin mit intrazellulären Loops der TMDs, was eine starke Konformationsänderung der TMDs zur Folge hat. Diese Konformationsänderungen äußern sich in einer durch die TMDs gebildeten Öffnung, welche alternierend nach außen und innen geöffnet ist und somit den Transport von Substraten durch die Plasmamembran ermöglicht.

1.2.6 P-Gp

Gewebeverteilung und physiologische Funktion

Das P-Gp wird in einer Reihe von polarisierten Zellen sezernierender Gewebe auf der apikalen Membran exprimiert, wie unter anderem der canalikulären Membran von Hepatozyten, Proximalem Tubulus der Niere, Enterozyten, dem Kapillarendothel der Blut-Hirn-Schranke, den Testikeln und der Plazenta [34]. P-Gp transportiert neben einigen endogenen Substraten wie Steroiden vor allem Xenobiotika und Toxine und ist für deren limitierte Aufnahme verantwortlich. Vor allem in entarteten Tumorzellen wird das P-Gp stark überexprimiert, was in Kombination mit fehlender Substratspezifität in vielen Kreuz-Resistenzen gegen verschiedenste Vertreter von Zytostatika resultiert. Das breite Gewebevorkommen und die große exogene Substratweite teilt P-Gp eine wichtige physiologische Schutzfunktion zu [33, 45].

Synergie mit Cytochrom P450 Enzymen

Das metabolisierende Enzym CYP3A4 ist für die Biotransformation eines Großteils der klinisch eingesetzten Wirkstoffe verantwortlich und verfügt über große Überlappungen in Substratspezifitäten zum P-Gp, was zu funktionellen Interaktionen im Intestinum und der Leber führt [46-48]. P-Gp und CYP3A4 sind an den Spitzen der Zotten im Intestinum co-lokalisiert, wobei CYP3A4 sich vor allem im oberen Teil der Zellen befindet, direkt unterhalb des in der apikalen Membran lokalisierten P-Gps [49]. Daher erfüllen beide eine kooperative Schutzfunktion, indem die Exposition mit Toxinen und Xenobiotika limitiert wird.

Die Interaktion von P-Gp mit CYP3A4 in der intestinalen Mucosa kann in drei unterschiedliche Ebenen eingeteilt werden [47, 50, 51]: a) Verbindungen werden wiederholt absorbiert und durch das P-Gp erneut herausgeschleust, was deren Expositionsdauer mit CYP3A4 erhöht und somit den Metabolisierungserfolg gewährleistet. b) Durch den P-Gp-vermittelten Efflux wird die Konzentration an Xenobiotika in Enterozyten gering gehalten und

CYP3A4 daher nicht abgesättigt. c) Durch CYP3A4 entstandene Metabolite werden von P-Gp in das Darmlumen abtransportiert und können so exkretiert werden.

Beide Proteine werden durch den nuklearen Pregnan-X-Rezeptor (PXR) reguliert [52]. Viele Xenobiotika, die PXR aktivieren, können daher P-Gp und CYP3A4 gleichzeitig induzieren. Eine Inhibierung von P-Gp oder die Änderung der Expressionsrate beeinflusst folglich nicht nur den Efflux eines Substrates, sondern auch die Metabolisierung und Elimination durch CYP3A4.

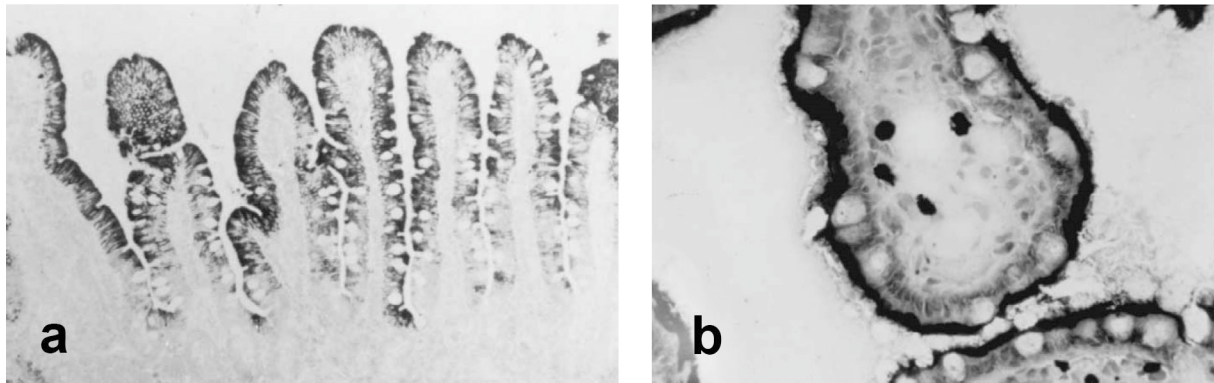


Abb. 6: Co-Expression von P-Gp und CYP3A4

Humanes Jejunum, Färbung mit polyklonalen Antikörpern [49]. a: Höchste Dichte an CYP3A4-haltigen Bereichen (dunkel) in ausgereiften Enterozyten an Spitzen der Zotten, keine Detektion in den Krypten. Lokalisierung innerhalb der Enterozyten überwiegend an der absorbierenden Oberfläche, direkt unterhalb der Bürstensaummembran. b: Lokalisierung von P-Gp (dunkel) ausschließlich in apikaler Membran, in direkter Nähe zu intrazellulär lokalisierten CYP3A4.

Topologie und Translokationsmechanismus

Das P-Gp ist ein 170 kDa schweres Protein und setzt sich aus zwei homologen Untereinheiten aus jeweils einer in der Plasmamembran verankerten Transmembran-Domäne (TMD) und einer intrazellulären Nukleotid-Bindungs-Domäne (NBD) zusammen. Der Translokationsmechanismus von P-Gp kann durch folgende Schritte zusammengefasst werden: a) Beladung mit Substrat und Nukleotiden (ATP), b) Affinitätsverlust und c) ATP-Verbrauch und Regeneration [53]. Die zwei TMDs (mit jeweils 6 α -Helices) sind im Ausgangszustand streng symmetrisch angeordnet und bilden eine große, zentrale Pore (ca. 6000 Å³ groß), welche zum intrazellulären Raum hin geöffnet ist. Nach ATP-Bindung an die NBDs und der resultierenden Konformationsänderung jedoch, ergibt die Neigung 2er α -Helices eine Asymmetrie, welche eine Öffnung innerhalb einer transmembranären Region und somit einen Zugang für Substrate aus der Plasmamembran bildet [30, 54]. Substrate werden daher direkt aus der

Plasmamembran extrahiert, noch bevor sie den Intrazellularraum erreichen. Da die Bindungsdomäne mit dem wässrigen Extrazellulärmedium in Verbindung steht, wird das Substrat nach Bindung hydratisiert [55], was das Wiederaustreten in die Cytoplasmamembran verhindert. Die Bindung von ATP bewirkt außerdem eine strukturelle Reorientierung der Bindungsdomäne zum Extrazellulärmedium hin, was in einem erheblichen Affinitätsverlust für das Substrat resultiert [56]. Dieses wird daraufhin aus der Bindung in das Extrazellulärmedium entlassen und unter ATP-Verbrauch reorientiert sich das Protein in seine ursprüngliche Konformation [57].

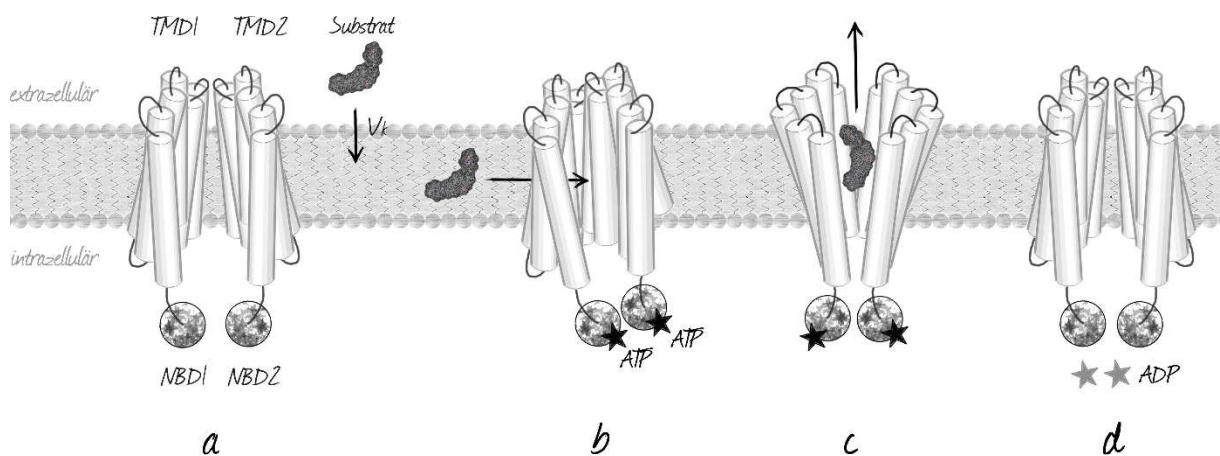


Abb. 7: P-Gp Efflux Mechanismus

a: P-Gp liegt streng symmetrisch vor, die zwei TMDs bilden eine zum Intrazellulärraum geöffnete Pore. Ein Substrat permeiert entsprechend seinem Verteilungskoeffizienten in die Cytoplasmamembran. **b:** Nach ATP-Beladung der NBDs ergibt sich eine Asymmetrie der TMDs, wodurch eine Öffnung in die Cytoplasmamembran entsteht, aus der das Substrat heraus extrahiert wird. **c:** Durch die Bindung des Substrates und resultierende konformationelle Veränderungen der TMDs erfolgt ein starker Affinitätsverlust zum Substrat, welches in das Extrazellulärmedium hergeschleust wird. **d:** Unter ATP-Hydrolyse reorientiert sich das Protein in seine ursprüngliche Konformation.

Substrate und Inhibitoren

Ein möglicher Grund für die breite und schwer vorhersehbare Substrataffinität ist das Vorhandensein von mehreren Bindungsstellen innerhalb der TMDs, welche multiple Substrate kompetitiv und nichtkompetitiv binden können [30, 58-60]. Die Spezifitäten der Bindungsstellen sind überlappend und jede Bindungsstelle akzeptiert eine Reihe von verschiedenen Verbindungen, was die Begründung für die breite Substratverteilung ist. Zusätzlich stellte die Gruppe um Loo et al. eine Hypothese auf, nach der die Größe und räumliche Ausrichtung eines Substrates die Anordnung der transmembranären Strukturen des P-Gps beeinflussen können [61]. So würde jedes Substrat eine spezifische Umordnung in

unterschiedlichen transmembranären Segmenten bewirken (substrate-induced fit). Zusätzlich zum Vorhandensein von multiplen Bindungsstellen wäre diese Flexibilität in der Bindungstasche eine Erklärung für die extrem breite Substratverteilung des Proteins.

Für das P-Gp wurden ausführliche Untersuchungen mittels radioaktiv markierten Liganden und mittels Quantitativer Struktur-Aktivitäts Analyse (QSAR) zu Struktur-Wirkungsbeziehungen identifizierter Substrate durchgeführt [62, 63]. Die Intention war, Wechselwirkungs- und Affinitätsvorhersagen zu etablieren, allerdings resultierte kein optimales Modell, das für alle bekannten Substrate zeitgleich anwendbar und hinreichend zutreffend war. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Großzahl der P-Gp-Substrate amphiphile, aromatische Verbindungen sind, welche eine Molekülmasse von 300-2000 Da besitzen und ungeladen, anionisch oder kationisch sein können [55, 64]. Weiterhin scheinen sich Lipophilie, das Vorhandensein einer Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Stelle, hydrophoben aromatischen Bereichen und einer basischen Gruppe in definierten Abständen zu einander vorteilhaft auf die Bindungsaffinität auszuwirken [65, 66].

Viele Inhibitoren binden durch Wasserstoffbrücken an das P-Gp und benötigen hierzu (mindestens) zwei Wasserstoffbrücken-Akzeptoren, zusätzlich zu zwei hydrophoben Gruppen jeweils in einem definierten Abstand zu einander [67]. Ob eine Verbindung als Substrat oder Inhibitor fungiert, ist abhängig von der Stärke der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen; Inhibitoren haben eine höhere Affinität aufgrund stärkerer und höherer Anzahl an ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen und zeigen daher eine langsamere Dissoziation vom P-Gp. Die Affinität eines Substrates bzw. Inhibitors ist folglich proportional zur Wasserstoffbrückenstärke und dem spezifischen Abstand zwischen den Wasserstoffbrücken-Gruppen.

Zu den Inhibitoren der 1. Generation zählen Verapamil und Ciclosporin A, welche bereits in verschiedenen in vitro Assays und klinischen Studien als P-Gp-Inhibitoren eingesetzt wurden, sich jedoch aufgrund nicht spezifischer Toxizität nicht durchsetzen konnten [68, 69]. Die 2. Generation beinhaltet chemische Derivate der ersten Generation, welche zum Zweck der besseren Verträglichkeit entwickelt wurden: D-Verapamil als selektiver P-Gp-Inhibitor mit reduzierter Ca^{2+} -Kanalblockade und Valspodar (PSC833) als nicht-immunsuppressives Derivat von Ciclosporin A [70-72]. Es konnte jedoch trotz reduzierter toxischer Effekte keine Erhöhung der Überlebensrate erzielt werden. Zwei vielversprechende Vertreter der 3. Generation sind

Elacridar (GF120918) und Tariquidar (XR9576), die in klinischen Studien der Phase II und III gute Verträglichkeit und Vorteile für die behandelten Patienten zeigten [73-75].

Problematisch ist allerdings die aus der P-Gp-Inhibierung resultierende gestörte physiologische Barrierefunktion, sodass Substrate ins Gehirn und andere Gewebe penetrieren können. Daher besteht ein weiterer Ansatz darin, APIs zu entwickeln, welche von vorneherein nur schwache oder keine Substrate für Effluxtransporter darstellen. Da ein „Generalrezept“ hierfür bislang nicht verfügbar ist, sind in vitro Screenings für Vorhersagen zu Transporteraffinitäten unabdingbar, was letzten Endes auch die Grundlage dieser Arbeit darstellte.

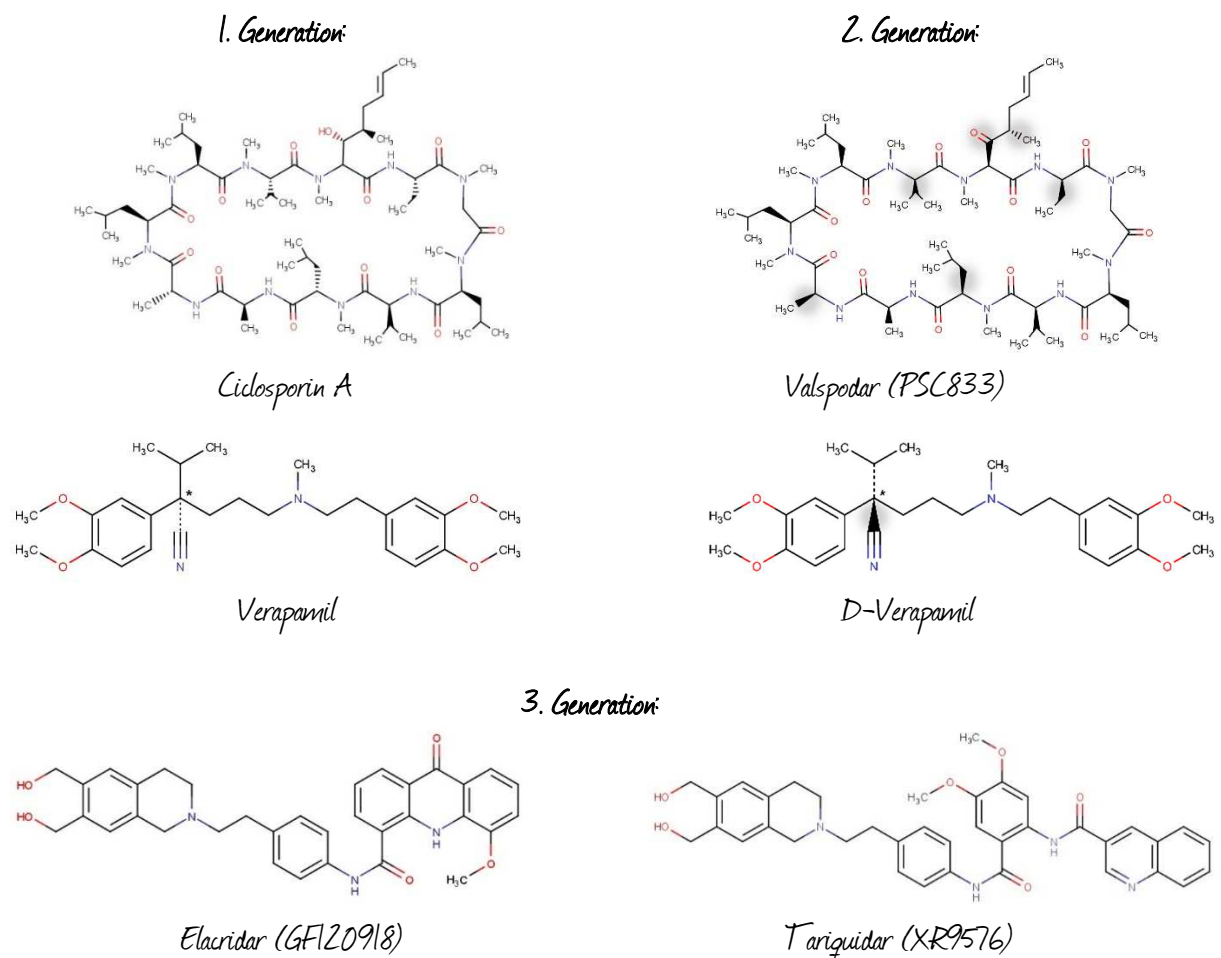


Abb. 8: P-Gp-Inhibitoren

1.2.7 BCRP

Gewebeverteilung und physiologische Rolle

Das BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) wird in Geweben wie Epithelien des Dün- und Dickdarmes, Gehirn, Leber, Niere und Plazenta exprimiert und teilt sich somit viele Expressionsorte und Barrierefunktionen mit dem P-Gp [76-78]. Zu den physiologischen Funktionen gehört die Sekretion von Porphyrinen aus hämatopoetischen Zellen und Hepatozyten und von Riboflavin (Vitamin B 12) in die Muttermilch [79].

Die Auswahl exogener Substrate ist im Vergleich zu P-Gp und MRP-Proteinen limitierter und zu typischen Substraten gehören neben einigen Zytostatika (Mitoxantron, Doxorubicin) auch Fluorchinolone und einige Statine, sowie Sulfat- und Glucuronid-Konjugate [78, 80-82]. Dem BCRP kommt eine klinisch relevante Rolle in der Exkretion von Topotecan und zusammen mit OATP1B1 in der Pharmakokinetik von Statinen zu [83-85].

Topologie und Mechanismus

Als Ausnahme unter den ABC-Proteinen ist das BCRP ein Halbtransporter. Es setzt sich mit ca. 75 kDa (655 Aminosäuren) aus nur einer TMD (6 Helices) und einer N-terminalen, auf der cytoplasmatischen Seite gelegenen NBD zusammen. Es erfolgt somit eine Dimerisation mit weiteren BCRP-Proteinen zu einem funktionalen Homodimer-/Oligodimer-Transporter [31, 86-88].

Ähnlich zum P-Gp bilden BCRP-Dimere/Oligomere eine große Öffnung, welche multiple Bindungsstellen bietet und für Substrate aus dem Inneren der Cytoplasmamembran oder dem Intrazellularraum erreichbar ist. Die Bindung von Substraten resultiert in einer starken Konformationsänderung des Proteinkomplexes, was nach ATP-Hydrolyse zur Substratabgabe in den Extrazellularraum führt [31, 43, 89].

Inhibitoren

Zu bekannten Inhibitoren des BCRPs gehört das selektive und potente Fumitremorgin C, welches jedoch aufgrund starker Neurotoxizität nicht zum Einsatz in vivo geeignet ist. Ein weiterer potenter Inhibitor ist GF120918, welcher aber auch das P-Gp inhibiert und daher als dualer Inhibitor nicht zur selektiven BCRP-Inhibierung eingesetzt werden kann. Vielversprechend sind Fumitremorgin C-Derivate, wie das Ko143, welches neben einer

hervorragenden inhibitorischen Potenz und Selektivität eine geringe Toxizität in vitro und in vivo (Maus) gezeigt hat [82, 86, 90].

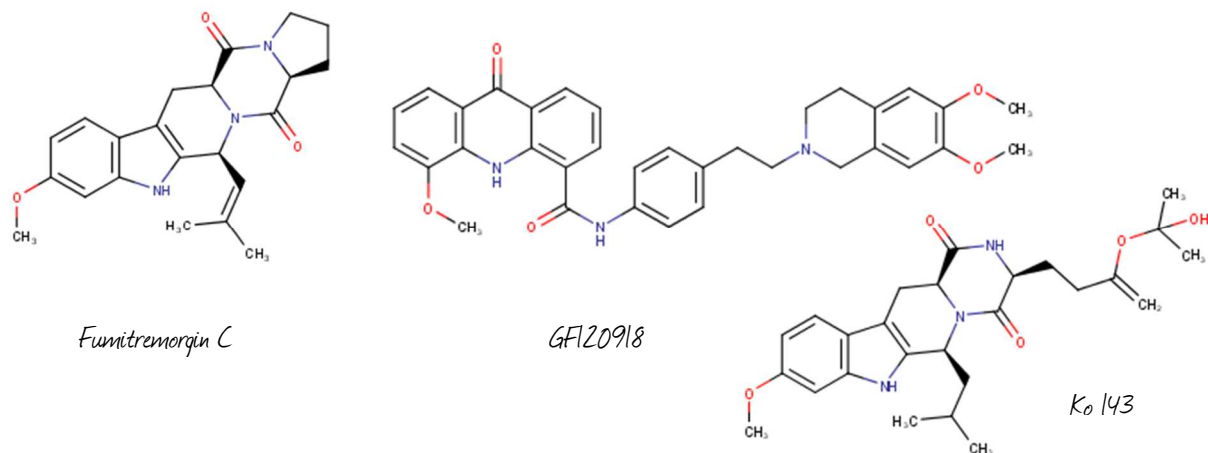


Abb. 9: BCRP-Inhibitoren

Ein neuer, hypothetischer Ansatz zur BCRP-Inhibition bezieht sich auf die Dimerisierung/Oligomerisierung des Proteins [31]. Diese ist obligate Voraussetzung zur funktionalen ATP-Hydrolyse und Substrat-Translokation. Durch den Einsatz von kleineren Peptiden oder Molekülen, welche mit für die Dimerisierung/Oligomerisierung wichtigen Regionen interagieren, könnte BCRP-vermittelter Efflux verhindert werden. Allerdings sind die für die Dimerisierung/Oligomerisierung verantwortlichen Strukturen bislang noch wenig erforscht und der Prozess nicht vollständig verstanden.

1.2.8 MRP2

Gewebeverteilung und physiologische Funktion

Unter den Vertretern der MRPs (Multidrug Resistance Protein) sind neben Efflux- auch Influx-Transporter vertreten, welche zum Beispiel an der Aufnahme von Ampicillin und Adefovir beteiligt sind [25]. Das MRP2 wird als einziges der MRP-Proteine ausschließlich auf der apikalen Seite sezernierender Zellen exprimiert und ist für die Wirkstoffaufnahme im Gastrointestinaltrakt relevant.

Das multispezifische MRP2 ist hauptsächlich an der Elimination von Xenobiotika und deren Glucuron-, Sulfat- und GSH-Konjugaten beteiligt. Es wird vorwiegend in der canalikulären Membran von Hepatozyten exprimiert, ist aber neben anderen Geweben ebenfalls am Epithel

des Dünndarms, der Gallenblase und der apikalen Membran vom proximalen Tubulus der Niere zu finden [36, 38, 91, 92]. Während der Schwangerschaft steigt der in der Plazenta exprimierte Level an MRP2, was den Fetus vor Xenobiotika und endogenen Konjugaten schützt [93]. Ähnlich zu P-Gp und CYP3A4, ergibt sich ein Synergismus durch die Co-Lokalisation von MRP2 und Phase II metabolisierenden Enzymen inklusive der GSH-S-Transferase und der UDP-Glucuronosyl-Transferase [86, 94].

Das Fehlen von MRP2 resultiert im Dubin-Johnson-Syndrom, welches sich in einer Hyperbilirubinämie und einer dunklen Pigmentierung der Leber äußert. Hierbei entfällt die Sezernierung von konjugiertem Bilirubin aus der Leber in die Galle, was eine Anreicherung in der Leber und einen Rückstau im Blut zur Folge hat [95, 96].

Topologie und Mechanismus

Mit 190 kDa und 1545 Aminosäuren ist das MRP2 das größte Protein unter den MRPs. Es ist wie alle ABC-Proteine aus 2+2 NBDs und TMDs (mit je 6 transmembranären Helices) aufgebaut, besitzt jedoch eine zusätzliche N-proximale TMD aus 5 Helices. Die NBDs sind, anders als es bei P-Gp angenommen wird, nichtequivalent zu einander. Beide binden jeweils ein ATP-Molekül, jedoch besitzt eine NBD die höhere Affinität für ATP, während die andere NBD eine größere Kapazität zur ATP-Hydrolyse aufweist. Die zwei TMDs formen zwei nicht identische Bindungsdomänen und haben somit die Funktion von Substrataffinität und -transport [32, 38]. Ein weiterer großer Unterschied von MRP2 zu P-Gp und BCRP besteht im Cotransport von seinen Substraten mit reduziertem GSH [97, 98].

Substrate und Inhibitoren

In den Substraten zeigt sich eine große Überlappung zu MRP1; beide transportieren GSH-, Glucuronid- und Sulfat-Konjugate. Allerdings ist das MRP2 ausschließlich auf apikalen Membranen zu finden, während das MRP1 überwiegend auf der basolateralen Seite exprimiert wird und im Gastrointestinaltrakt eine untergeordnete Rolle spielt. MRP2 transportiert bevorzugt amphiphile Anionen, aber auch neutrale oder kationische Verbindungen wie reduziertes und oxidiertes GSH, Estradiol-17 β -Glucuronid und Leukotriene (LTC₄, LTD₄ und LTE₄) [38].

Inhibitoren sind häufig kompetitiv bindende Substrate wie LTC₄, MK571 und Phenolphthalein-Glucuronide (*Abb. 10*). Neben einer nicht zu vernachlässigenden Aktivität

gegenüber MRP1, ergeben sich in vivo unzureichende Penetrationsraten in vielen Geweben [82].

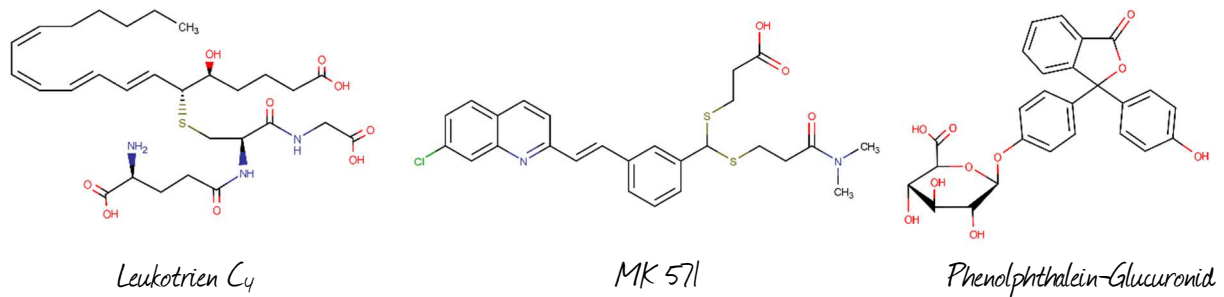


Abb. 10: MRP2-Inhibitoren

1.3 Caco-2 Zellkultur

Permeationsstudien an Caco-2 (humane colorektale Adenokarzinom-Epithelzellen) Zellen sind fester Bestandteil des BCS (Biopharmaceutics Classification System) zur Charakterisierung und Einteilung bekannter und neuer Wirkstoffe [99]. Hierbei werden APIs in vier verschiedene Klassen in Abhängigkeit von ihrer Löslichkeit und Permeabilität eingeteilt (Abb. 11). Ein aktuellerer Ansatz schlägt vor, den Einfluss von metabolisierenden Enzymen und des Eliminationsmechanismus in die Klassifizierung mit einzubeziehen [100]. Weiterhin wird von der EMA und FDA empfohlen, alle neuen APIs auf Substrate für Efflux- und Uptake-Transporter zu prüfen. Innerhalb der vorklinischen Datenfindung ist so eine kostengünstige und präzise Einschätzung möglich. Vorgeschlagen werden neben Caco-2 auch transfektierte MDCK-Zellen, Vesikel und k-o Tiermodelle. Vorteilhaft an Caco-2 Zellen ist hierbei, dass sie viele charakteristische MDR-Transporter (incl. P-Gp, BCRP und MRP2) und metabolisierende Enzyme wie u.a. CYP3A4 exprimieren, bereits seit Jahrzehnten gut etabliert zu Permeationsstudien genutzt wurden und präzise Vorhersagen zu humaner gastrointestinaler Resorption liefern.

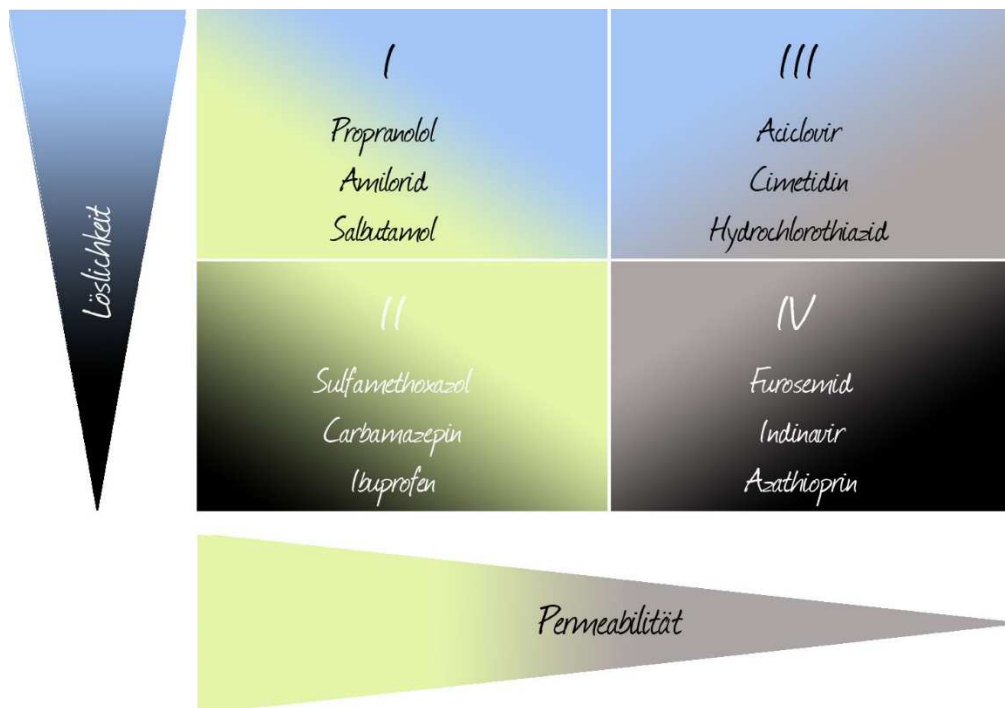


Abb. 11: Biopharmaceutical Classification System (BCS)

1.3.1 Morphologie und biochemische Eigenschaften

Die Zelllinie wurde aus einem humanen Colon-Adenokarzinom isoliert und differenziert unter Kultivierung auf festen Oberflächen oder Membranen zu einem konfluenten Monolayer, welcher morphologisch und biochemisch ausgeprägte Übereinstimmungen zum humanen Darmepithel aufweist [101]. Die Zellen adhärieren bereits wenige Stunden nach Aussaat, während einige Tage später transmissionselektronenmikroskopisch eine auf die apikale Seite begrenzte Ausbildung von Mikrovilli und basolaterale Ausrichtung der Zellkerne erkennbar ist [101-103]. Nach Erreichen von Konfluenz entwickeln die Zellen zahlreiche, für das humane Intestinum charakteristische Merkmale aus; zum Beispiel die Verbindung der Zellen untereinander durch Tight Junctions, typische Enzyme der Bürstensaummembran wie die Alkalische Phosphatase und Aminopeptidasen, metabolisch aktive Enzyme wie Glutathion-S-Transferasen und Cytochrom P 450, sowie viele aktive Transporter [23, 104].

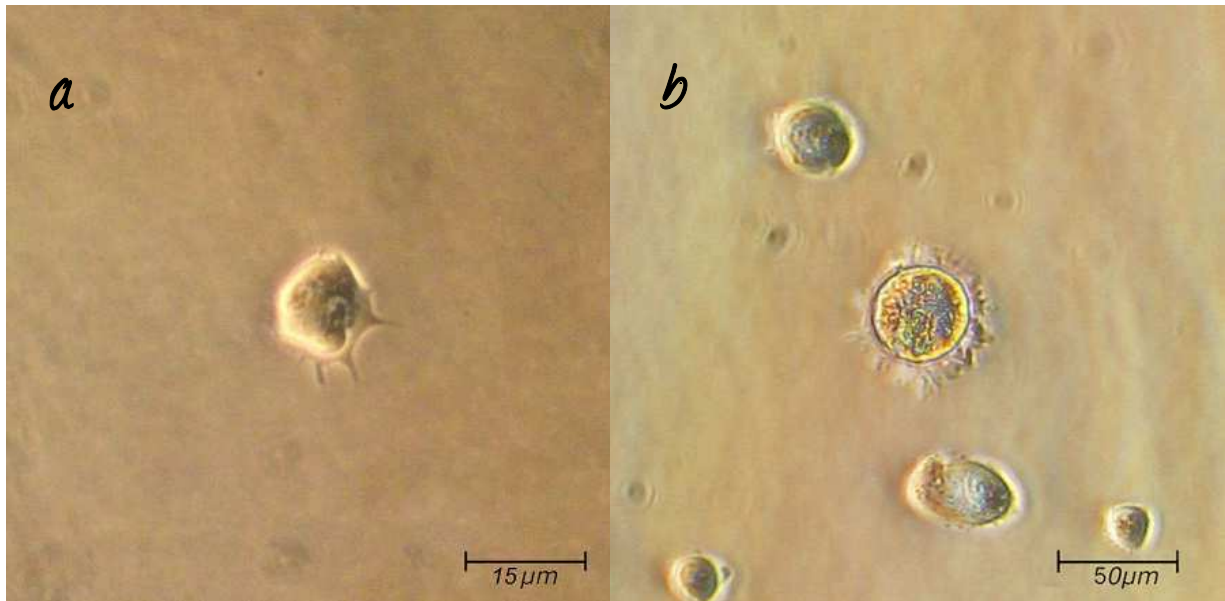


Abb. 12: Adhärierende Caco-2/TC7 Zellen Lichtmikroskop, **a**: #46, $d = 1$. **b**: #51, $d = 2$

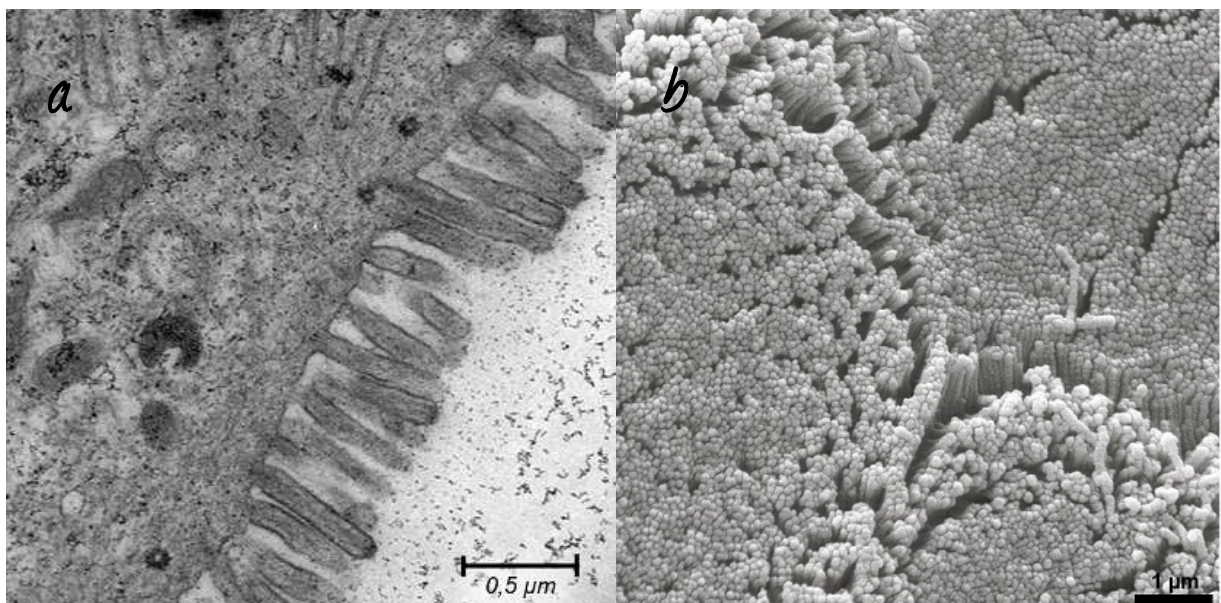


Abb. 13: apikale Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen
a: charakteristische Mikrovilli auf apikaler Seite von differenzierten Caco-2 Zellen, Transmissionselektronenmikroskop [103]. **b**: apikale Seite eines Caco-2 Monolayers [105]

1.3.2 Subklon Caco-2/TC7

Der Subklon TC7 wurde aus einer späteren Passage der parentalen Caco-2 Zelllinie isoliert. Dieser ist im Gegensatz zur ursprünglichen Zelllinie monoklonal und unterliegt daher einer geringeren Variabilität zwischen den einzelnen Passagen. Zusätzlich ergeben sich etwas andere Expressionsmuster von Enzymen und Transportern. So werden P-Gp und CYP3A4 im Subklon

weniger stark überexprimiert, sodass das Ausmaß insgesamt eher den physiologischen Bedingungen entspricht [106, 107]. Höhere Übereinstimmung mit den Bedingungen im humanen Dünndarm erhält der Subklon zusätzlich durch die Expression von dem Enzym Sucrase-Isomaltase und der UDP-Glucuronyltransferase, welche im Metabolisierungsgeschehen Phase II Reaktionen katalysieren. Beide Enzyme zeigen in den parentalen Zellen eine sehr viel geringere Aktivität [108]. Außerdem besitzt der Subklon eine geringere Generationszeit (26 vs. 30 Tage) und eine höhere Zelldichte in der stationären Phase des Zellwachstums, welche sich zwischen Tag 9 und Tag 15 nach Aussaat mit 18×10^6 Zellen/cm² einstellt, während es bei der parentalen Zelllinie im Durchschnitt nur 16×10^6 Zellen/cm² sind [108].

1.3.3 Übertragbarkeit auf in vivo Verhältnisse

Durch Permeationsversuche an Caco-2 Zellen gewonnene Permeationskoeffizienten korrelieren sehr gut mit der im Menschen absorbierten Menge eines Wirkstoffes (siehe *Abb. 14*). Verbindungen mit Permeationskoeffizienten von größer als 1×10^{-6} cm/s werden nahezu vollständig resorbiert, solche mit Werten geringer als 1×10^{-7} nur unvollständig. Allerdings zeigen Verbindungen, welche in vivo langsam und unvollständig resorbiert werden, eine 30 – 80 x geringere Permeabilität. Diese Diskrepanz wird folgendermaßen diskutiert: a) Caco-2 Zellen bilden weniger Tight Junctions aus als der menschliche Dünndarm und besitzen somit eine geringere parazelluläre Permeabilität [109-111]. b) Caco-2 Monolayer haben eine ca. 1000 x geringere Oberfläche im Vergleich zum stark gefalteten Dünndarm. Während schnell permeierende Verbindungen hauptsächlich an den Spitzen der Villi aufgenommen werden, diffundieren langsam permeierende Verbindungen an diesen entlang. Dies vergrößert somit deren Absorptionsfläche und erhöht die Absorptionschance durch die höhere parazelluläre Durchlässigkeit und geringere Ausprägung von aktiven Transportern in der Kryptenregion [22] (siehe *Abb. 15*).

Ein weiterer Unterschied ist das Fehlen von Mucus-produzierenden Becherzellen bei der Caco-2 Zellkultur, weshalb die typische Schleimschicht des Darmepithels fehlt. Der Versuch einer Co-Kultivierung mit HT29-H Zellen, welche zu Mucus-bildenden Becherzellen differenzieren, brachte jedoch keine Abhilfe, da die resultierenden Monolayer eine erhöhte parazelluläre Permeabilität aufwiesen, jedoch keinen nachweisbaren Mucus produzierten [112].

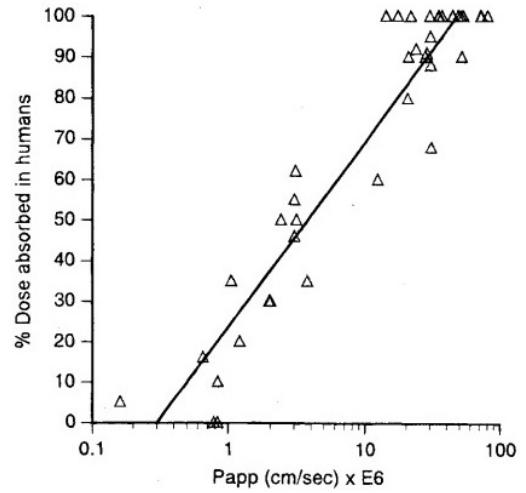
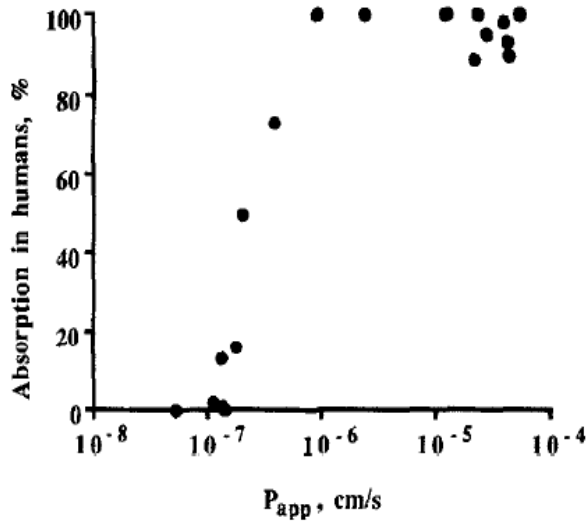


Abb. 14: Korrelation zwischen Bioverfügbarkeit und p_{app} -Werten

Korrelation zwischen der Bioverfügbarkeit im Menschen und in Caco-2 Zellen bestimmten p_{app} -Werten nach Artursson et al. (rechts, [113]) und Yee und Shiyin (links, [114]).

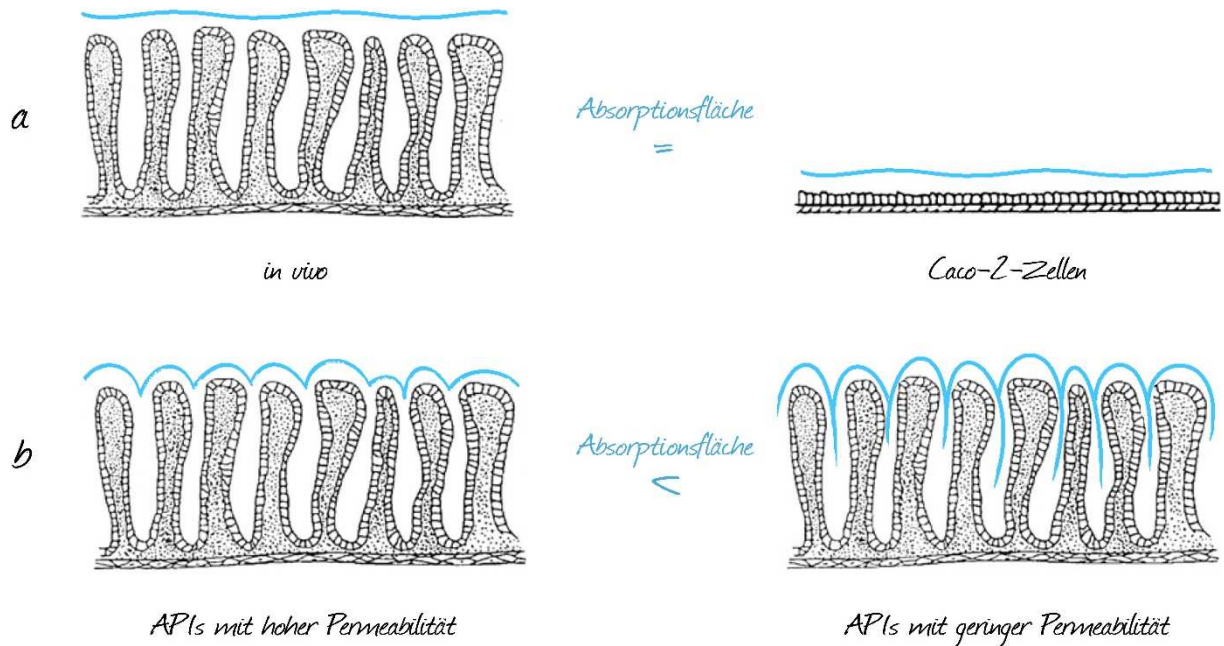


Abb. 15: Vergleich von Absorptionsoberflächen im Intestinum und Caco-2 Zellen

modifiziert nach [22]. **a:** Die Absorptionsfläche im Intestinum ist geringer als die anatomische Oberfläche, da sie als glatte Oberfläche angenommen wird, und daher vergleichbar mit der Oberfläche von Caco-2 Zellmonolayern. **b:** APIs mit geringer intestinaler Permeabilität diffundieren an den Krypten entlang und besitzen daher eine größere Absorptionsoberfläche als APIs mit hoher intestinaler Permeabilität, da sie vorrangig an den Zotten absorbiert werden.

Die relevanteste Einschränkung bei der Extrapolation von Permeationsdaten ist jedoch die quantitative Betrachtung der gewonnenen Ergebnisse. Caco-2 Zellen sind eine hoch heterogene Zelllinie, welche in verschiedenen Laboren auch unterschiedlichen Selektivitätsdrücken ausgesetzt ist. In Abhängigkeit von Passage, Filtereigenschaften, Zusammensetzung des Mediums und Kultivierungsdauer entstehen Zellen mit sehr wahrscheinlich unterschiedlichen Permeabilitätscharakteristika. Expressionsmaxima von Transportern unterliegen einem zeitlichen Verlauf, daher sollte die Variabilität der Zellen durch Verwendung von einem nur beschränkten Fenster an Passagen, die gleiche Anzahl an Tagen in Kultur vor Durchführung der Studien und Kontrolle des Wachstums und Dichtigkeit in Grenzen gehalten werden. Da quantitative Aussagen aufgrund der auftretenden Variabilität zwischen unterschiedlichen Laboren nur unzureichend sind, ist es unumgänglich, Kontrollen mit Substanzen bekannter Permeabilitäten durchzuführen, welche vergleichend auf neu gewonnene Daten angewendet werden können.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die selektive Inhibierung der p38 α -MAPK ermöglicht neue Ansätze zur Behandlung von Krankheiten wie der RA, CEDs, COPD und Tumoren. Die neue Klasse der Dibenzosuberonderivate als selektive und hochpotente p38 α -MAPK-Inhibitoren liefert vielversprechende Wirkstoffkandidaten, zu welchen jedoch noch wenig pharmakokinetische Informationen zur Verfügung stehen. Ausführliche in vitro Untersuchungen pharmakokinetischer Parameter wie der Permeabilität, Metabolisierungsrate und Transporterbeteiligungen vor einer Testung in vivo können Fragestellungen in klinischen Studien spezifizieren und für mögliche Transporter-vermittelte Drug-Drug Interaktionen (DDIs) bereits im Voraus sensibilisieren. Somit können Kosten während der Arzneimittelentwicklung eingespart und die Patientensicherheit in klinischen Studien und bei der späteren Verwendung im klinischen Alltag verbessert werden.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war daher die Aufklärung des Permeations- und Aufnahmemechanismus des Dibenzosuberons Skepinone-L und seiner Derivate im Caco-2/TC7 Modell, um Vorhersagen zur in vivo Bioverfügbarkeit treffen zu können. Hierzu wurde die Permeabilität und intrazelluläre Aufnahme systematisch untersucht und quantifiziert. Weiterhin bestand die Fragestellung, ob Unterschiede in der Permeabilität des

Dihydroxypropoxy-Dibenzosuberons Skepinone-L und der Morpholinoethoxy-Derivate FS089, FS100 und SK807 bestehen. Mit besonderem Augenmerk auf Transporterbeteiligungen wurden die Unterschiede in der Permeation und der intrazellulären Aufnahme in Caco-2/TC7 Zellen umfassend untersucht. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Aktivitätsunterschiede der Morpholinoethoxy-Regioisomere FS089, FS100 und SK807 an der p38 α -MAPK, aufgrund von regioselektiven Diskrepanzen in den Affinitäten zu aktiven Effluxproteinen zustande kommen.

Diese Arbeit sollte zum pharmakokinetischen Verständnis der Transportmechanismen der untersuchten Dibenzosuberone beitragen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten für den späteren klinischen Einsatz genutzt werden können, um Toxizitäten und DDIs aufgrund von Transporter-vermittelten Interaktionen zu vermeiden. Wenn bestimmte Strukturmerkmale als ursächlich für die Affinität zu einem Effluxtransporter identifiziert werden könnten, ergäbe sich die Möglichkeit bereits auf der Stufe des Wirkstoffdesigns Verbindungen zu entwickeln, welche in vitro und in vivo keine oder nur schwache Substrate für aktive Transporter darstellen würden.

2 Methoden

2.1 Zellkulturrpflge

2.1.1 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter aseptischen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % rF im CO₂-Inkubator. Mediumwechsel erfolgte drei Mal die Woche und zusätzlich am Tag vor einem Experiment (DMEM, 10 % FKS, 1 % NEAA, 0,1 % Gentamicin. Durchschnittlich ein Mal die Woche wurden die Zellen unter Trypsinisierung passagiert, wobei die Aussaat in Kulturflaschen bzw. Transwellsysteme und 96-Well Assay Platten zu 20 x 10⁴ Zellen/Flasche bzw. 6 und 1 x 10⁴ Zellen/Well (entspricht 6 x 10⁴ Zellen/cm²) erfolgte. Die Zellen wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen 21 - 28 Tage bis zur Konfluenz und vollständigen Ausprägung aller relevanten Transporter kultiviert, bevor sie für Experimente verwendet wurden. Zur Vorratshaltung wurden Zellen zu 1 x 10⁶ Zellen/mL eingefroren und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden ausschließlich Zellen der Passagennummern # 28 - 37 verwendet.

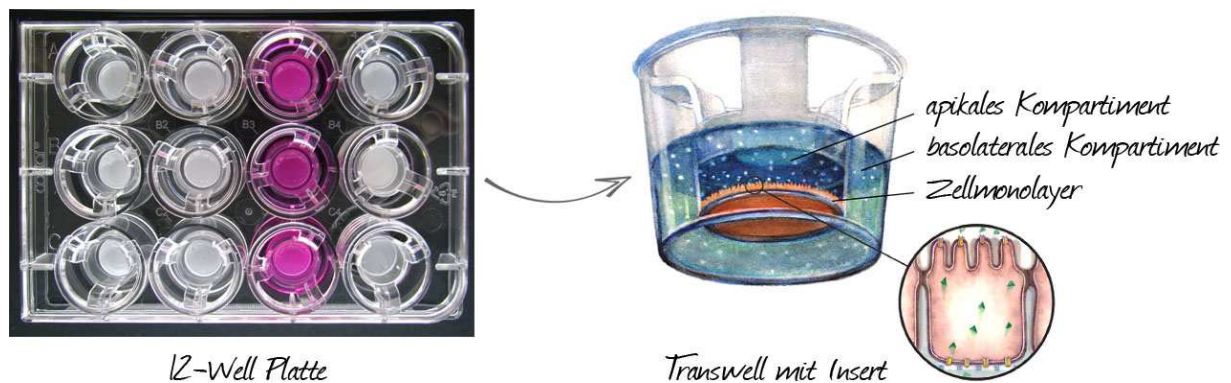


Abb. 16: Transwellsystem
modifiziert nach [39]

Tab. 4: Ausgesäte Zellen und Filterdurchmesser

PET = Polyethylenterephthalat, PTFE = Polytetrafluorethylen PE = Polyethylen, PS = Polystyrol

	Kulturflasche	Transwellsystem	96-Well Platten
Verwendung	Kultivierung	Permeations- und Aufnahmestudien	BCRP-Inhibitions Assay
Eigenschaften	Tissue Culture treated, PET-Membran, auf Innenseite mit PTFE beschichtet 0,2 µm Porengröße, 75 cm ² Wachstumsfläche	12-Well, PE-Membran, 0,4 µm Porengröße, 4 x 10 ⁶ Poren/cm ² , 1,12 cm ² Wachstumsfläche /Well	96-Well, Polystyrol PS, black with clear bottom Tissue Culture treated, 6,86 mm Durchmesser, 34 mm ² Wachstumsfläche /Well
Volumen	20 mL	Kultivierung: 0,5/1,5 mL Experimente: 0,3/1,0 mL	0,1 mL
Aussaat	20 x 10 ⁴ Zellen/Flasche	6 x 10 ⁴ Zellen/Well	1 x 10 ⁴ Zellen/Well
Dichte	0,27 x 10 ⁴ Zellen/cm ²	5,4 x 10 ⁴ Zellen/cm ²	3,3 x 10 ⁴ Zellen/cm ²

2.2 Versuche

2.2.1 Vorbereitung der Zellkultur

Das Medium wurde einen Tag vor einem Experiment gewechselt. Vor Beginn des Experimentes wurden die Zellen zweifach mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (siehe Tab. 5) gespült und für 30 min im Schüttelwasserbad (37 °C, 67 rpm) inkubiert (Vorinkubation). Bei Experimenten unter Inhibierung aktiver Transporter waren die entsprechenden Inhibitoren bereits bei der Vorinkubation im Versuchsmedium und ebenfalls während des Experimentes in allen Kompartimenten in entsprechender Konzentration enthalten (siehe Tab. 6).

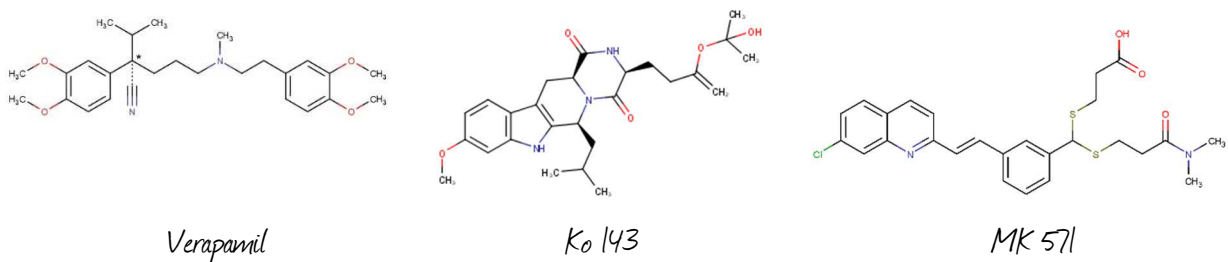


Abb. 17: Strukturformeln der eingesetzten Inhibitoren

Tab. 5: Zusammensetzung von Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

Komponente	Konzentration [mM]
CaCl ₂	1,26
MgCl ₂	0,49
MgSO ₄	0,41
KCl	5,33
KH ₂ PO ₄	0,44
NaHCO ₃	4,17
NaCl	136,93
Na ₂ HPO ₄	0,34
D-Glucose	5,56
HEPES	25,0

Tab. 6: Eingesetzte Inhibitoren

	P-Gp	BCRP	MRP2
Inhibitor	Verapamil	Ko143	MK571
Konzentration	100 µM	5 µM	10 µM

2.2.2 Zellintegrität

Die Eignung eines Zellmonolayers für ein bevorstehendes Experiment wurde über die Sicherstellung der Integrität (durch Prüfung der Dichtigkeit der Tight Junctions) bestimmt. Tight Junctions sind apikal gelegen und werden durch die Transmembranproteine Claudin und Occludin gebildet. Die Tight Junctions bilden die Grenze zwischen apikaler und basolateraler Membran, da sie die laterale Diffusion von Membranproteinen zwischen apikaler und basolateraler Seite verhindern. Somit ist die Ausbildung von interzellulären Verknüpfungen durch Tight Junctions Voraussetzung für die Polarisierung der Zellen und Spezifizierung apikal und basolateral gelegener Proteine und Transporter. Die interne Domäne der Tight Junctions ist an Aktinfilamente des Cytoskeletts gekoppelt, wodurch es der Zelle möglich ist, in Kombination mit Myosin Zug auf die Tight Junctions auszuüben und dadurch die Permeabilität lokal zu erhöhen oder zu senken. Weiterhin ist die parazelluläre Permeabilität abhängig von der Gesamtanzahl der Tight Junctions und deren Ausstattung mit verschiedenen Claudin-Typen, von denen einige Wasserporen sein können [115].

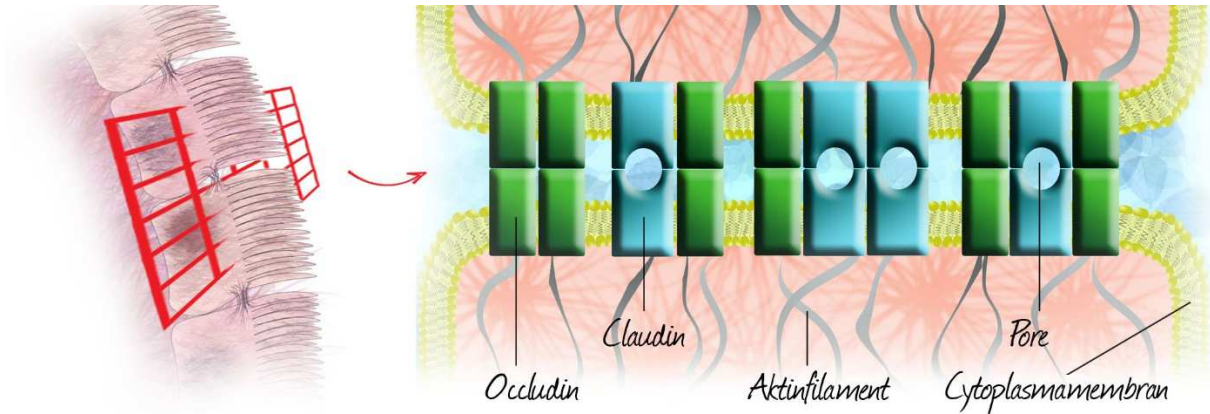


Abb. 18: Tight Junctions
 Aufsicht auf zwei angrenzende Enterozyten

Transepithelialer Elektrischer Widerstand

Zur Integritäts- und Verlaufskontrolle der Dichtigkeit der Zellen wurde der Transepitheliale Elektrische Widerstand (TEER) jedes Zellmonolayers mit einem EVOM Chopstick Voltohmmeter gemessen (Abb. 19).



Abb. 19: TEER-Messung

Der Transepitheliale Elektrische Widerstand (TEER) beschreibt den elektrischen Widerstand des Zellmonolayers gegenüber Ionenfluss. Da dieser größtenteils passiv parazellulär über die Tight Junctions stattfindet, besteht eine gute Korrelation zur Integrität der Zellen. Die Chopstick Elektrode ist eine Doppelektrode und eignet sich zur Messung des TEERs im Transwellsystem, wobei die längere Elektrode in das basolaterale und die kürzere im apikalen Kompartiment platziert wird.

$$\text{TEER} = (R_{\text{Zellen}} - R_0) \times A \quad [\Omega \times \text{cm}^2]$$

Formel 4: TEER

R_{Zellen}
 R_0
 A

Widerstand über bewachsene PE-Membran
 Widerstand über unbewachsene PE-Membran
 Fläche der PE-Membran (1.13 cm²)

Die erste Messung erfolgte am Tag des Permeations- bzw. Aufnahme-Experimentes im Kultivierungsmedium, wobei die für diese Arbeit verwendeten Zellen TEER-Werte von über $200 \Omega \times \text{cm}^2$ aufwiesen. Zur Kontrolle, ob die Zellintegrität über die Versuchsdauer hinweg erhalten geblieben ist, wurden zusätzliche Messungen unmittelbar vor und nach einem Experiment durchgeführt. Um die Zellen in einem möglichst stressfreien Zustand zu erfassen, wurde die nächste Messung nach der 30-minütigen Vorinkubation erfasst. Dieser Wert wurde mit der finalen Messung abgeglichen, welche direkt nach einem Probenzug ausgeführt wurde. Die TEER-Messung erfolgte für jedes einzelne Experiment und der finale TEER-Wert betrug für alle durchgeführten Experimente mindestens 85 % des initialen Wertes (nach Vorinkubation).

Permeation von Fluorescein-Na

Weiterhin wurde für jeden Versuchsansatz eine Validierung mit dem parazellulär permeierenden Marker Fluorescein-Na durchgeführt. Hierzu wurde jeder Ansatz (API \pm Inhibitor) nach der 120-minütigen Inkubationszeit zweifach mit HBSS gespült, 30 min in HBSS vorinkubiert (Schüttelwasserbad, 37 °C, 67 rpm) und anschließend mit 100 μM Fluorescein-Na für 60 min inkubiert (AP). Probenzug erfolgte aus dem basolateralen Kompartiment (0,2 mL) und Quantifizierung wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie ausgeführt (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 525 nm). Die kalkulierten p_{app} betragen für alle Versuchsansätze $0,3 - 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$.

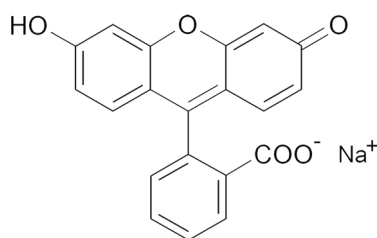


Abb. 20: Fluorescein-Na

Unter Versuchsbedingungen bei pH 7.4 liegt das Molekül deprotoniert vor und wird vorrangig transzellulär über Tight Junctions transportiert [116].

2.2.3 Präparation der Testlösungen

Die untersuchten APIs waren in einer Konzentration von 10 mM in DMSO vorhanden und wurden weiterhin zu 1 mM mit DMSO verdünnt, aliquotiert und als solche Stammlösung bei -30 °C bis zur weiteren Verwendung eingelagert. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, auf 10 mM mit DMSO verdünnt, aliquotiert und ebenfalls bei -30 °C gelagert. Testlösungen wurden am Tag des Experimentes durch Verdünnung mit HBSS hergestellt und enthielten **10 μM API**,

eine Endkonzentration von 1 % DMSO und bei Studien unter Inhibierung aktiver Transporter zusätzlich die entsprechenden Inhibitoren (siehe *Tab. 6*).

2.2.4 Permeationsstudien

Protokoll

Für Permeationsstudien wurden die in Transwells kultivierten Zellen jeweils in ein frisches Well umplatziert, zweifach mit HBSS gespült und anschließend für 30 min im Schüttelwasserbad vorinkubiert (37 °C, 67 spm). Bei Absorptionsstudien (AP→BL) wurde die Testlösung ins apikale und bei Sekretionsstudien (BL→AP) ins basolaterale Kompartiment aufgegeben (0,3 und 1,0 mL) und für 120 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Bei Studien unter Inhibierung aktiver Transporter waren die entsprechenden Inhibitoren bereits bei der Vorinkubation und während des Experimentes in allen Kompartimenten enthalten (siehe *Tab. 6*). Probenzug erfolgte unmittelbar nach der Probenaufgabe aus dem Donorkompartiment und nach Ablauf der Inkubationszeit aus dem Akzeptor- und Donorkompartiment (siehe *Tab. 7*). Diese Proben wurden mit internem Standard versehen (siehe *Tab. 9*) (nicht für Coffein, Rhodamin 123 und Hoechst 33342) und bis zur analytischen Aufarbeitung (siehe 2.4.1) bei -30 °C aufbewahrt.

Tab. 7: Probenzugsvolumina

		AP→BL	BL→AP
t = 0	Donor	0,2 mL	
t = end	Donor	0,2 mL	
t = end	Akzeptor	0,6 mL	0,2 mL

Kalkulationen

$$p_{app} = \frac{dc}{dt} \times \frac{V}{A \times c_0} \quad \left[\frac{\text{cm}}{\text{s}} \right]$$

Formel 5: apparenter Permeationskoeffizient

dc	permeierte Stoffkonzentration
dt	Permeationsdauer (Inkubationszeit)
V	Volumen des Akzeptorkompartiments (AP→BL = 1,0 mL; BL→AP = 0,3 mL)
A	Permeationsfläche (1,12 cm ²)
c ₀	Konzentration der Testlösung

$$ER = \frac{p_{app} (BL \rightarrow AP)}{p_{app} (AP \rightarrow BL)}$$

Formel 6: Effluxrate

p_{app} (BL→AP) p_{app} in sekretorischer Richtung
 p_{app} (AP→BL) p_{app} in absorptiver Richtung

$$Wf = \frac{C_{D(fin)} \times V_D + C_{A(fin)} \times V_A}{C_{D(0)} \times V_D} \times 100 \quad [\%]$$

Formel 7: Wiederfindungsrate

$C_{D(fin)}$ finale Konzentration im Donorkompartiment
 $C_{A(fin)}$ finale Konzentration im Akzeptorkompartiment
 $C_{D(0)}$ Startkonzentration im Donorkompartiment
 V_D Volumen Donorkompartiment
 V_A Volumen Akzeptorkompartiment

2.2.5 Aufnahmestudien

Protokoll

Im Anschluss an ein Permeationsexperiment wurde jeder Zellmonolayer dreifach mit 4 °C kaltem DPBS von oben und unten gespült (apikales und basolaterales Kompartiment). Daraufhin wurden die Inserts in frische Wells umplatziert. Die PE-Membran eines jeden Inserts wurde vorsichtig mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen zu lysieren wurde jeder Polyethylen-Membran 0,1 mL NaOH 0,1 N zugefügt und bei 2000 mots/min für 20 min auf dem Vortexmischer homogenisiert. Zur Neutralisierung auf pH 7 wurde 0,05 mL DPBS und 0,1 ± 0,01 µL HCl 0,1 N hinzugefügt und homogenisiert. Nach einem Probenzug zur Proteinbestimmung wurden die Proben zentrifugiert (9840 g, 5 min). 0,15 mL des Überstandes wurden mit internem Standard versehen (siehe *Tab. 9*) und bis zur Probenaufbereitung und Quantifizierung (2.4.2) bei -30 °C aufbewahrt.

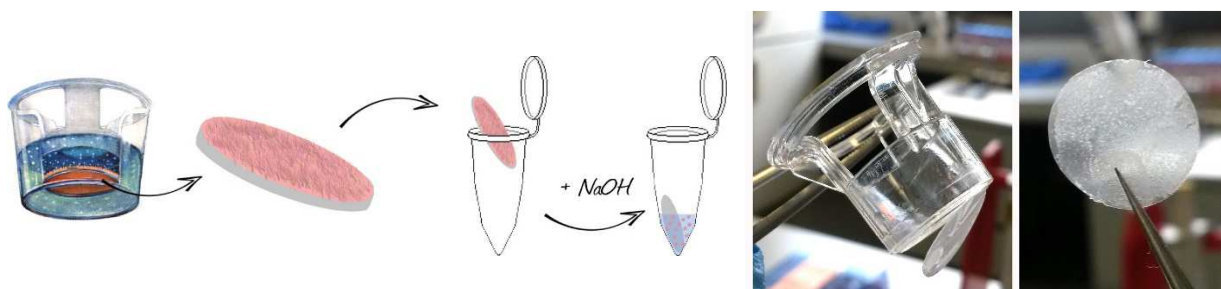


Abb. 21: Aufnahmestudien, Extraktion der bewachsenen Membran

Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), welches die Reduktion von Cu-Ionen durch Proteine unter Komplexbildung mit Bicinchoninsäure (BCA) ausnutzt (siehe *Abb. 22*). Hierbei wurden 25 µL der erhaltenen Proteinsuspension mit 0,2 mL Reagenz versetzt, welches sich aus (A) und (B) im Verhältnis 50+1 zusammensetzt (siehe *Tab. 8*) Unmittelbar nach der Zugabe des Reagenzes wurden die Proben für 60 s mittels BioTek SynergyHT Plate Reader homogenisiert (intensity: 4) und anschließend für 30 min im Schüttelwasserbad (37 °C, 67 spm) inkubiert. Die resultierende Färbung wurde UV/VIS-spektrometrisch bei 562 nm vermessen und die absoluten Proteinmengen mittels Standardkalibrierkurven aus BSA (25 – 2000 µg/mL) errechnet. Die Kalibrierungen wurden für jede Proteinquantifizierung mitbestimmt. Proteinbestimmung wurde für jede der aus 2.2.5 erhaltenen Proben als Zweifachbestimmung durchgeführt.

Tab. 8: Inhaltsstoffe des Pierce BCA Assay Kits

BCA Reagent A (50 Teile)	BCA Reagent B (1 Teil)
Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ , Bicinchoninsäure (BCA), Natriumtartrat (in 0,1 N NaOH)	4 % CuSO ₄

1. Biuret-Reaktion:

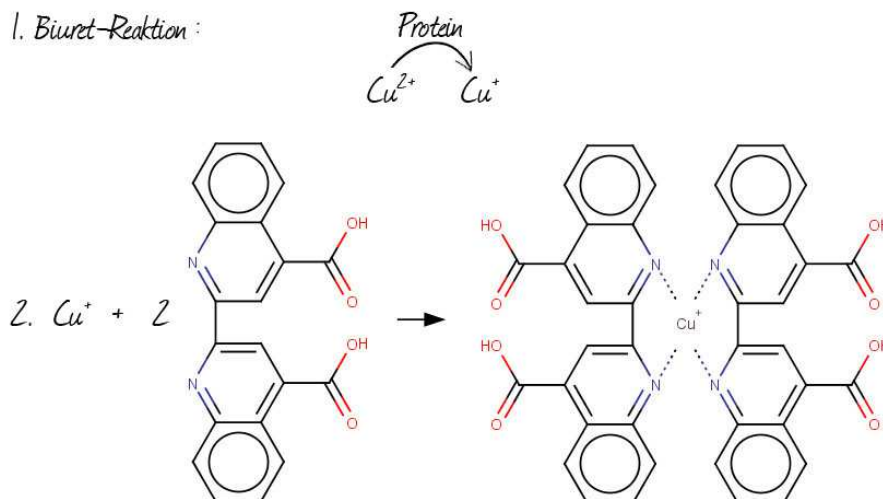


Abb. 22: BCA-Assay

1. Biuret Reaktion: In Probe enthaltene Proteine reduzieren im Reagenz enthaltenes Cu^{2+} zu Cu^+ .
2. Cu^+ reagiert mit 2 Molekülen BCA zu einem Farbkomplex, welcher bei 562 nm ein ausgeprägtes Maximum aufweist.

2.2.6 BCRP-Inhibierungs Assay

Prinzip

Hoechst 33342 ist eine Substanz, welche häufig zur Fluoreszenzmikroskopie als Zellkern-Farbstoff verwendet wird. Vor allem durch die Bindung an Adenin- und Thymin-reiche Sequenzen der DNA steigt die Fluoreszenzintensität [117] und kann mit der aufgenommenen Menge an Hoechst 33342 in Korrelation gesetzt werden [118]. Hoechst 33342 ist zudem ein BCRP-Substrat, weshalb die intrazelluläre Aufnahme des Farbstoffes durch BCRP-Inhibitoren gesteigert werden kann [119].

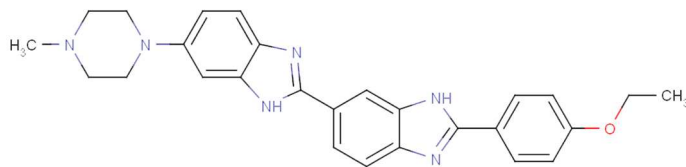


Abb. 23: Hoechst 33342

2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid

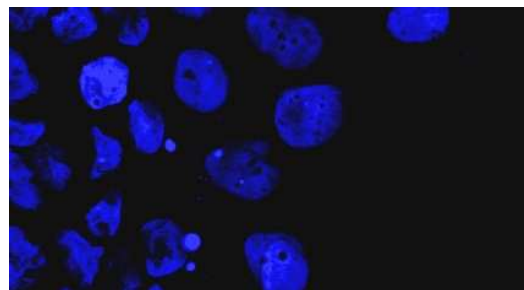


Abb. 24: Zellkernfärbung mit Hoechst 33342

(Caco-2/TC7 Zellen)

In dieser Arbeit wurde untersucht inwieweit die oben beschriebenen p38 α -MAPK-Inhibitoren den Efflux Transporter BCRP modulieren bzw. inhibieren können. Hierzu wurde die Aufnahme von Hoechst 33342 ohne weitere Zusätze mit der Aufnahme von Hoechst 33342 unter Einfluss von: a) des bekannten BCRP-Inhibitors Ko143 und b) von p38 α -MAPK-Inhibitoren untersucht. Da die Aufnahme von Hoechst 33342 durch BCRP-vermittelten Efflux limitiert wird, ist zu erwarten, dass die Aufnahme unter Einfluss von Ko143 steigt. Eine höhere Aufnahme unter Einfluss von p38 α -MAPK-Inhibitoren im Vergleich zur Aufnahme von Hoechst 33342 ohne weitere Zusätze würde demnach auf modulierende/inhibierende Effekte auf das BCRP deuten.

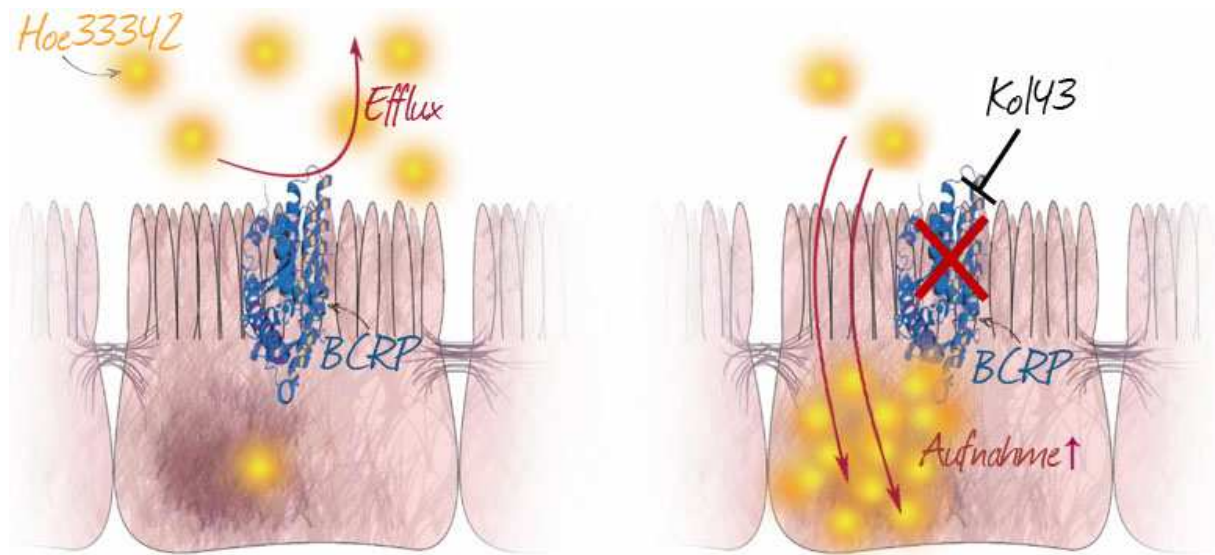


Abb. 25: Hoechst 33342 Aufnahme in Abhängigkeit von BCRP-vermitteltem Efflux

Protokoll

Die in 96-Well Platten (black, clear bottom) ausgesäten Zellen wurden zweifach mit DPBS gespült und anschließend für 30 min vorinkubiert (DPBS, Schüttelwasserbad bei 37 °C, 28 spm). Die Ansätze der Vorinkubation enthielten alle Bestandteile der späteren Testlösung außer Hoechst 33342. Anschließend wurde das Vorinkubationsmedium entfernt und die Testlösung dazugegeben, welche Hoechst 33342 10 µM ± Inhibitor/Modulator 10 µM in DPBS enthielt. Testlösungen wurden unmittelbar vor Versuchsstart aus den jeweiligen Stammlösungen angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurden die Zellen drei Mal mit HBSS gespült und anschließend wurde die Fluoreszenz direkt in den 96-Well Assay Platten gemessen (λ_{ex} 360 nm/ λ_{em} 528 nm). Um die variable Autofluoreszenz der unterschiedlichen Komponenten untereinander auszugleichen, wurde für jeden Versuchsansatz eine Negativgruppe an Zellen mitbestimmt, welchen alle Bestandteile der Testlösung außer Hoechst 33342 zugesetzt wurden. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte der Negativgruppe wurden von der Verumgruppe subtrahiert. Für jeden Versuchsansatz wurde ebenfalls eine Referenz mitbestimmt, welche keine weiteren Zusätze außer Hoechst 33342 10 µM enthielt. Die um die jeweiligen Negativkontrollen korrigierten Werte jedes Versuchsansatzes wurden auf die Werte der Referenz normiert, um interexperimentelle Schwankungen auszugleichen.

2.2.7 Adsorptionsstudien

Hintergrund

Bei den Permeationsstudien zu den p38 α -MAPK-Inhibitoren trat eine verringerte Wiederfindung im System auf (siehe 3.2.1), welche sich aus den Absolutmengen an API im Transportpuffer bezogen auf die initial eingesetzte Menge berechnet. Viele lipophile Wirkstoffe neigen zu unspezifischer Adsorption an Kunststoffoberflächen [120, 121]. Um zu klären, ob und in welchem Ausmaß unspezifische Adsorption am System ursächlich für die geringe Wiederfindung war, wurden Adsorptionsstudien durchgeführt.

Protokoll

Im Anschluss an ein Permeations- bzw. Aufnahmeexperiment wurde das Transwellsystem (Insert und Well) dreifach mit DPBS gespült. Anschließend wurde das Insert in ein frisches Well umgesetzt. Es wurden jeweils 1,0 mL Methanol jedem Well und Insert hinzugefügt und die Systeme wurden damit gespült. 0,8 mL der erhaltenen Spüllösung wurden über 12 h mittels Vakuumpumpe bis zur Trockene eingeeengt, um in 0,1 mL Methanol wiederaufgenommen zu werden. Diese Probe wurde zur Quantifizierung via HPLC verwendet.

Die Bestimmung der an der PE-Membran adsorbierenden Menge wurde an einem unbewachsenen System durchgeführt. Hierfür wurde das System (Insert + Well) für 2 h mit der entsprechenden Versuchslösung bei 37 °C und 67 rpm im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit DPBS von unten und oben (apikales und basolaterales Kompartiment) gespült. Jede PE-Membran wurde vorsichtig mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Weiterverarbeitung erfolgte analog dem unter 2.2.5 beschriebenen Protokoll.

2.3 Statistik

Alle beschriebenen Ergebnisse entsprechen den arithmetischen Mittelwerten \pm Standardabweichung, welche aus den Daten von mindestens drei unterschiedlichen Passagen ermittelt wurden. Ein Experiment einer Passage setzte sich aus mindestens drei zeitgleichen Versuchsansätzen (drei Transwells bzw. Wells) zusammen.

Die erhobenen Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Student-Newman-Keuls Test auf Signifikanz getestet (* $\alpha = 0,05$; (** $\alpha = 0,01$).

2.4 Analytik

2.4.1 Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung erfolgte analog den im Kapitel 3.1 beschriebenen, entwickelten Bedingungen. Hierzu wurden die bei -30 °C gelagerten, aus 2.2.4 und 2.2.5 erhaltenen Proben vor der Quantifizierung aufgereinigt und aufkonzentriert. Zum Entfernen des enthaltenen Wassers wurden die Proben zunächst gefriergetrocknet (0 – 12 h: -20 °C ; 12 – 24 h: von -20 auf 20 °C). Anschließend wurde jeder Probe 0,1 mL Methanol zugesetzt, welche für 30 min bei 3000 mots/min auf dem Vortexmischer homogenisiert wurden, um die enthaltenen Salze, Proteine und alle restlichen Zellbestandteile auszufällen. Die Proben wurden bei 9840 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Quantifizierung mittels HPLC verwendet.

2.4.2 Quantifizierung

Methoden

Die Quantifizierung der p38 α -MAPK-Inhibitoren, Furosemid und Coffein wurde mit einer LC 20AT HPLC-Anlage von Shimadzu durchgeführt. Es wurde eine Nucleosil 100-5 RP C18 Säule von Macherey-Nagel bei isokratischer Trennung verwendet. Die mobile Phase setzte sich aus Acetonitril und 10 mM KH_2PO_4 Puffer (pH 2.3) im Verhältnis 45+55 (V/V) zusammen (pH 8.0, 60+40 (V/V) für Skepinone-L) bei einer Flussrate von 1,0 mL/min. Die Detektionswellenlänge betrug 370 nm bzw. 275 nm für Coffein (siehe *Tab. 9* und *Diagramm 1*).

Die quantitative Bestimmung von Fluorescein-Na, Rhodamin 123 und Hoechst 33342 wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt (siehe *Tab. 10*).

Tab. 9: Quantifizierung via HPLC

Interne Standards siehe: [122], Inhib.-Cocktail = + Verapamil, + Ko143, + MK571

Analyt	Probenaufbereitung	Interner Standard	Detektion	ACN/Puffer	pH
Skepinone-L	✓	BB400	370 nm	60+40	8,0
FS089 (+ Inhib.-Cocktail)	✓	BB334	370 nm	45+55	2,3 8,0
FS100	✓	BB207 (+Verapamil: BB400)	370 nm	45+55	2,3
SK807	✓	BB400	370 nm	45+55	2,3
Furosemid	✓	BB400	370 nm	45+55	2,3
Coffein	–	–	275 nm	45+55	2,3

Tab. 10: Quantifizierung via Fluoreszenzspektroskopie

Analyt	λ_{ex}	λ_{em}	Sensitivität
Fluorescein-Na	485 nm	585 nm	35
Rhodamin 123	485 nm	585 nm	35
Hoechst 33342	360 nm	528 nm	75

Diagramm 1: HPLC-Chromatogramme

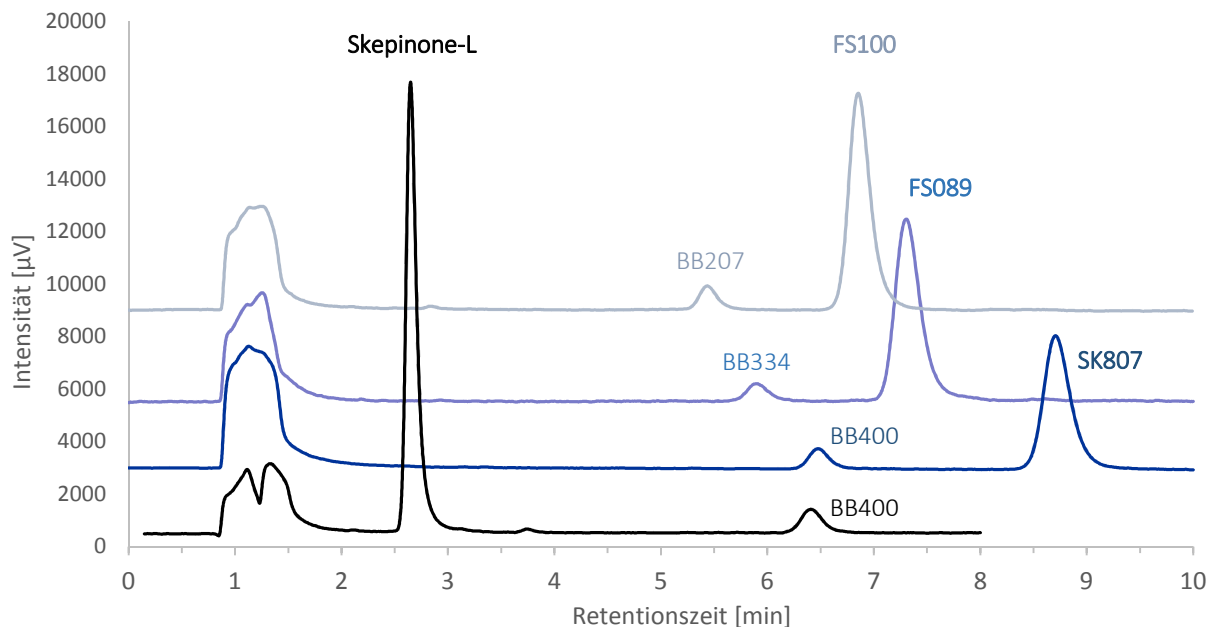
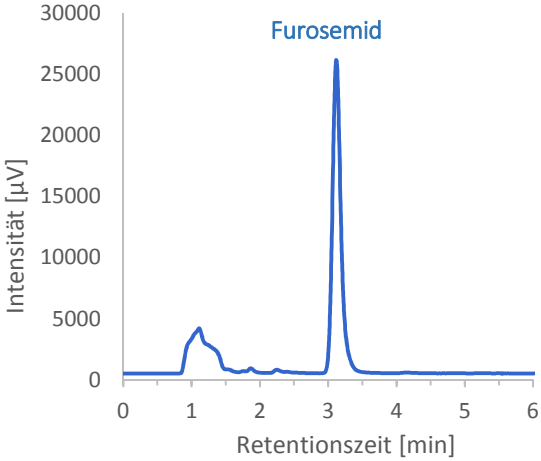
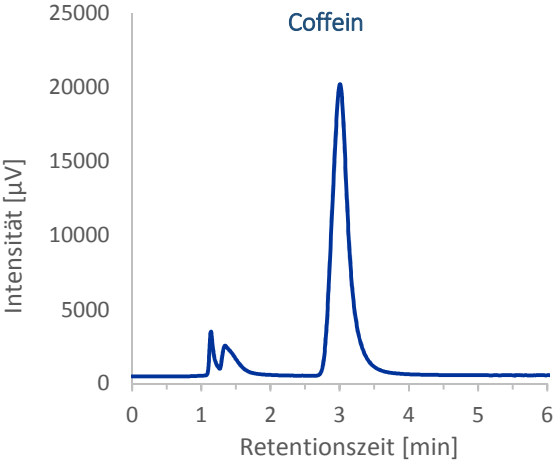
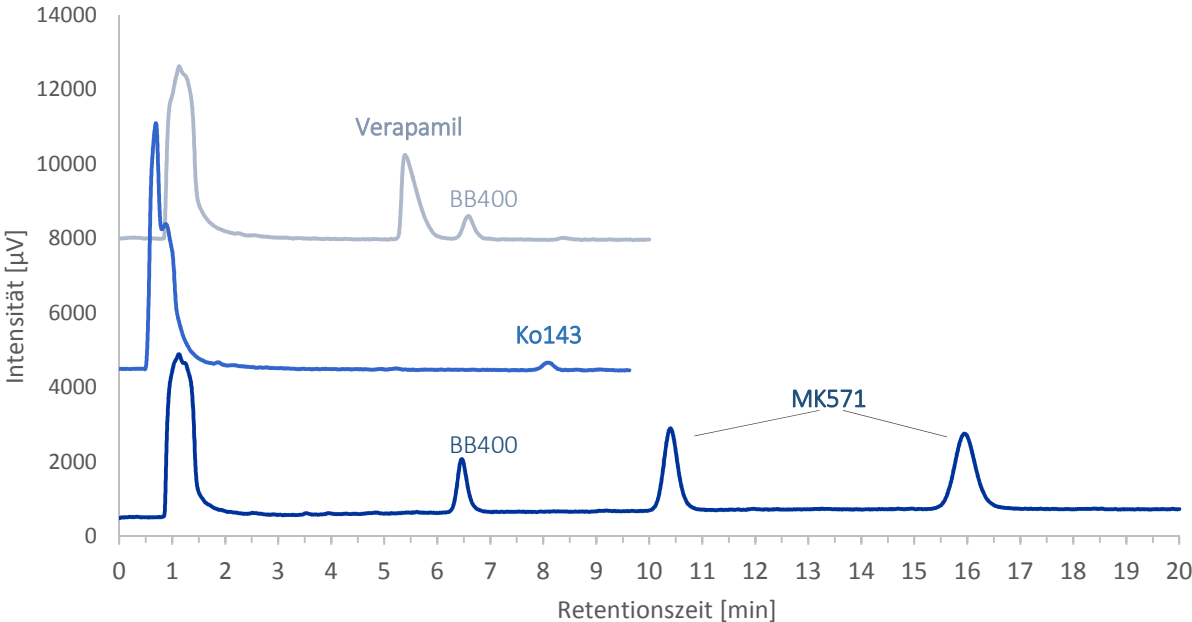


Diagramm 1: HPLC-Chromatogramme (Fortsetzung)



Kalibrierungen

Kalibrierungen wurden analog der ICH-Guideline Q2(R1) durchgeführt (siehe *Tab. 11* und *Tab. 12*).

Tab. 11: Kalibrierungen für Permeations und Aufnahmestudien

*Inhib.-Cocktail = + Verapamil, + Ko143, + MK571, AQ = Abweichungsquadratur, VA = Verfahrensabweichung DL = Detection Limit; QL = Quantitation Limit, * = Area A/iS, ** = Konz. A/iS / Area A/iS [A = Analyt, iS = interner Standard, Area = Peakfläche]*

Analyt	Bereich [μM]	R ²	y-Achsen- abschnitt *	Steigung **	Summe AQ	VA [%]	DL [μM]	QL [μM]
Skepinone-L	0,5 – 9	0,9973	-0,0078	0,5092	0,1452	3,27	0,49	1,48
FS089	0,5 – 10	0,9995	-0,0205	0,2917	0,0113	1,45	0,24	0,72
FS089 (+ Inhib.Cocktail)	0,5 – 9	0,9983	-0,0901	0,2951	0,0212	2,72	0,36	1,01
FS100 (iS BB207)	0,5 – 10	0,9983	-0,0444	0,4087	0,0557	2,66	0,45	1,35
FS100 (+ Verapamil / iS BB400)	0,5 – 9	0,9987	-0,0342	0,3080	0,0210	2,96	0,39	1,17
SK807	0,5 – 9	0,9966	-0,1115	0,4633	0,1160	3,81	0,52	1,55
Furosemid	0,01 – 7	0,9933	-0,4392	9,7552	8,1977	10,65	0,23	0,68
Analyt	Bereich [μM]	R ²	y-Achsen- abschnitt	Steigung	Summe AQ	VA [%]	DL [μM]	QL [μM]
Coffein	0,8 – 12	0,9987	38571,09	62346,07	686526898,1	2,28	0,52	1,57
Fluorescein	0,1 – 0,4 $\mu\text{g/mL}$	0,9982	63,2940	5589,82	10711,2	1,42	0,01	0,04
Rhodamin 123	0,01 – 10	0,9943	22,4725	1526,08	4392887,1	11,01	0,86	2,57
Hoechst 33343	0,04 – 10	0,9983	7,0560	117,4873	6859,5	4,43	0,44	1,32

Tab. 12: Kalibrierungen für Adsorptionsstudien

AQ = Abweichungsquadratur, VA = Verfahrensabweichung DL = Detection Limit; QL = Quantitation Limit

Analyt	Bereich [μM]	R ²	y-Achsen- abschnitt	Steigung	Summe AQ	VA [%]	DL [μM]	QL [μM]
Skepinone-L	0,5 – 5	0,9989	-981,93	10309,85	5618085,6	2,05	0,17	0,52
FS089	0,5 – 5	0,9992	-497,41	9890,38	4850388,3	1,55	0,14	0,42
FS100	0,5 – 5	0,9994	340,23	11443,13	4528127,6	1,30	0,12	0,35
SK807	0,5 – 5	0,9982	-1593,95	38559,81	39358195,0	2,50	0,20	0,61
Rhodamin 123	0,01 – 10	0,9998	1,8907	1302,14	331722,2	8,46	0,33	1,01

2.5 Verwendete Reagenzien und Geräte

2.5.1 Reagenzien und Chemikalien

Tab. 13: Reagenzien und Chemikalien für die Zellkultur

Life technologies/GIBCO, Invitrogen™	Aminoacids solution, non-essential (MEM NEAA)
	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose, GlutaMAX
	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ++/-- Ca, Mg
	Fetales Kälberserum (FKS)
	Gentamicin 50 mg/mL
	Recovery Cell Culture Freezing Medium
	Trypsin-EDTA 0,25 %

Tab. 14: Reagenzien und Chemikalien für Experimente

Caelo, Caesar & Lorentz GmbH	Coffein
Carl Roth GmbH	Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V
Cayman Chemical Company	MK571
Life technologies/GIBCO, Invitrogen™	Hoechst 33342, Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) 10x, Alexa Fluor 488 Phalloidin, ProLong Gold Antifade Reagent
Pharmazeutisches Institut, Eberhard-Karls Universität Tübingen	Skepinone-L, FS089, FS100, SK807
Roche Diagnostics GmbH	WST-1 Cell Proliferation Reagent
Sigma Aldrich GmbH	Fluorescein-Na, Verapamil HCl, HEPES, Rhodamin 123 HCl
Thermo-Fisher Scientific GmbH	Acetonitril und Methanol HPLC-grade, Pierce™ BCA Assay Kit, Propidium Iodid
Tocris Bioscience	Ko143

2.5.2 Materialien

Tab. 15: Materialien für die Zellkultur

Corning Life Sciences	Zellkulturflaschen Cellbind 25 cm ²
	Costar 12 Well Zellkulturplatten
	Transwellplatten PE, 12-Well, 12 mm, 0.4 µm
	Assay Platten 96 Well, schwarz mit klarem Boden
Eppendorf GmbH	Eppendorf Research Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000, 1500, 5000 µL
	Mehrkanalpipette, 300 µL
	Pipettenspitzen 10, 200, 300, 1000, 1500, 5000 µL
	Tip-Tub Reagenzreservoir 50-60 mL, autoklavierbar
Greiner Bio-One	Cellstar Zellkulturflaschen 75 cm ²
	Kryoröhrchen 1.8 mL
	Cellstar Tubes Reaktionsgefäße PP 15/50 mL, steril
	Messpipetten 10/25 mL, steril
	Cellstar Gewebekultur Mikroplatten 96 Well, PS
	UV-Star Mikroplatten UV 96 Well
	Fluoreszenz Mikroplatten 96 Well, PP, schwarz
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Pipettierhilfe pipetus-akku
Menzel Gläser GmbH	Deckgläser (18 x 18 mm)
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0.1 mm, gemäß DIN 12874)
VWR International	Mikro-Zentrifugen Tubes 1.5/2.0 mL

2.5.3 Geräte

Tab. 16: verwendete Geräte

Air Liquide Deutschland	Stickstoff-Lagerbehälter GT 38 Air
BioTek Instruments	Plate Reader BioTek SynergyHT, Software KC4 V3.4
Carl Zeiss AG	Inverses Mikroskop Axiovert 25
Eppendorf GmbH	Zentrifuge MiniSpin
Finn-Aqua/GEA Pharma Systems	Gefriertrockner
GFL Gesellschaft für Labortechnik	Schüttelwasserbad 1083
Heraeus/Kendro Laboratory Products	Sicherheitswerkbank HERA safe, Klasse 2, Typ H
Heraeus/Thermo Scientific	Zentrifuge Megafuge 1.0 R, Fabr.Nr. 246565
IKA-Werke GmbH & Co. KG	VXR basic Vibrax
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	HPLC-Säulen Nucleosil 100-5
Mettler-Toledo GmbH	S 20 SevenEasy pH-Meter
	Waage Mettler AE 200 und XP205 Delta Range
Millipore GmbH	Umkehrosiose-Anlage Hemo-RO
Shimadzu Europa GmbH	HPLC-UV Anlage LC 20AT, Pumpe LC10-AS, Autosampler
	SIL-9A, UV-Vis Dedector SPD-6A
World Precision Instruments Inc.	EVOM Chopstick-Voltohmmeter
WTB Binder Labortechnik	CO ₂ Brutschrank, Typ 4515015018000310

3 Experimenteller Teil

3.1 Entwicklung einer Methode zur Probenaufreinigung und -konzentrierung

Die untersuchten Testverbindungen wurden aufgrund von geringer Löslichkeit im Transportpuffer (siehe 6.1 *Löslichkeit der Morpholinoethoxy-Derivate*) und zum Zweck der Verhinderung einer Transporterabsättigung in einer geringen Konzentration eingesetzt (10 μM). Zudem wurde aufgrund vorangegangener Voruntersuchungen eine geringe Permeabilität erwartet, welche bei Transportstudien an Caco-2/TC7 Zellen in niedrigen Endkonzentrationen in den Akzeptorkompartimenten resultierte. Weiterhin enthielten die aus Permeationsstudien gewonnenen Proben neben den Analyten auch Pufferbestandteilen (siehe Tab. 5), Proteine und weitere Zellbestandteile. Um eine robuste und zuverlässige Quantifizierung mittels HPLC zu ermöglichen, sollten diese Proben daher aufgereinigt und aufkonzentriert werden. Hierzu wurden die Proben gefriergetrocknet, um das enthaltene Wasser zu entfernen. Im Anschluss wurde der Rückstand in einem geringeren Volumen an organischen Lösungsmittel rekonstituiert, wobei gleichzeitig eine Aufreinigung durch Ausfällen der Proteinbestandteile und Aufkonzentrierung stattfand. Einzelne Einflussparameter auf den Aufreinigungsprozess wurden systematisch untersucht und werden im Folgenden näher erläutert.

3.1.1 Versuchsbedingungen

Die Entwicklung der Methode erfolgte exemplarisch an dem schlecht wasserlöslichen und lipophilen Wirkstoff Furosemid und SK807. Die verwendeten Testlösungen enthielten 10 μM API in HBSS und 1 % DMSO, um den Eigenschaften der für Permeationsstudien verwendeten Testlösungen zu entsprechen. Caco-2/TC7 Monolayer wurden wie unter 2.1 und 2.2.4 beschrieben kultiviert und vorbereitet und anschließend für 120 min mit der erhaltenen Testlösung inkubiert. Anschließend wurden Proben (0,2 bzw. 0,6 mL) aus dem basolateralen Kompartiment entnommen, bis zur weiteren Verwendung bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und nachfolgend gefriergetrocknet (0 – 12 h: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; 12 – 24 h: von -20 auf $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der Rückstand wurde in 100 μL Methanol oder Acetonitril mittels Vortexmischer resuspendiert, um den Analyten zu lösen. Der feste Rückstand wurde durch Zentrifugieren abgetrennt (9840 g, 5 min) und der Überstand für die Quantifizierung mittels HPLC verwendet (siehe 2.4.2 *Quantifizierung*).

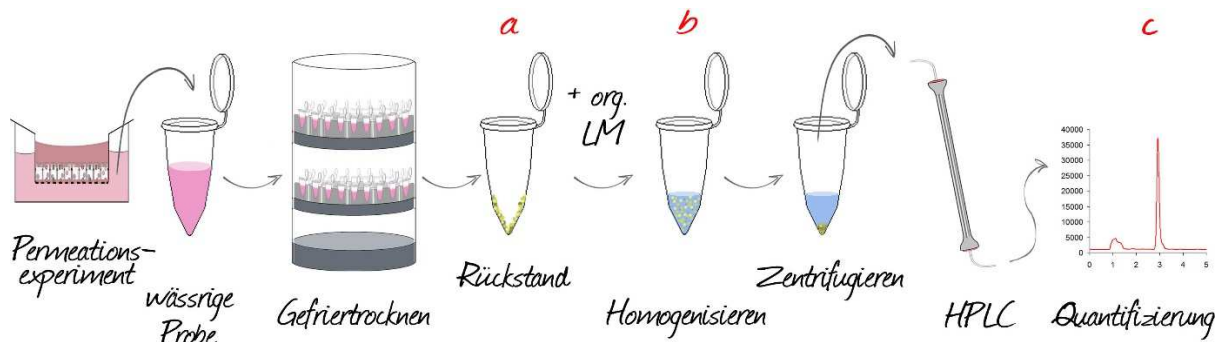


Abb. 26: Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsbedingungen

Untersuchte Schritte der Aufbereitung: **a:** Habitus des Rückstandes, **b:** Homogenisierereffektivität des org. LM, **c:** Massenbilanz nach der Extraktion. org. LM = organisches Lösungsmittel

3.1.2 Einfluss des Lösungsmittels

Durch Gefriertrocknen entstanden formstabile Rückstände (vgl. Abb. 26 a), welche ihre mechanische Integrität nach Acetonitril-Zugabe auch weiterhin beibehielten (siehe Abb. 27). Eine effektive Homogenisierung konnte durch den Einsatz von Methanol bewerkstelligt werden. Nach Abzentrifugation der festen Rückstände, wurde bei den Methanol-haltigen Proben ein klarer Überstand erhalten, während die Acetonitril-haltigen Proben weiterhin größere, formstabile Rückstände am Gefäßrand enthielten, was die Entnahme eines klaren Überstandes nur erschwert möglich machte.

Aufgrund der schlechteren Eignung von Acetonitril zur Homogenisierung der aus Gefriertrocknung erhaltenen Proben wurde im Folgenden Methanol für diesen Zweck eingesetzt.

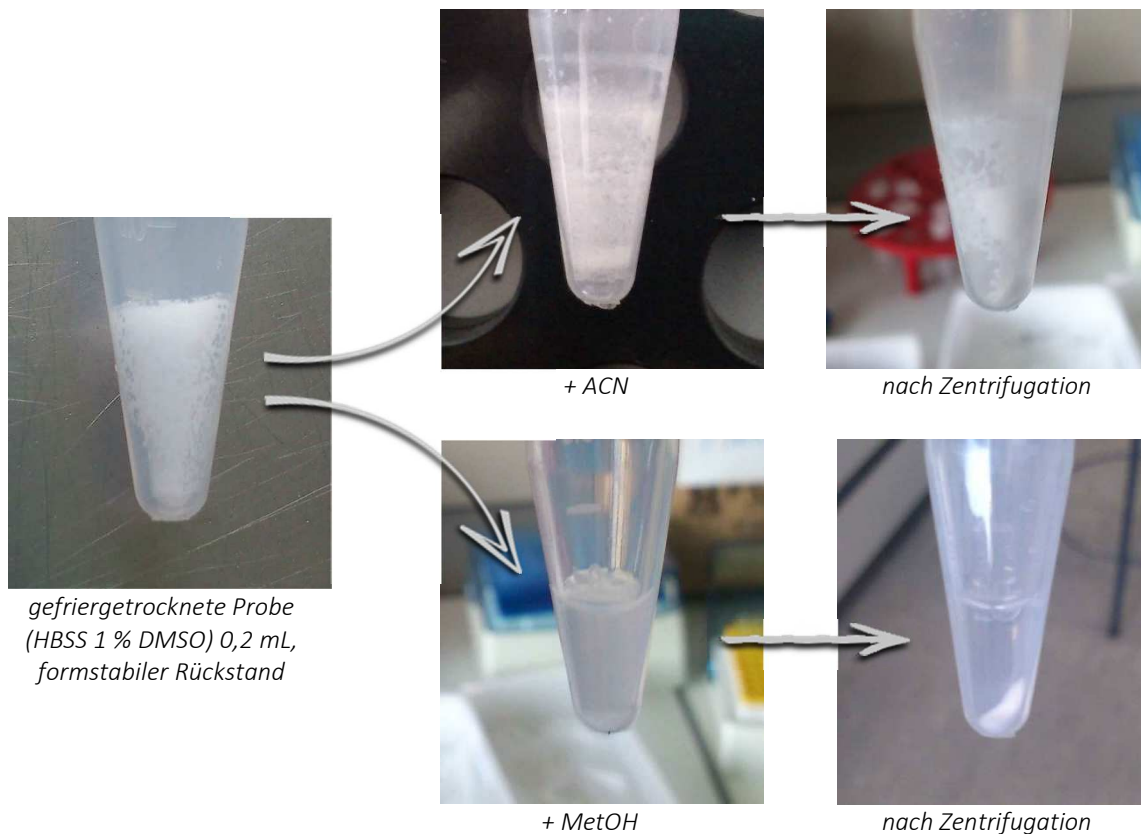
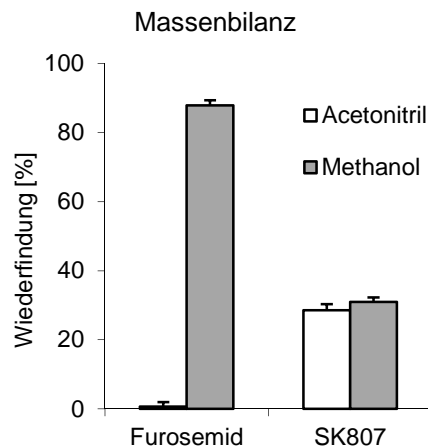


Abb. 27: Resuspendierung in Acetonitril (ACN) und Methanol (MetOH)

3.1.3 Massenbilanz

Um die Effektivität des Extraktionsschrittes zu beurteilen (vgl. *Abb. 26 b*), wurde der im organischen Lösungsmittel gelöste Anteil an Analyt bezogen auf die initial eingesetzte Menge bestimmt. Die Gesamtwiederfindung für Furosemid betrug 88 % bei Methanol als Lösemittel und lediglich 1 % bei Einsatz von Acetonitril (*Diagramm 2*), was einerseits durch die schlechtere Homogenisierung und Benetzung des Rückstandes verursacht sein könnte (siehe 3.1.2) oder durch die bessere Löslichkeit von Furosemid in Methanol bedingt sein könnte. Die Wiederfindung von SK807 in Acetonitril und Methanol unterschied sich nicht, war jedoch mit 31 % in Methanol bzw. 29 % in Acetonitril insgesamt geringer als die Wiederfindung von Furosemid in Methanol.

Diagramm 2: Massenbilanz in Abhängigkeit vom Lösungsmittel



Die auftretenden Verluste während des Aufreinigungsprozesses erforderten die Verwendung interner Standards. Hierzu wurden im Folgenden die jeweiligen Dibenzooxepinderivate als strukturähnliche Verbindungen für die Dibenzosuberone verwendet (siehe *Tab. 9*).

3.1.4 Effektivität der Konzentrierung

Die Effektivität der Konzentrierung (vgl. *Abb. 26 c*) wurde mittels quantitativer Bestimmung untersucht. Hierzu wurden Furosemid- und SK807-haltige Testlösungen (0,2 mL, 10 μ M, 1 % DMSO in HBSS) ohne weitere Aufbereitung durch Direktinjektion quantifiziert beziehungsweise wie oben beschrieben aufgereinigt und erst anschließend quantifiziert, wobei jeweils 10 μ L injiziert wurden. Durch die Anwendung der oben beschriebenen Methode konnte die Peakfläche bei Furosemid um den Faktor 7,8 und bei SK807 um den Faktor 4,6 erhöht werden (vgl. *Diagramm 3* und *Diagramm 4*).

Diagramm 3: Peakflächen nach Direktinjektion und nach Aufreinigung

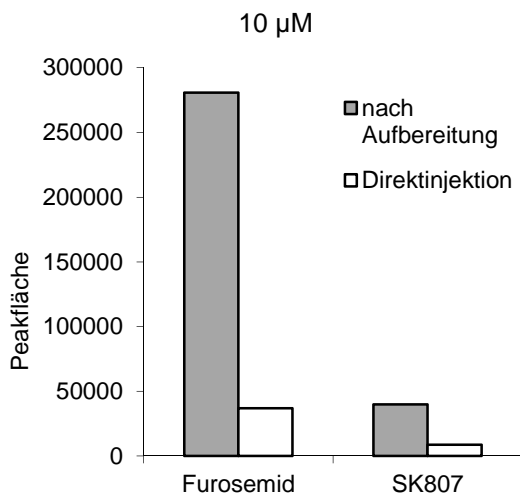
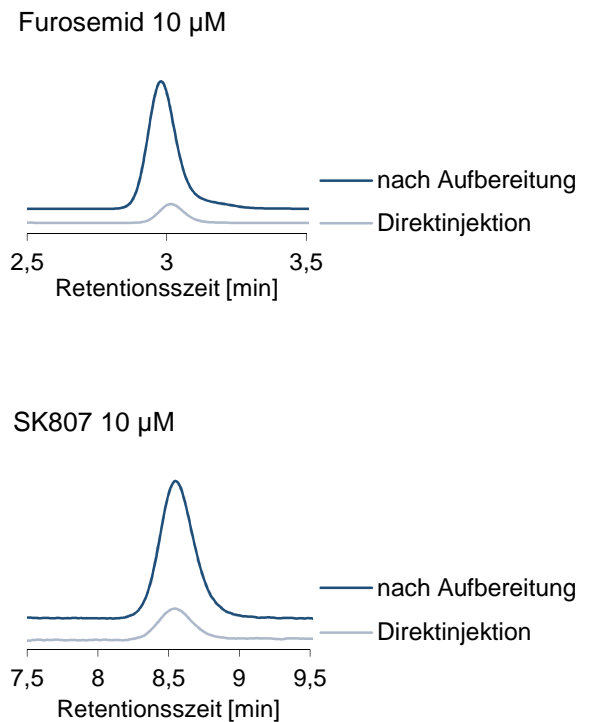


Diagramm 4: Chromatogramme nach Direktinjektion und nach Aufreinigung

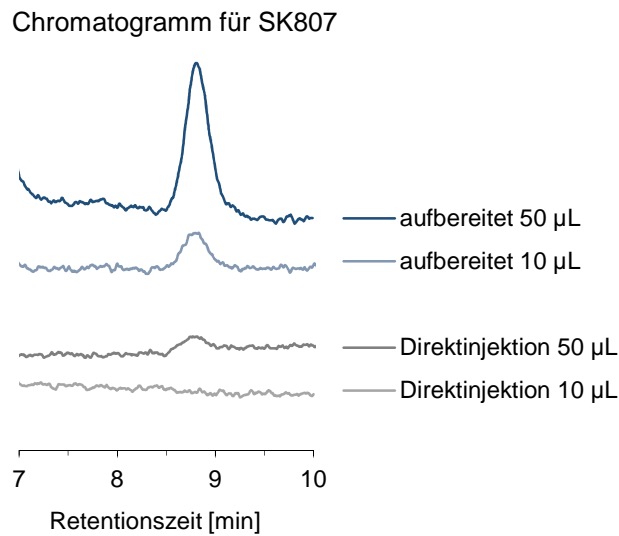


3.1.5 Eignung der Methode für Proben aus Permeationsstudien

Die Eignung der oben beschriebenen Aufreinigungsmethode wurde für Proben getestet, welche aus Permeationsstudien gewonnen wurden. Hierzu wurden Caco-2/TC7 Monolayer wie unter 2.1 und 2.2.4 beschrieben kultiviert und vorbereitet. Anschließend wurde die Testlösung mit SK807 10 µM, 1 % DMSO in das apikale Kompartiment gegeben und für 120 min inkubiert. Proben wurden aus dem basolateralen Kompartiment gezogen, in dem aufgrund stärkster Verdünnung die geringste, mögliche Konzentration erwartet wurde. Die Proben wurden entweder durch Direktinjektion quantifiziert oder vor der Quantifizierung durch die oben beschriebene Methode aufgereinigt, wobei ein Probenvolumen von 0,6 mL verwendet wurde.

Bei gleicher Ausgangskonzentration der Proben konnte eine deutliche Signalverstärkung nach Aufreinigung und Konzentrierung erreicht werden (*Diagramm 5*). Dies ermöglichte eine zuverlässige und robuste Quantifizierung. Die detaillierte Methodenbeschreibung wurde nochmals unter 2.4.1 *Probenaufbereitung* zusammengefasst.

Diagramm 5: Chromatogramm für Proben aus Permeationsstudien



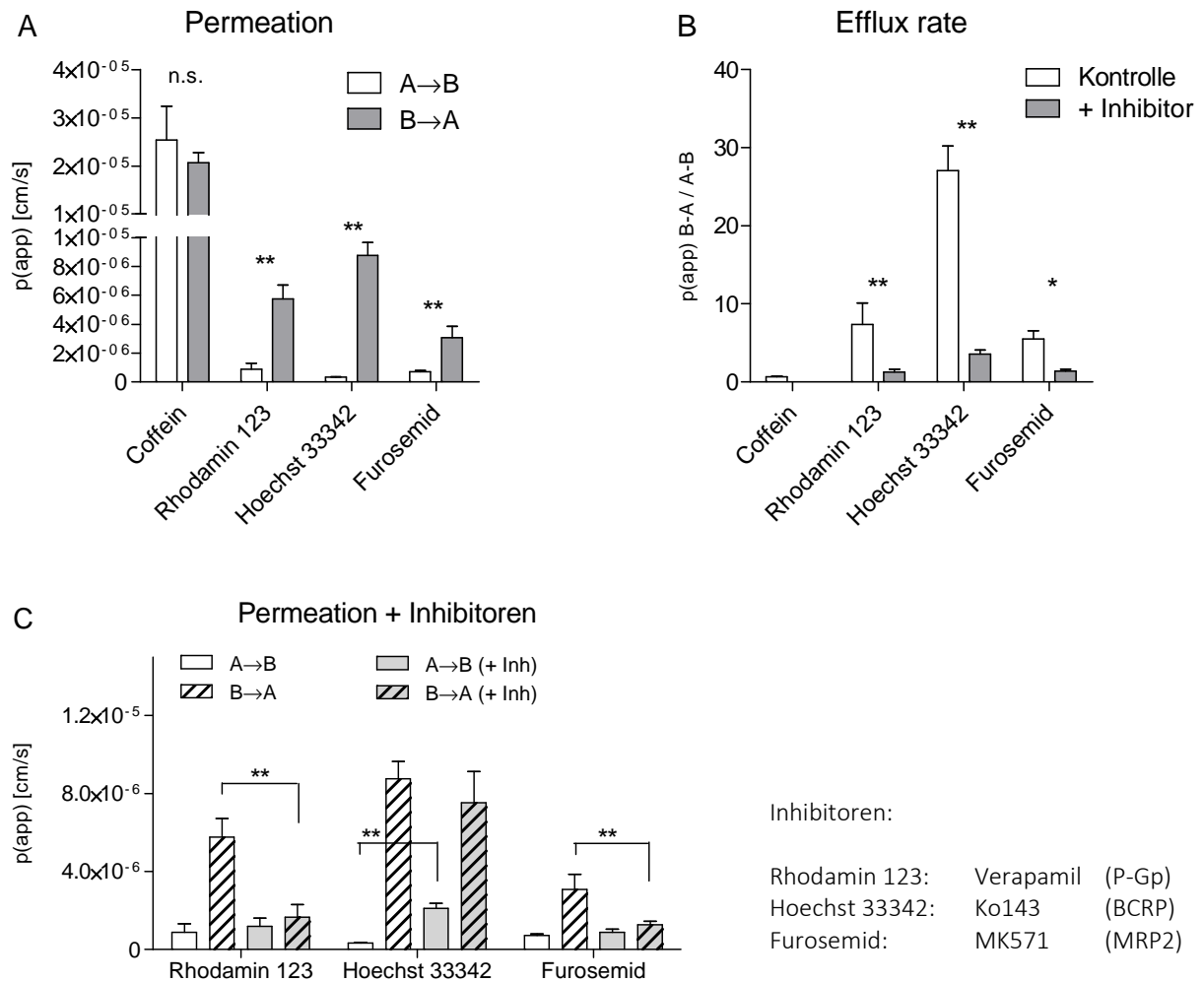
3.2 Permeationsstudien

3.2.1 Permeationsverhalten von Referenzsubstanzen

Zur Charakterisierung der verwendeten Zelllinie wurden Permeabilitäten von Referenzverbindungen untersucht. Referenzversuche beinhalteten die Permeation von Coffein (transzellulärer Marker), Rhodamin 123 (P-Gp-Substrat), Hoechst 33342 (BCRP-Substrat) und Furosemid (MRP2-Substrat) (*Diagramm 6 A-C*).

Die Permeabilität von Coffein lag mit $25,4 \times 10^{-6}$ cm/s im hohen Bereich und entsprach somit den Anforderungen für Substanzen der BCS Klasse I [99]. Die Permeabilitäten der getesteten Efflux-Substrate lagen im niedrigen Bereich ($0,3 - 0,9 \times 10^{-6}$ cm/s) und wiesen alle einen unsymmetrischen Transport auf ($B \rightarrow A \gg A \rightarrow B$). Die Effluxraten der Efflux-Substrate ließen sich durch Einsatz der entsprechenden Inhibitoren (siehe *Tab. 6*) signifikant reduzieren. Während beim P-Gp-Substrat Rhodamin 123 und dem MRP2-Substrat Furosemid eine Senkung der Effluxrate durch Herabsetzen der Sekretion erreicht wurde, trat der Effekt beim BCRP-Substrat Hoechst 33342 durch eine Erhöhung der absorptiven Permeabilität auf (*Diagramm 6 C*).

Diagramm 6: Permeation von Referenzverbindungen
n = 3-5; 3; 3-5 (A; B; C)



Dies zeigt, dass die verwendete Zelllinie a) eine ausreichende transzelluläre Permeabilität aufweist, b) die drei ABC-Proteine P-Gp, BCRP und MRP2 in ausreichendem Ausmaß exprimiert werden und c) die aktiven Transporter durch Einsatz der spezifischen Inhibitoren funktional inhibiert werden können, was in einer signifikanten Effluxreduktion ihrer Substrate resultiert. Durch die Erfüllung dieser Voraussetzungen kann die Zelllinie für Permeabilitätsuntersuchungen im besonderen Hinblick auf aktive Transporter herangezogen werden.

3.2.2 Permeation von p38α-MAPK-Inhibitoren

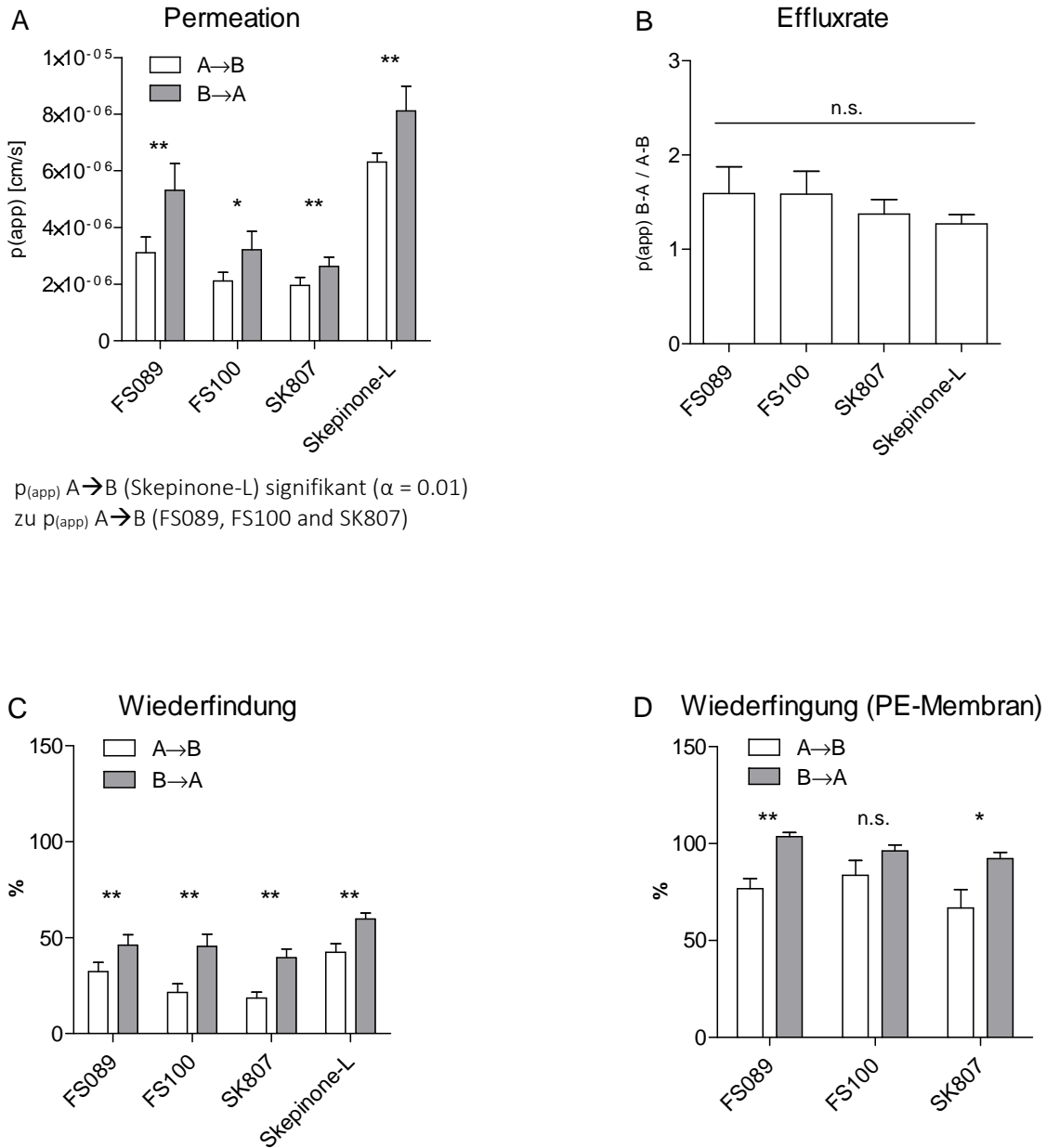
Zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit *in vivo* wurde die Permeabilität der p38α-MARP Inhibitoren Skepinone-L, FS089, FS100 und SK807 in Caco-2/TC7 Zellen bestimmt.

Die Permeabilität der Morpholinoethoxy-Konformationsisomere FS089, FS100 und SK807 lag in einem niedrigen und engen Bereich ($2,1 - 3,1 \times 10^{-6}$ cm/s) (*Diagramm 7 A*). Signifikant höher war die Permeabilität vom hydrophileren Derivat Skepinone-L mit 6×10^{-6} cm/s ($\alpha = 0,01$). Gleichzeitig unterlagen alle untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren einem unsymmetrischen Transport ($B \rightarrow A > A \rightarrow B$), was in Effluxraten von 1,3 – 1,6 resultierte (*Diagramm 7 B*) (geringster Wert für Skepinone-L). Insbesondere bei den Morpholinoethoxy-Regioisomeren war eine in absorptiver Richtung stark erniedrigte Wiederfindung zu beobachten (19 – 32 %), während diese bei Skepinone-L mit 42 % insgesamt höher lag (*Diagramm 7 C*). Als Kontrolle wurde die Wiederfindung am System ohne Zellen (unbewachsene PE-Membran) für die Verbindungen mit der geringsten Wiederfindung bestimmt (FS089, FS100 und SK807). Diese wies zwar teilweise auch eine Asymmetrie auf ($B \rightarrow A > A \rightarrow B$, für FS100 und SK807 signifikant), war jedoch mit 67 – 83 % in absorptiver Richtung deutlich höher als im System mit Zellen (*Diagramm 7 D*).

Die geringe Permeabilität der Morpholinoethoxy-Regioisomere FS089, FS100 und SK807 zusammen mit der erhöhten Effluxrate sind Hinweise auf einen bidirektionalen Transport durch Effluxtransporter. Interessant ist, dass der Austausch des Dihydroxypropoxy- durch den Morpholinoethoxy-Rest (Skepinone-L vs. Regioisomere) eine signifikante Verringerung der Permeabilität bewirkt. Die Regioisomere unterscheiden sich chemisch von Skepinone-L neben dem log P-Wert zusätzlich durch deren Ionisierbarkeit. Die untersuchten Dibenzosuberone-Derivate stellen durch den Morpholin-Stickstoff schwache Basen mit einem pK_s von 5,76 dar. Im Transportpuffer liegen sie daher weitestgehend undissoziiert vor, während im Intrazellularraum der Caco-2 Zellen eine Protonierung möglich ist. Die ionisierten Verbindungen wären dann am Passieren der basolateralen Membran gehindert, was eine intrazelluläre Akkumulation bewirken und die geringere Permeationsrate im Vergleich zum Skepinone-L erklären würde. Einen weiteren Hinweis auf diese Theorie bietet die geringe Wiederfindung; insbesondere bei den Regioisomeren und insbesondere in absorptiver Richtung. Da diese geringe Wiederfindung nur in Anwesenheit des Zellmonolayers zu beobachten ist (vgl. *Diagramm 7 C* und *D*), liegt die Vermutung nahe, dass die Verbindungen im Monolayer verbleiben, weshalb sie nicht mehr im Transportpuffer zur Kalkulation der Wiederfindung zur Verfügung stehen. Da allerdings auch im System ohne Zellen eine herabgesetzte Wiederfindung resultierte (vgl. *Diagramm 7 D*: 67 – 78 % $A \rightarrow B$), kann eine

intrazelluläre Akkumulierung nicht der einzige Grund sein, weswegen das Adsorptionsverhalten der Verbindungen unter 3.3.2 näher untersucht wurde.

Diagramm 7: Permeation von p38a-MAPK-Inhibitoren
n = 6-9; 6-9; 5-11, 3 (A; B; C; D)

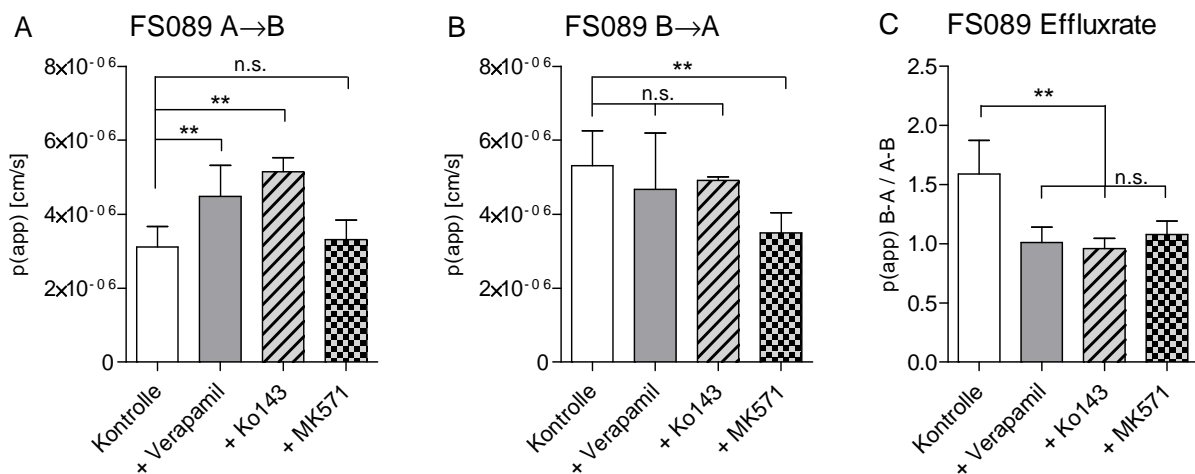


3.2.3 Inhibitionsstudien

Der Einsatz spezifischer Inhibitoren von P-Gp, BCRP und MRP2 sollte Aufklärung über die Affinitäten der untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren zu diesen Effluxtransportern geben.

Die Inhibierung aktiver Transporter resultierte bei den Morpholinoethoxy-Regioisomeren in signifikanten Verbesserungen des Permeationsvermögens (siehe *Diagramm 8*, *Diagramm 9* und *Diagramm 10*). Bei FS089 konnte die Effluxrate durch Inhibierung von P-Gp, BCRP oder MRP2 signifikant reduziert werden, was im Fall von P-Gp und BCRP durch Erhöhung der absorptiven Permeabilität und bei MRP2 durch die Senkung der Sekretion erreicht wurde (*Diagramm 8 A-C*). Quantitativ am stärksten ausgeprägt war der Effekt bei Inhibierung des BCRPs zu beobachten ($p_{app} (A \rightarrow B) 3,1 \rightarrow 5,1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; ER $1,6 \rightarrow 0,96$).

Diagramm 8: FS089. Inhibitionsstudien; Permeation und Effluxrate
 $n = 3-9; 3-7; 3-7 (A; B; C)$



Bei FS100 trat kein Effekt auf die Sekretion auf, jedoch war die absorptive Permeabilität in Anwesenheit der jeweiligen Inhibitoren signifikant erhöht, was zur Senkung der Effluxrate beitrug (*Diagramm 9*). Ebenso wie bei FS089 trat dieser Effekt auch bei FS100 am stärksten bei Inhibierung von BCRP auf ($p_{app} (A \rightarrow B) 2,1 \rightarrow 4,2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; ER $1,6 \rightarrow 0,79$). Bei SK807 konnte eine signifikante Senkung der Effluxrate durch Erhöhung der absorptiven Permeabilität beobachtet werden (*Diagramm 10*), jedoch waren die Unterschiede zwischen den Transportern nicht signifikant. Skepinone-L dagegen zeigte keinen Effekt – die Permeabilitäten und Effluxraten blieben bei Inhibierung der aktiven Transporter P-Gp, BCRP und MRP2 unverändert (*Diagramm 11*).

Diagramm 9: FS100. Inhibitionsstudien; Permeation und Effluxrate
n = 3-11; 3-9; 3-9 (A; B; C)

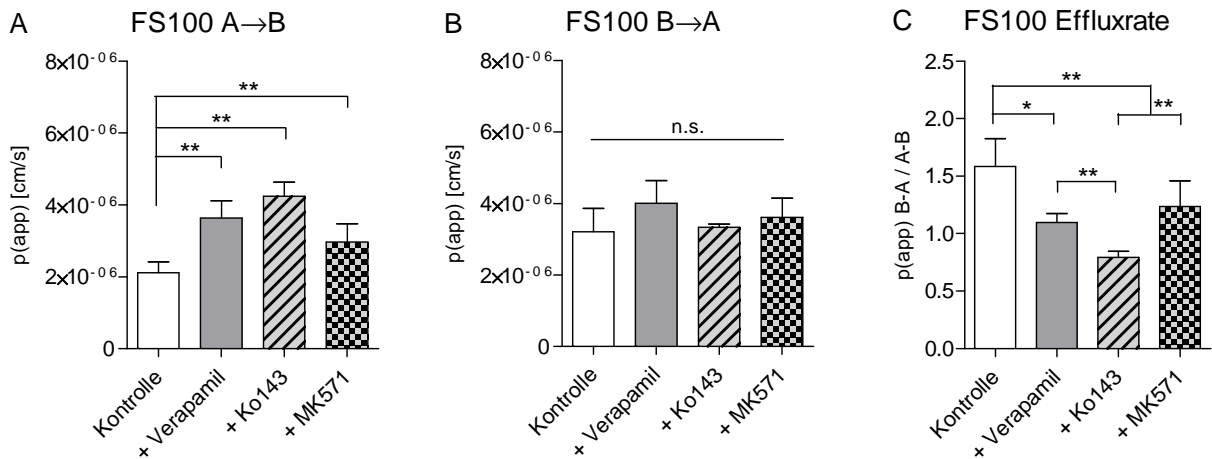


Diagramm 10: SK807. Inhibitionsstudien; Permeation und Effluxrate
n = 3-8; 3-7; 3-7 (A; B; C)

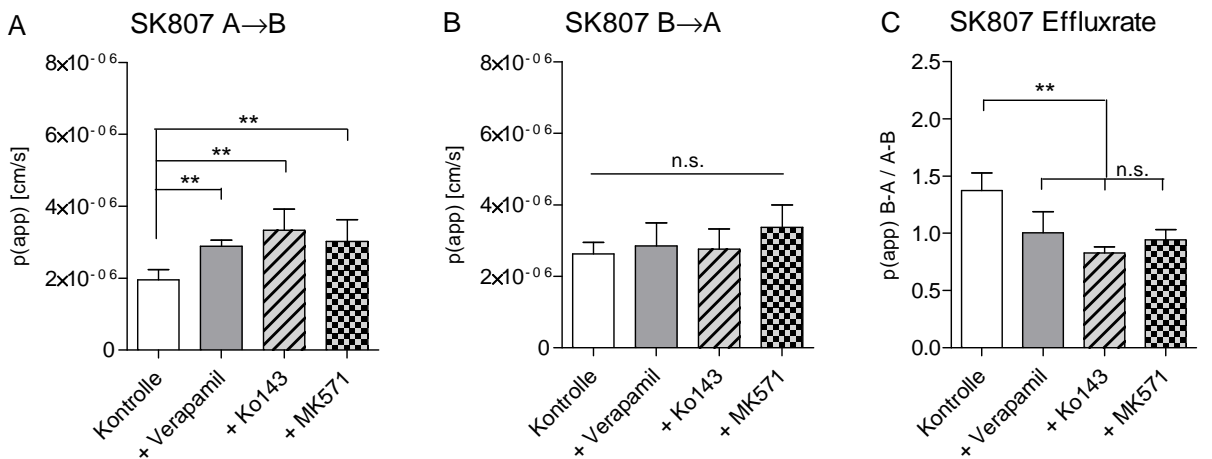
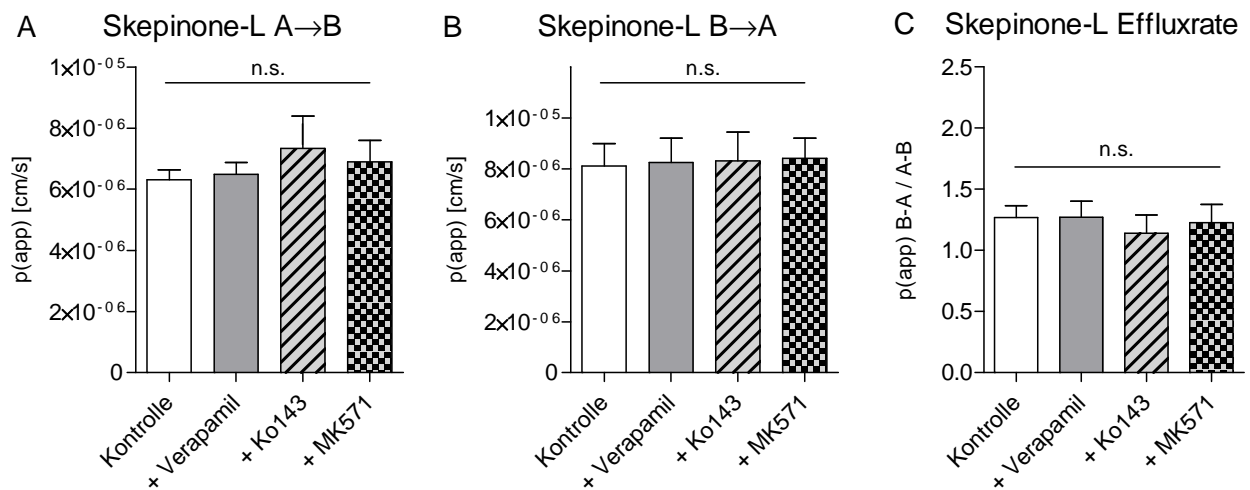


Diagramm 11: Skepinone-L. Inhibitionsstudien; Permeation und Effluxrate
n = 6-7; 6-7; 6 (A; B; C)



Die Morpholinoethoxy-Regioisomere FS089, FS100 und SK807, welche sich lediglich in der Positionierung einer Seitenkette unterscheiden, unterlagen unterschiedlich stark ausgeprägtem Transport durch die ABC-Proteine P-Gp, BCRP und MRP2. SK807, welches als einziges unter den drei Verbindungen noch eine gute Aktivität zur p38 α -MAPK im Vollblutassay aufweist, unterlag mit einer Effluxrate von 1,37 dem geringsten Efflux unter den Regioisomeren und schien ohne Bevorzugung in gleichem Maß durch die drei Transporter erkannt und transportiert zu werden. FS089 und FS100, welche im Vollblutassay an der p38 α -MAPK inaktiv sind, unterlagen mit Effluxraten von 1,59 und 1,58 einem tendenziell stärkeren Efflux. Dieser war ebenfalls auf alle drei untersuchten Transporter zurückzuführen, wurde jedoch signifikant stärker durch BCRP verursacht. Erwähnenswert ist, dass die Inhibierung von aktiven Transportern bei den Verbindungen FS100 und SK807 keinen Effekt auf die Sekretion (B \rightarrow A) hatte (bei FS089 war eine Senkung der Sekretion bei Inhibierung des MRP2s zu beobachten). Dies bestätigt die Annahme, dass die Verbindungen durch alle untersuchten Transporter als Substrate erkannt werden – die Inhibierung eines einzelnen Transporters konnte die Sekretion durch die anderen Effluxsysteme nicht kompensieren.

Im Gegensatz zu den Morpholinoethoxy-Regioisomeren war der Transport vom Dihydroxypropoxy-Dibenzosuberone Skepinone-L unabhängig von den untersuchten aktiven Effluxsystemen (*Diagramm 8 J-L*). Weder Permeabilität noch Effluxrate ließen sich durch Inhibierung der aktiven Transporter beeinflussen. Die geringere Permeabilität der Regioisomere im Vergleich zu Skepinone-L lässt sich so auf deren Efflux zurückführen, während Skepinone-L unabhängig hiervon durch die Zellen permeiert. Die erhöhte Effluxrate von Skepinone-L kann wahrscheinlich auf ein System-bedingtes Permeationsexperiment-Artefakt zurückgeführt werden: Die Volumina der Kompartimente, welche an der Verteilung von APIs im Transwellsystem beteiligt sind, unterscheiden sich. So enthält das basolaterale Kompartiment 1,0 und das apikale Kompartiment 0,3 mL Transportpuffer, was ebenfalls in ungleichen zur Verfügung stehenden Oberflächen resultiert. Vor allem bei Verbindungen, welche zu unspezifischer Adsorption an Kunststoffoberflächen neigen, werden somit selbst bei gleichmäßiger, konzentrationsabhängiger Verteilung des APIs falsch-geringe absorptive Permeabilitäten bestimmt, da hier mehr API an die (größere) Oberfläche des basolateralen Kompartimentes adsorbieren kann [120, 121]. Das Adsorptionsverhalten der Verbindungen wird unter 3.3.2 genauer diskutiert. Daher ist die Betrachtung der

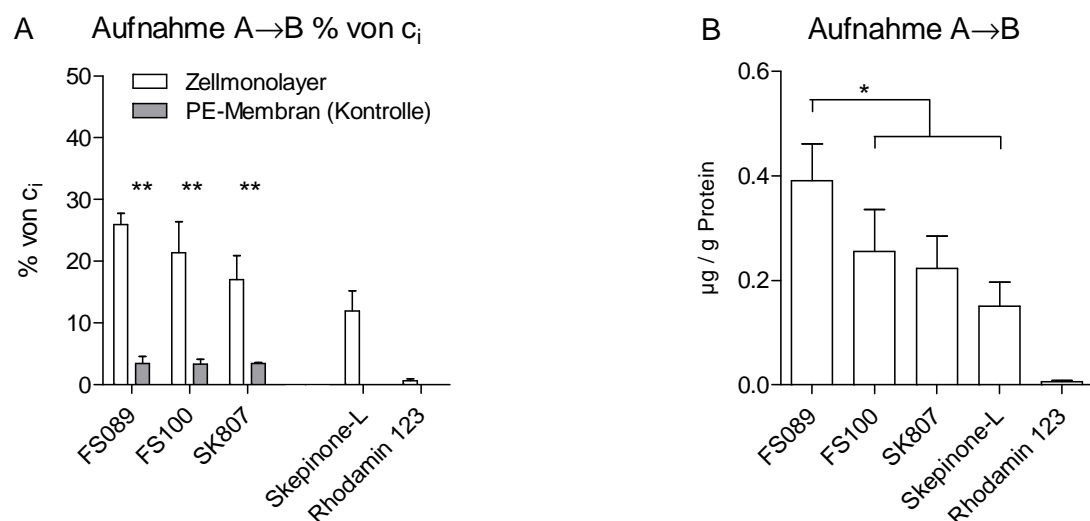
Beeinflussbarkeit/Reduzierung der Effluxrate durch Inhibierung aktiver Transporter aussagekräftiger als die Betrachtung der Absolutwerte alleine: Hier zeigt sich bei Skepinone-L allerdings keine Beeinträchtigung.

3.2.4 Aufnahmestudien

Um die Ursachen der geringen Wiederfindung (siehe 3.2.2) und den Einfluss aktiver Transporter auf die Permeation der Verbindungen näher zu untersuchen, wurde die im Zellmonolayer gebundene Menge bestimmt.

Es konnte ein beachtlicher Anteil der Verbindungen intrazellulär wiedergefunden werden, wobei FS089 mit $0,4 \mu\text{g/g}$ Protein am stärksten im Zellmonolayer akkumulierte. Dies entsprach 25 % der initial eingesetzten Menge an API und war signifikant höher als der Anteil, welcher an einer unbewachsenen PE-Membran wiedergefunden werden konnte (3 %) (Diagramm 12). Das P-Gp-Substrat Rhodamin 123, welches als Referenzverbindung für aktiven Transport eingesetzt wurde, unterlag mit $0,57 \times 10^{-2} \mu\text{g/g}$ (0,6 %) nur einer geringen Aufnahme.

Diagramm 12: Aufnahmestudien
 $n = 3-6; 3-6$ (A; B)



c_i = initial eingesetzte Menge API

FS089 signifikant zu Skepinone-L ($\alpha=0.01$)

Unter Inhibierung aktiver Effluxsysteme konnte eine Steigerung der Akkumulation beobachtet werden, vor allem bei FS100 unter Inhibierung von P-Gp ($0,26 \rightarrow 0,66 \mu\text{g/g}$) und bei SK807 unter Inhibierung von MRP2 ($0,22 \rightarrow 0,49 \mu\text{g/g}$) (Diagramm 13 B und C). Die Aufnahme des P-Gp-Substrates Rhodamin 123 konnte von $0,57$ auf $1,58 \times 10^{-2} \mu\text{g/g}$ gesteigert

werden (Diagramm 14 B), während die Aufnahme von Skepinone-L im Vergleich zu den Regioisomeren insgesamt geringer war (0,15 µg/g) und sich auch nicht durch Inaktivierung aktiver Transporter steigern ließ (Diagramm 14 A).

Diagramm 13: Aufnahme der Morpholinoethoxy-Regioisomere

n = 3-6; 3-4; 3-5 (A; B; C)

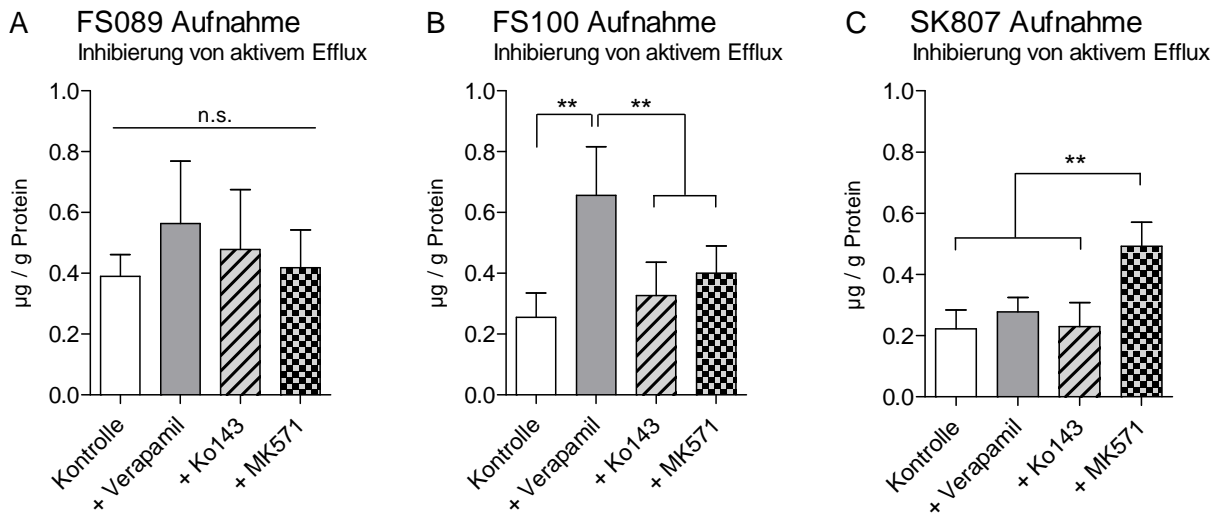


Diagramm 14: Aufnahme von Skepinone-L und Rhodamin123

n = 3-4; 3-4 (A; B)

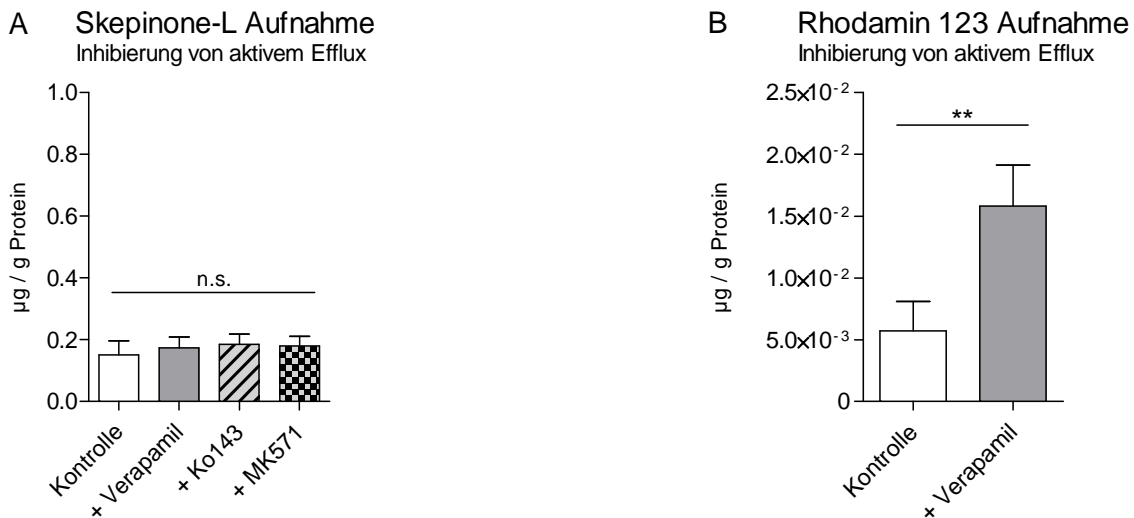


Diagramm 12 A gibt einen Hinweis darauf, in welchem Ausmaß die APIs an der PE-Membran adhären. Die verwendeten Systeme weisen einen Porendurchmesser von 0,4 µm auf und tatsächlich adsorbierten 3,3 – 3,5 % der initial eingesetzten Menge auf der Oberfläche

und in den Poren der Filter. Der Rest der bestimmten Menge konnte im Zellmonolayer wiedergefunden werden, was mit 17-26 % für die Morpholinoethoxy-Regioisomere eine beachtliche Menge darstellte. Der aufgenommene Anteil von Skepinone-L fiel mit 12 % geringer aus und ließ sich im Gegensatz zu den Regioisomeren durch Inhibierung aktiver Transporter nicht weiter steigern (*Diagramm 13* und *Diagramm 14*). Die hier beobachteten Effekte decken sich mit den Erkenntnissen aus den Inhibitionsstudien: Die intrazelluläre Aufnahme der Regioisomere erfolgte Transporter-abhängig, während Skepinone-L unabhängig aufgenommen wurde (*Diagramm 14 A*). Gleichzeitig war die absolut aufgenommene Menge an Skepinone-L geringer als die der Regioisomere, was mit den Beobachtungen der Wiederfindungen überein stimmt (vgl. 3.2.2 *Diagramm 7 C*); die Regioisomere unterlagen einem Transport durch aktive ABC-Transporter, während Skepinone-L die Zellen ungehindert passierte, was in einer höheren Wiederfindung bei Skepinone-L resultierte. Die Regioisomere reicherten sich im Monolayer an – möglicherweise an Effluxtransporter in der apikalen Membran gebunden, oder an deren Zielprotein, die p38 α -MAP-Kinase. Dieser gebundene Anteil verringerte folglich die kalkulierte Wiederfindung.

Die Aufnahme von FS089 konnte nicht eindeutig durch Inhibierung aktiver Transporter gesteigert werden (*Diagramm 13 A*), jedoch war der aufgenommene Anteil bereits in Abwesenheit von Inhibitoren signifikant höher als derjenige der restlichen Regioisomere (*Diagramm 12 B*). Wird ein Transporter inhibiert, unterliegen dessen Substrate einem geringeren Efflux und können sich daher stärker intrazellulär anreichern. Dies konnte anhand der Aufnahme von Rhodamin 123 bestätigt werden (*Diagramm 14 B*). Betrachtet man die Aufnahme der Regioisomere nach beteiligten Transportern aufgeschlüsselt (*Diagramm 13*), sind die stärksten Effekte bei FS100 durch Inhibierung des P-Gp und SK807 und Inhibierung des MRP2 zu beobachten – die absorptive Permeabilität wurde jedoch am stärksten durch das BCRP beeinflusst (siehe 3.2.4 *Diagramm 9 A* und *Diagramm 10 A*). Die Permeationsstudien ergaben eindeutige Hinweise auf die Beteiligung mehrerer Transporter am Permeationsmechanismus der Regioisomere. Diese scheinen aber insbesondere die transzellulär transportierte Menge zu beeinflussen und weniger die intrazellulär verbliebene, da das qualitative Ausmaß der Transporterbeteiligung der Aufnahmestudien nicht mit den Permeationsdaten übereinstimmt (BCRP vs. P-Gp und MRP2). Eine Erklärung hierfür bietet der folgende Ansatz: Der erste Schritt der Permeation ist das Passieren der apikalen Membran, welchem eine intrazelluläre

Anreicherung und anschließendes Passieren der basolateralen Membran folgt. Aufnahmestudien, bei denen die Konzentration in den Enterozyten bestimmt wird und welche somit nur den ersten Permeationsschritt betrachten, sind in ihren qualitativen Aussagen über Transporterbeteiligungen aussagekräftiger. Da aktive Effluxtransporter lediglich auf der apikalen Membran exprimiert werden, Permeationsdaten jedoch Prozesse an der apikalen und basolateralen Membran inkludieren, können hier Effekte an der apikalen Membran leichter überlagert werden. Da die Permeation von FS089, FS100 und SK807 durch Inhibierung von P-Gp, BCRP und MRP2 beeinflusst werden konnte, scheinen die Verbindungen Substrate aller drei untersuchten Transporter zu sein. Weiterhin deckten die Aufnahmestudien eine Präferenz von FS100 zu P-Gp und SK807 zu MRP2 auf.

Obwohl die aufgenommene Menge tendenziell unter Inhibierung von P-Gp, BCRP oder MRP2 stieg, konnte ein signifikanter Anstieg nur partiell festgestellt werden (P-Gp bei FS100 und MRP2 bei SK807). Dies spricht für eine effektive Ausschleusung und Permeation über die basolaterale Membran – dieser Effekt scheint insbesondere bei der Aufnahme von FS089 aufgetreten zu sein, bei welchem die intrazelluläre Aufnahme über die apikale Membran weitestgehend unabhängig von apikal gelegenen Transportern zu erfolgen schien, obwohl die Gesamtpermeation eindeutig durch aktive Transporter limitiert wurde (siehe 3.2.3 Diagramm 8). Wenn die Ausschleusung des intrazellulär gelegenen APIs über die basolaterale Membran mit hoher Kapazität erfolgt, wäre eine vorher gesteigerte Aufnahme mit den angewendeten Methoden nicht feststellbar, da nicht ein kinetischer Verlauf beobachtet wurde, sondern die Endkonzentration nach einer Inkubationsperiode bestimmt wurde (siehe Abb. 28).

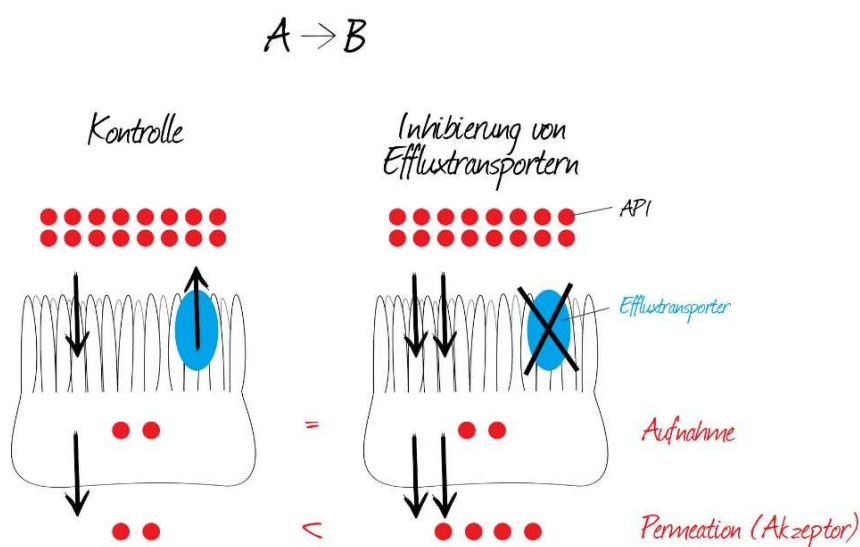


Abb. 28: Verteilungsverhalten in absorptiver Richtung

Unter Inhibierung aktiver Transporter: höhere intrazelluläre Anreicherung, aber effektive Ausschleusung aber über die basolaterale Membran. Dadurch wird die intrazelluläre Konzentration gering gehalten.

Eine effektive Ausschleusung an der basolateralen Membran kann neben einem passiven Konzentrationsgradienten ebenfalls durch basolateral gelegene Carrierproteine oder aktive Transporter wie MRP1 oder MRP3 vermittelt sein. In diesem Zusammenhang wäre theoretisch eine modulierende/stimulierende Interaktion mit den eingesetzten Inhibitoren und basolateral gelegenen Transportern denkbar, was eine Erhöhung der Kapazität bewirken könnte. Zum Beispiel stimuliert das in dieser Arbeit als P-Gp-Inhibitor eingesetzte Verapamil den Transport von MRP1-Substraten, obwohl es selbst kein Substrat für MRP1 darstellt [123-125]. Weiterhin beeinflusst MK571, welches in dieser Arbeit als MRP2-Inhibitor eingesetzt wurde, ebenfalls den Transport von MRP1-Substraten [126, 127] und stimuliert MRP5-vermittelten Efflux [128].

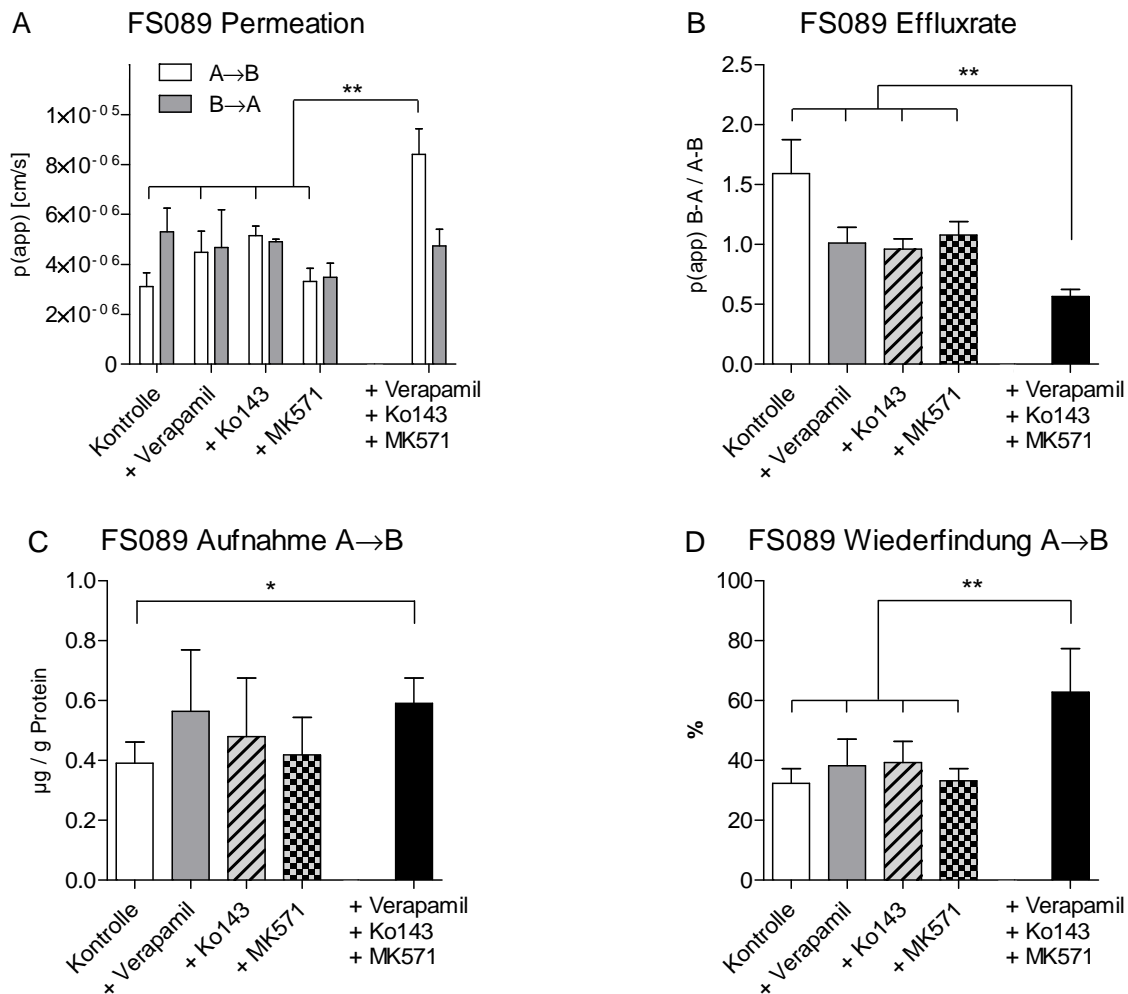
3.2.5 Multiinhibierung von P-Gp, BCRP und MRP2

Da die vorangegangenen Studien alle auf eine Multibeteiligung der untersuchten Transporter hindeuteten, wurden beispielhaft an FS089 zusätzliche Inhibitionsstudien durchgeführt, bei welchen P-Gp, BCRP und MRP2 simultan inhibiert wurden.

Die Ausschaltung einzelner Transporter bewirkte jeweils eine leichte Steigerung der Permeabilität von FS089 (vgl. 3.2.3 *Diagramm 8*). Unter simultaner Inhibierung aller drei Transporter stieg die absorptive Permeabilität jedoch um ein Vielfaches ($3,1 \rightarrow 8,4 \times 10^{-6}$ cm/s), während die Effluxrate signifikant stärker sank als unter Inhibierung von nur jeweils einem Transporter (*Diagramm 15 A und B*). Dies scheint im Einklang mit der Vermutung, dass die Verbindungen von mehreren Transportern gleichzeitig transportiert werden. Bei Inhibierung eines einzelnen Transporters wird der Efflux des Substrates durch die weiteren vorhandenen aktiven Transporter kompensiert, weshalb die Inaktivierung mehrerer Transporter gleichzeitig effektiver ist. Hierauf deutet ebenfalls die Steigerung der intrazellulären Aufnahme und der Gesamtwiederfindung unter Totalinhibierung hin (*Diagramm 15 C und D*) hin. Bei einzelner Inaktivierung der jeweiligen Transporter war lediglich ein steigender Trend erkennbar – unter Totalinhibierung summierten sich diese Effekte zu einer signifikanten Mehraufnahme.

In Übereinstimmung mit den aus Permeations- und Aufnahmestudien gewonnenen Daten konnte die Beteiligung mehrerer aktiver Transporter am Permeations- und Aufnahmemechanismus des Morpholinoethoxy-Dibenzosuberons FS089 bestätigt werden.

Diagramm 15: Multiinhibierung von P-Gp, BCRP und MRP2
n = 3-9; 3-7; 3-6; 3-9 (A; B; C; D)



3.3 Massenbilanz und unspezifische Adsorption

3.3.1 Massenbilanz

Bei Permeationsexperimenten wurde eine verringerte Wiederfindung für die untersuchten Verbindungen festgestellt (3.2.2 Diagramm 7 C). Ein Grund hierfür ergab sich in der ausgeprägten intrazellulären Anreicherung (3.2.4 Diagramm 12 A). Unter Auftragung der korrigierten Wiederfindung (Wiederfindung + intrazellulär akkumulierte Menge) ist eine Betrachtung der Verteilung der Verbindungen in den verschiedenen Kompartimenten des verwendeten Systems möglich.

Für die Regioisomere FS089, FS100 und SK807 ergab sich in absorptiver Richtung eine starke Korrektur der ursprünglich geringen Wiederfindung (vgl. 3.2.2 *Diagramm 7 C*), da 18 – 26 % der initial eingesetzten Menge an API intrazellulär angereichert wurden (*Diagramm 16 A, Diagramm 17 A und Diagramm 18 A*). Unter Inhibierung von P-Gp, BCRP und MRP2 wurde dieser Anteil sogar gesteigert, sodass die komplette Menge an eingesetztem API in absorptiver Richtung für die Regioisomere im System wiedergefunden werden konnte. Stark ausgeprägt war der Effekt vor allem für FS100 und Verapamil und SK807 und MK751, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Aufnahmestudien (vgl. 3.2.4 *Diagramm 13*), welche ebenfalls eine stärkere Beteiligung von P-Gp bei FS100 und MRP2 bei SK807 ergaben. In sekretorischer Richtung konnte die Wiederfindung durch Korrektur um den intrazellulär akkumulierenden Anteil der APIs um 8 – 22 % für die Regioisomere erhöht werden. Allerdings konnte keine Bevorzugung einzelner Transporter herausgestellt werden.

Diagramm 16: Massenbilanz von FS089

$n = 3-9; 3-7$ (A; B); $c_i =$ initial eingesetzte Menge API

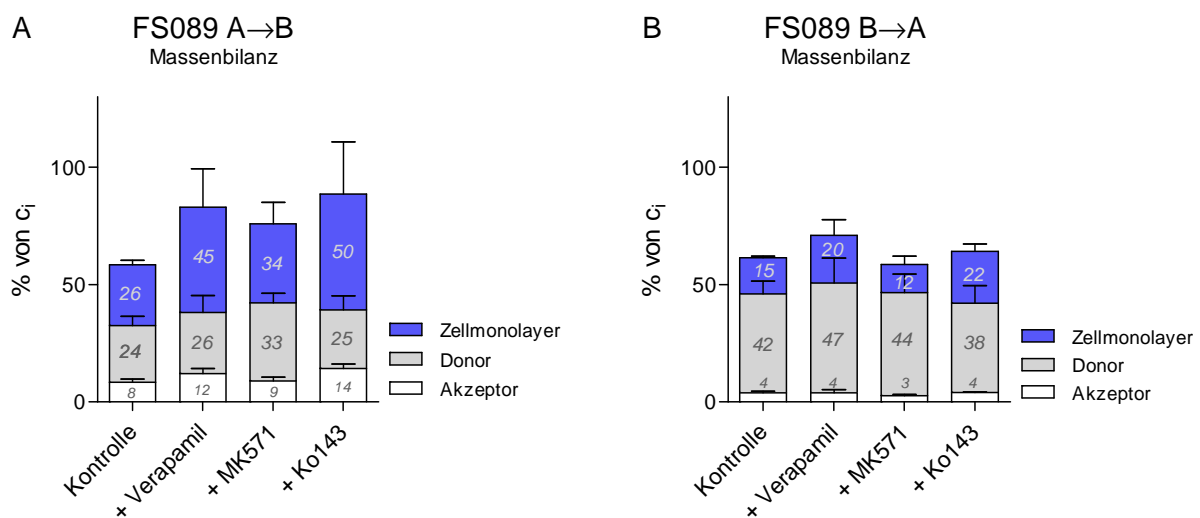


Diagramm 17: Massenbilanz von FS100

$n = 3-11$; 3-9 (A; B) $c_i = \text{initial eingesetzte Menge API}$

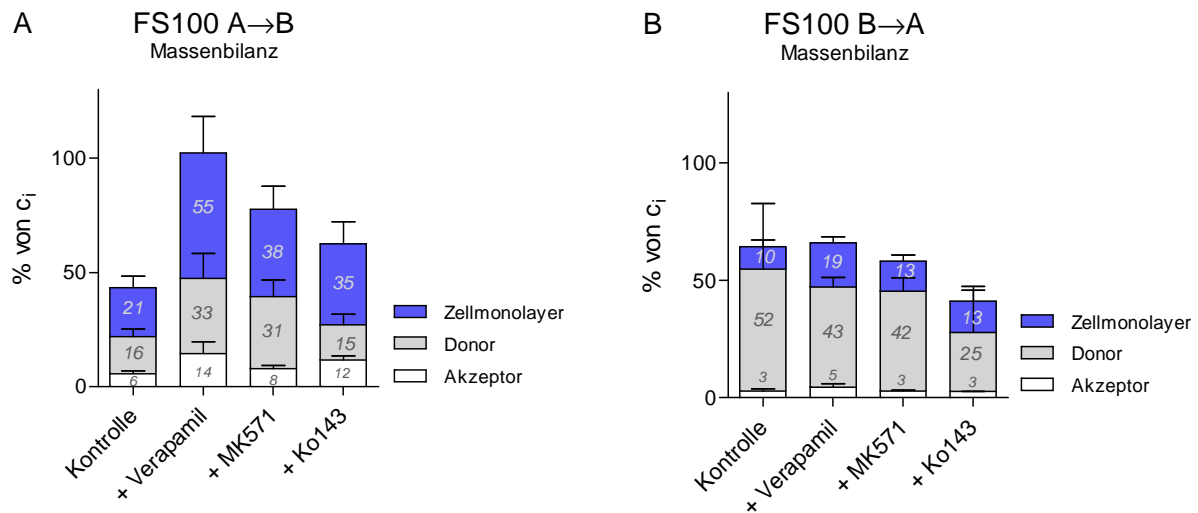
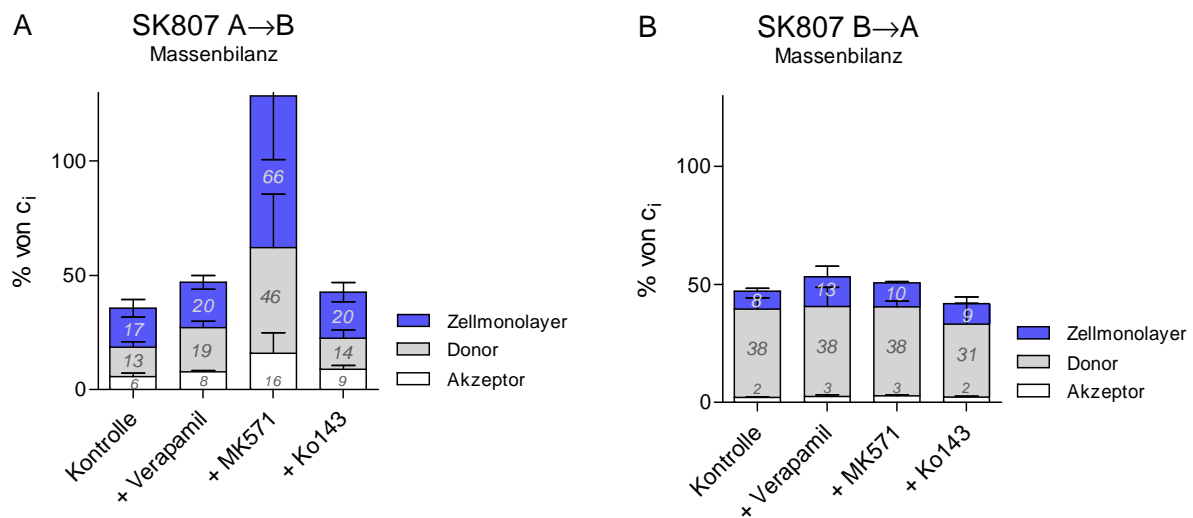


Diagramm 18: Massenbilanz von SK807

$n = 3-9$; 3-7 (A; B) $c_i = \text{initial eingesetzte Menge API}$

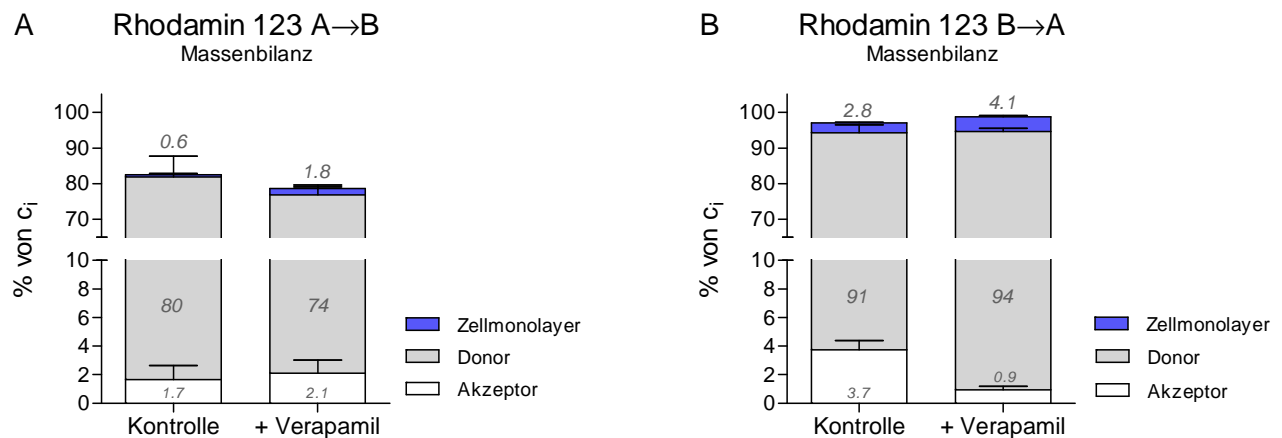


Interessanterweise lässt sich bei Betrachtung der Sekretionsstudien (B→A) ein abnehmender Trend in der Verteilung der APIs im Donorkompartiment unter Inhibierung aktiver Transporter ableiten (Diagramm 16 B, Diagramm 17 B und Diagramm 18 B). In absorptiver Richtung ist die Abnahme der Konzentration im Donorkompartiment unter Inhibierung aktiver Transporter ein Hinweis auf die Beteiligung dieser an der Aufnahme der untersuchten Verbindung, und die Beteiligung aktiver Transporter wurde in den

vorangegangenen Studien auch bestätigt. In sekretorischer Richtung jedoch (B→A) würde man bei Inhibierung apikal gelegener Transporter eher eine Anreicherung im Donorkompartiment erwarten (hier: Das basolaterale Kompartiment). Dies konnte auch beim P-Gp-Substrat Rhodamin 123 so beobachtet werden (*Diagramm 19 B*), wo der Anteil im Donorkompartiment in sekretorischer Richtung unter P-Gp Inhibierung von 90,5 auf 93,7 % leicht angestiegen ist. Der Anteil der Regioisomere im Donorkompartiment nimmt jedoch unter Inhibierung aktiver Transporter eher ab (am stärksten bei FS100 (*Diagramm 17 B*) mit 60 → 25 % / Kontrolle → + Ko143).

Diagramm 19: Massenbilanz von Rhodamin 123

$n = 3-5$; 3-6 (A; B) $c_i = \text{initial eingesetzte Menge API}$



Ein möglicher Grund hierfür könnte im Transport über basolateral gelegene Carrier- oder Transportproteine liegen (wie unter 3.2.4 bereits diskutiert). Wären diese ebenfalls durch die eingesetzten Inhibitoren beeinträchtigt, könnten Substrate vermehrt passiv über die basolaterale Membran in das Intrazellularmedium permeieren, was in einer Senkung der Konzentration im Donorkompartiment resultieren und einer intrazellulären Konzentrationserhöhung resultieren würde (siehe *Abb. 29*). Genau dieser Effekt konnte hier beobachtet werden, vor allem unter BCRP-Inhibierung; bei FS089 (*Diagramm 16*), wo der Anteil im Donorkompartiment von 42 auf 38 % sank, und gleichzeitig der intrazelluläre Anteil von 15 auf 22 % stieg, ebenso bei FS100 (Anteil im Donorkompartiment 52 → 25 %; intrazellulär 10 → 13 %) und bei SK807 (Anteil im Donorkompartiment 38 → 31 %; intrazellulär 8 → 9 %).

$B \rightarrow A$

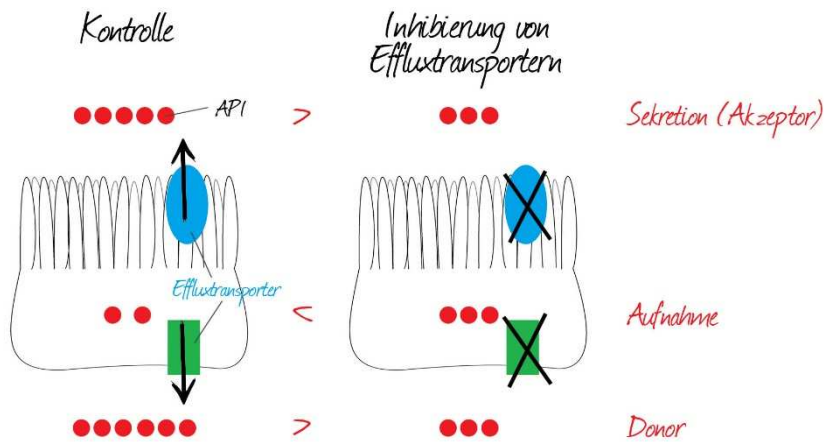


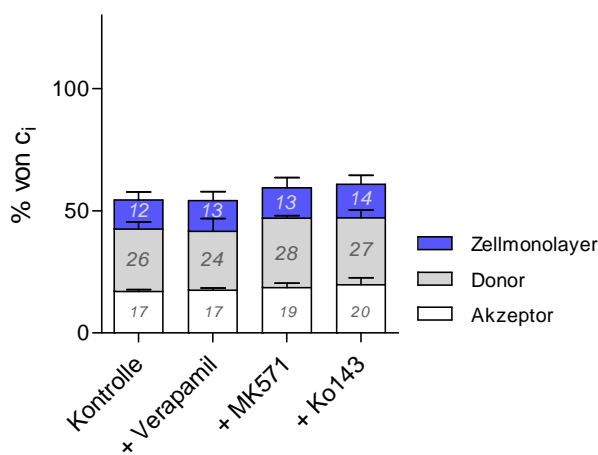
Abb. 29: Verteilungsverhalten in sekretorischer Richtung

Für Skepinone-L konnte ebenfalls eine Korrektur der Wiederfindung um 7 – 14 % erreicht werden, allerdings ohne Einfluss von aktiven Transportern und unabhängig von der Transportrichtung (Diagramm 20). Ebenfalls fand keine Umverteilung des APIs in den Kompartimenten bei Inhibierung von Transportern statt.

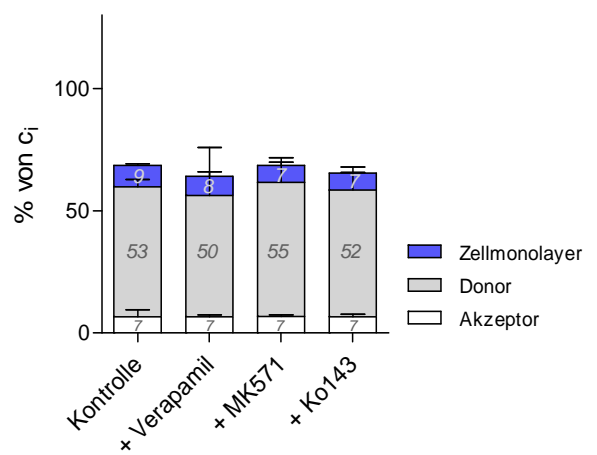
Diagramm 20: Massenbilanz von Skepinone-L

$n = 3-6; 3-5 (A; B)$ $c_i = \text{initial eingesetzte Menge API}$

A Skepinone-L $A \rightarrow B$
Massenbilanz



B Skepinone-L $B \rightarrow A$
Massenbilanz



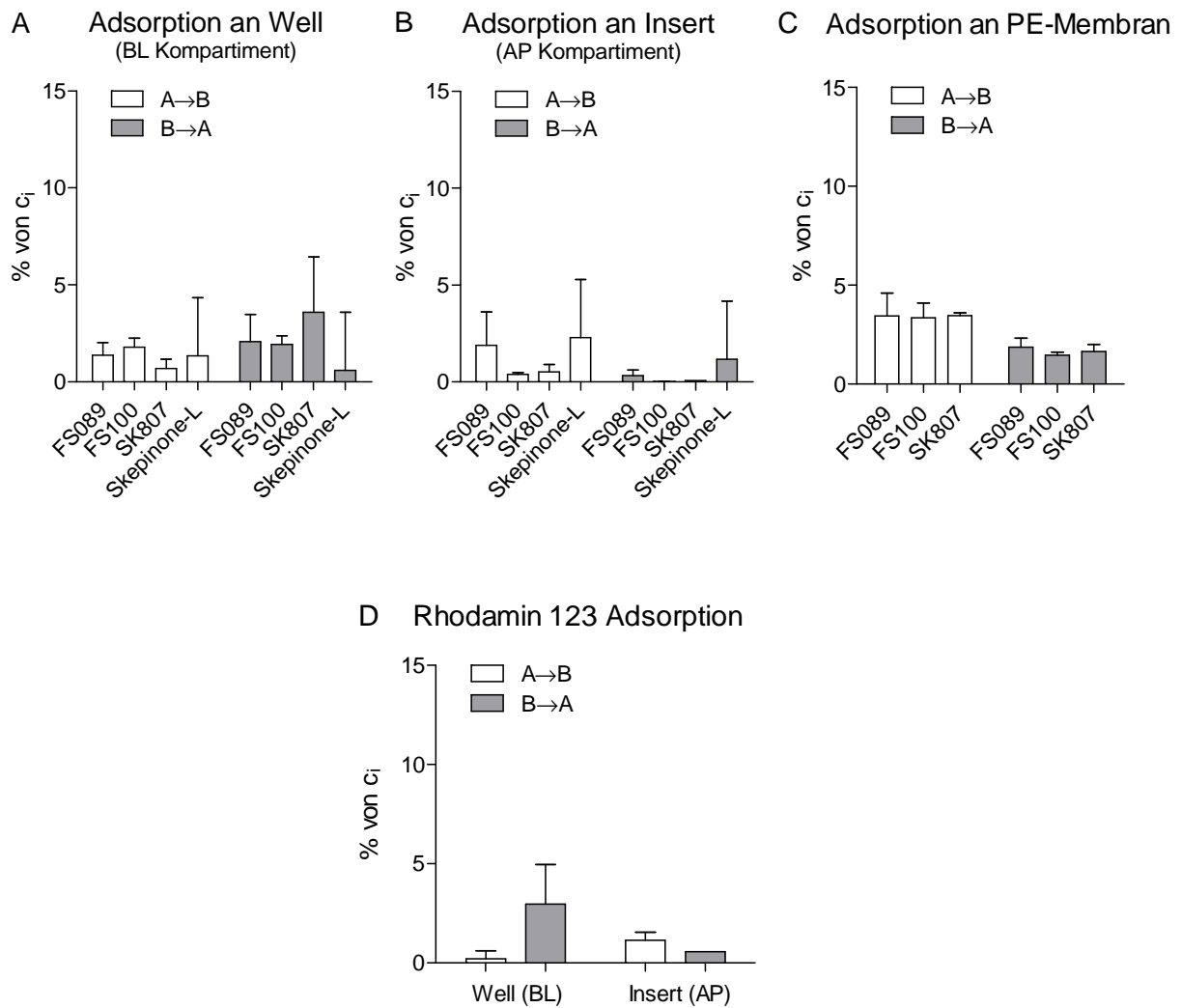
Durch die Korrektur um den intrazellulär akkumulierenden Anteil an API konnte die Gesamtwiederfindung für die untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren zwar erhöht werden, dennoch erreichte diese nicht in allen Fällen 100 %. Insbesondere traten bei den Morpholinoethoxy-Regioisomeren in sekretorischer Richtung unzufriedenstellende Verluste innerhalb des Systems auf, vor allem im Vergleich zum Rhodamin 123, welches eine korrigierte Wiederfindung von 80 – 100 % aufwies (*Diagramm 19*). Rhodamin 123 ist ein sehr viel hydrophileres Molekül im Vergleich zu den untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren. Eine plausible Erklärung wäre die Adsorption der lipophilen Dibenzosuberonderivate an Oberflächen im System; der adsorbierte Anteil wäre nicht zur Konzentrationsbestimmung verfügbar und daher ursächlich für die zu geringe Wiederfindung. Dies wurde im Folgenden näher untersucht.

3.3.2 Adsorptionsstudien

Da die Wiederfindungsbilanz der untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren keine ausreichende Korrektur der zu geringen Wiederfindungsrate erzielt hatte, wurde das Adsorptionsverhalten der Verbindungen untersucht. Die Dibenzosuberonderivate sind mit einem log D-Wert von 5,35 (pH 7,4) stark lipophile Verbindungen, welche grundsätzlich stärker als hydrophile Moleküle zur unspezifischen Adsorption an Kunststoffen neigen [120, 121]. Das Adsorptionsverhalten der Verbindungen wurde am Transwellsystem untersucht, indem nach einer Inkubationsdauer von 2 h die adsorbierte Menge an API am Well (basolaterales Kompartiment), der unbewachsenen PE-Membran und am Insert (apikales Kompartiment, nach Herausschneiden der PE-Membran) bestimmt wurde.

Die Verbindungen adsorbierten wie erwartet an Oberflächen des Transwellsystems (*Diagramm 21 A-C*). Am Well, welches die größte zusammenhängende Oberfläche bietet, adsorbierten 0,7 – 3,6 % der initial eingesetzten Menge. Das Insert (ohne PE-Membran) bietet durch den geringeren Durchmesser und den fehlenden Boden eine kleinere Oberfläche. Dennoch konnten auch hier bis zu 2,3 % an API wiedergefunden werden, wobei in absorptiver Richtung stärkere Adsorption stattfand. Die bestimmte Menge an der PE-Membran schien ebenfalls in absorptiver Richtung größer zu sein als in sekretorischer (3,3 – 3,5 vs. 1,5 – 1,9 %).

Diagramm 21: Adsorptionsverhalten von p38 α -MAPK-Inhibitoren
n = 3-4; 3; 3; 3-4 (A; B; C; D); *c_i* = initial eingesetzte Menge API



Dass am Insert eine verstärkte Adsorption stattfindet, obwohl die zur Verfügung stehende Kunststoffoberfläche geringer ist als im Well, kann durch die unterschiedlichen Ausgangsbedingungen begründet werden. Die Zellen wurden in das Insert ausgesät und in diesem für 21–28 Tage kultiviert (apikales Kompartiment). Das verwendete Kultivierungsmedium enthielt unter anderem BSA und die Zellen gaben ihrerseits über den gesamten Kultivierungszeitraum eine Reihe von Stoffwechselprodukten und abgestorbene Zellmaterialien in das apikale Kompartiment ab, welche sich an den vorhandenen Oberflächen anreichern konnten. Unmittelbar vor einem Experiment wurden die Inserts in ein frisches Well umgesetzt, sodass das basolaterale Kompartiment eine frische, unbehandelte Oberfläche bot, während das apikale Kompartiment Ablagerungen aus der Kultivierung enthielt. Daher besteht

die Möglichkeit, dass die reale Oberfläche des Inserts durch die Ablagerungen a) vergrößert war und b) andere Adsorptionseigenschaften als das unbehandelte Well aufwies.

An die PE-Membran adsorbierte ein größerer Anteil, wenn sich die Versuchslösung im apikalen Kompartiment befand und sich durch die unbewachsene Membran ins basolaterale Kompartiment verteilte ($A \rightarrow B$) als in umgekehrter Richtung. Diese Asymmetrie ergibt sich aus zwei Bedingungen: a) Die Versuchslösung wird effektiver in absorptiver Richtung durchgeleitet, da hier zusätzlich zu den Kapillarkräften die Schwerkraft die Benetzung der Poren erleichtert. b) Das apikale und basolaterale Kompartiment weisen ungleiche Oberflächen auf. Im basolateralen Kompartiment steht insgesamt eine größere Oberfläche zur Verfügung, daher ist der Anteil, welcher auf die „Unterseite“ der PE-Membran abfällt, geringer – selbst wenn man von einer gleichmäßigen Verteilung des adsorbierenden API auf alle Oberflächen ausgeht (siehe *Abb. 30*). Ebenfalls denkbar ist eine Herstellungs-bedingte Asymmetrie der Porenöffnungen auf der „oberen“ und „unteren“ Seite der Membran. Wären die Poren von oben besser zugänglich als von unten, könnte ein größerer Anteil API in absorptiver Richtung adsorbieren.

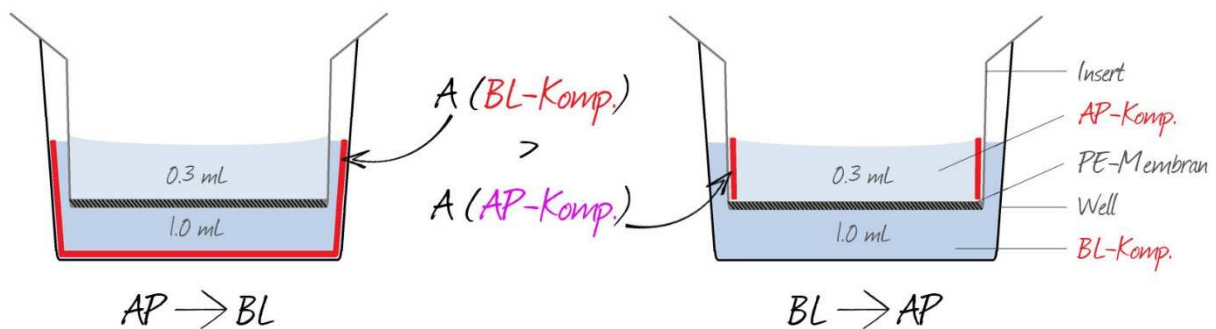


Abb. 30: Oberflächenverhältnis im Transwellssystem

Für das hydrophilere Molekül Rhodamin 123 konnte auch ein adsorbierter Anteil bestimmt werden (*Diagramm 16 D*), welcher zwar absolut geringer war, jedoch dem gleichen Trend wie die Dibenzosuberonderivate folgte; die Adsorption von Rhodamin 123 an das Insert fiel in absorptiver Richtung größer aus als in sekretorischer Richtung (0,6 zu 1 %). Am Well adsorbierte die größere Menge in sekretorischer Richtung (0,2 zu 3 %), was daran liegt, dass die Testlösung bei diesen Experimenten sich bereits im basolateralen Kompartiment befand und somit eine größere Absolutmenge an API zur Adsorption zur Verfügung stand (siehe *Abb. 31*).

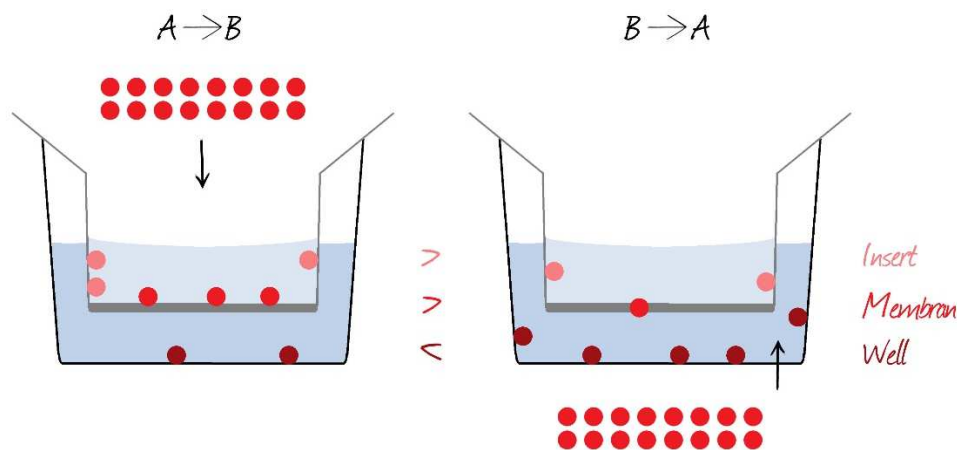


Abb. 31:
Adsorptionsverhalten
in Abhängigkeit von
der Transportrichtung

Ursächlich für die geringe Wiederfindung der p38 α -MAPK-Inhibitoren (vgl. 3.2.2 *Diagramm 7 C*) ist somit a) die ausgeprägte intrazelluläre Akkumulation der Dibenzosuberonderivate (siehe 3.2.4 *Diagramm 12*) und b) deren unspezifische Adsorption an Kunststoffoberflächen des verwendeten Transwellsystems (siehe *Diagramm 21 A-C*).

3.4 Dibenzosuberonderivate als Inhibitoren von BCRP

Viele Substrate für aktive Transporter können auch gleichzeitig inhibierend auf diese wirken. Da drei der untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren einem ausgeprägten Transport durch BCRP unterlagen (siehe 3.2.3 *Diagramm 8*), sollte untersucht werden, inwieweit dieses durch die Dibenzosuberonderivate inhibiert werden kann. Hierzu wurde die intrazelluläre Aufnahme vom BCRP-Substrat Hoechst 33342 in An- und Abwesenheit der Dibenzosuberonderivate untersucht.

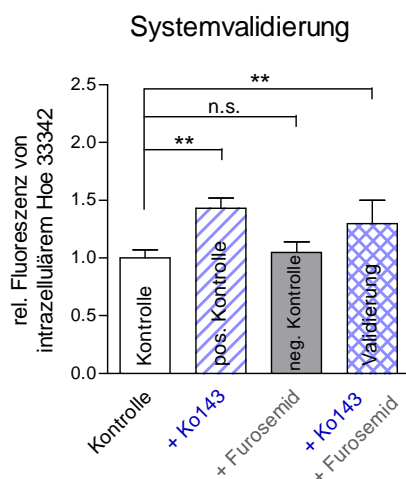
3.4.1 Prüfung auf Eignung des Testsystems

Zuerst wurde die Eignung des Versuchsaufbaus geprüft (*Diagramm 22*). Die Fluoreszenz, welche durch intrazellulär akkumulierendes Hoechst 33342 verursacht wird, wurde für jeden Ansatz auf die Kontrolle bezogen (= Nullwert, Aufnahme von Hoechst 33342 in Abwesenheit von zusätzlichen Verbindungen). Als Positivkontrolle wurde dem Ansatz Ko143, ein selektiver BCRP-Inhibitor, zugesetzt, welches die Aufnahme von Hoechst 33342 durch eine Verringerung des Effluxes signifikant steigerte (1,0 \rightarrow 1,4). Die Negativkontrolle sollte die Selektivität des BCRP-Inhibitors bestätigen und eine gesteigerte Aufnahme durch unspezifische Effekte

ausschließen. Eingesetzt wurde daher ein Nicht-Substrat für BCRP (Furosemid), welches auch wie erwartet keinen Einfluss auf die Hoechst 33342-Aufnahme zeigte. Durch den simultanen Einsatz von Inhibitor und Nicht-Substrat (Ko143 + Furosemid) sollte eine (unspezifische) Beeinflussung der Inhibitorkapazität durch Nicht-Substrate untersucht werden. Da die Aufnahme von Hoechst 33342 und somit die Inhibierung von BCRP auch in Anwesenheit von Furosemid und Ko143 effektiv erfolgte, ist nicht von einer Störung auszugehen. Daher wurde das Testsystem als geeignet und ausreichend spezifisch befunden, um inhibitorische Effekte auf die BCRP-limitierte intrazelluläre Aufnahme von Hoechst 33342 zu untersuchen.

Diagramm 22: BCRP-Inhibierungs Assay: Prüfung auf Eignung des Testsystems

$n = 3-11$



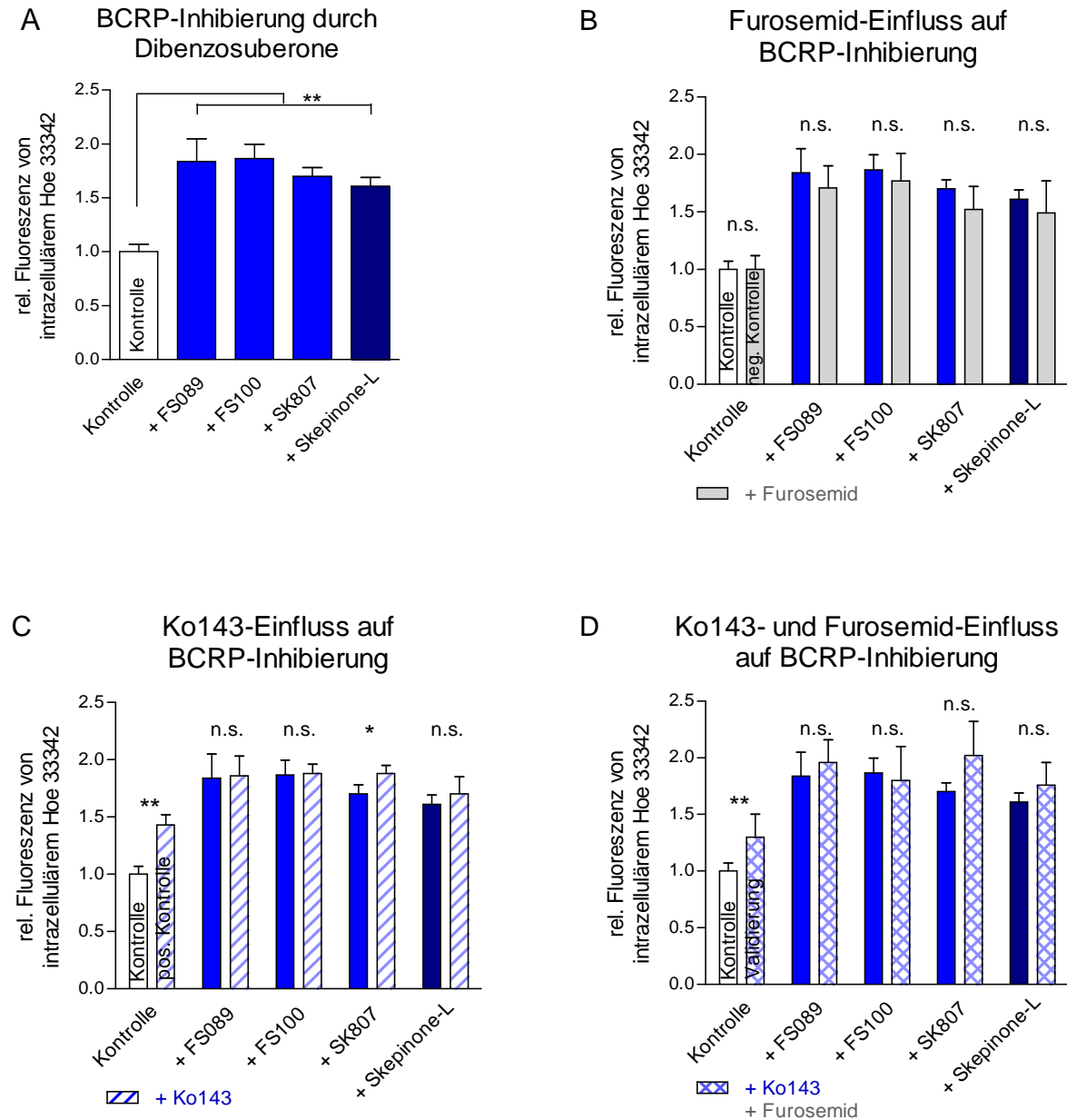
3.4.2 Inhibierung von BCRP durch Dibenzosuberonderivate

In *Diagramm 23 A* ist dargestellt, wie die Dibenzosuberonderivate die Aufnahme von Hoechst 33342 beeinflussen. Die Aufnahme des BCRP-Substrates Hoechst 33342 war in Anwesenheit der Verbindungen um den Faktor 1,6 (Skepinone-L) – 1,9 (FS100) erhöht. Ursächlich hierfür könnte eine Inhibierung des Effluxtransporters BCRP sein. Um sicherzustellen, dass der Effekt aufgrund einer Interaktion zwischen BCRP und den Verbindungen auftrat, wurde in einem weiteren Ansatz zusätzlich das Nicht-BCRP-Substrat Furosemid zugesetzt (*Diagramm 23 B*). Die Aufnahme von Hoechst 33342 war in keinem Fall beeinträchtigt, sodass die Steigerung der intrazellulären Fluoreszenz in Anwesenheit der

Dibenzosuberonderivate auf eine spezifische Interaktion mit BCRP zurückzuführen ist und nicht etwa aufgrund einer erhöhten trans-/parazellulären Gesamtpermeabilität auftritt.

Diagramm 23: Dibenzosuberonderivate als Inhibitoren für BCRP

n = 3-11



Ko143 wird als spezifischer und selektiver Inhibitor für BCRP eingesetzt. In *Diagramm 23 C* ist zu erkennen, wie der Einsatz von Ko143 die Aufnahme von Hoechst 33342 aufgrund eines verminderten Effluxes durch BCRP signifikant steigert (Kontrolle). Der Zusatz von Ko143 zu den Dibenzosuberonderivaten brachte keine weitere Steigerung der Hoechst 33342-Aufnahme – mit Ausnahme von SK807, bei welchem eine leichte Steigerung erzielt werden konnte (1,7 → 1,9). Die Zugabe des spezifischen Inhibitors Ko143 und des Nicht-BCRP-Substrates Furosemid (*Diagramm 23 D*) bestätigte noch einmal die Eignung des Systems, da die Aufnahme von Hoechst 33342 nicht weiter beeinflusst wurde. Der steigernde Effekt durch die Dibenzosuberonderivate wurde weder durch die Anwesenheit von Furosemid noch Ko143 beeinträchtigt.

Die untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren scheinen also inhibitorische Effekte auf den aktiven Transporter BCRP auszuüben. Da die Permeations- und Aufnahmestudien eindeutige Hinweise auf die Beteiligung von BCRP am Transport der Verbindungen FS089, FS100 und SK807 lieferten, ist eine inhibitorische Aktivität plausibel, da viele Substrate durch Konkurrenz um den Transporter inhibitorisch wirken können. Der ABC-Transporter BCRP weist multiple Bindungsstellen innerhalb seiner Bindungsdomänen auf, an welche theoretisch sogar mehrere Substrate simultan binden können [31]. Denkbar sind somit theoretisch kompetitive (Konkurrenz um Bindungsstelle), nicht kompetitive (sterische Störung der Ausschleusung des Substrates durch Bindung an weitere Bindungsstelle) und partiell kompetitive Hemmung (Inhibitorbindung reduziert Substrataffinität durch sterische/abschirmende Effekte). Welches von zwei/mehreren Substraten bevorzugt transportiert wird (und somit den Transport weiterer Substrate inhibiert), hängt von der Affinität und bei kompetitiver Hemmung von der eingesetzten Konzentration ab. Da die Konzentration vom Substrat Hoechst 33342 und der Dibenzosuberonderivate gleichermaßen bei 10 μ M lag, ist eine höhere Affinität der Dibenzosuberonderivate zu BCRP wahrscheinlich. Skepinone-L dagegen wies in keinen der vorangegangenen Studien eine Affinität zu BCRP oder anderen untersuchten Transportern auf. Dennoch steigert es die Aufnahme von Hoechst 33342, ohne selbst von BCRP transportiert zu werden. Dieser Effekt ist somit – im Gegensatz zu dem bei den Regioisomeren beobachteten – nicht kompetitiver Natur. Möglich ist eine allosterische Modulation des Transporters, also die Bindung an eine Stelle, welche nicht die Bindungsdomäne darstellt. Ein ähnliches Phänomen konnte für die HIV-Protease-Inhibitoren Ritonavir, Saquinavir und Nelfinavir beobachtet

werden, welche BCRP-vermittelten Efflux inhibierten, jedoch selbst nicht durch dieses transportiert wurden [129]. Diese Art der Inhibierung kann effektiver als eine kompetitive Interaktion erfolgen, da die inhibitorische Potenz unabhängig von der eingesetzten Konzentration erfolgt – jedoch wurde die Konzentrationsabhängigkeit in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Die hier durchgeführten Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass die untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren in der Lage sind, BCRP zu inhibieren. Während FS089, FS100 und SK807 gleichzeitig durch dieses in der transzellulären Permeabilität limitiert werden, da sie ebenfalls Substrate darstellen, ist Skepinone-L wahrscheinlich als allosterischer Inhibitor für die Inaktivierung des BCRPs verantwortlich.

4 Diskussion

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollten Aufschluss zum Permeations- und Aufnahmeverhalten des Dihydroxypropoxy-Dibenzosuberons Skepinone-L und der Morpholinoethoxy-Regioisomere FS089, FS100 und SK807 geben. Hierzu wurde die Permeabilität und intrazelluläre Aufnahme der Verbindungen in Caco-2/TC7 Zellen sowie die dahinter liegenden Mechanismen systematisch und unter besonderer Berücksichtigung der aktiven Transporter P-Gp, BCRP und MRP2 untersucht. Im Folgenden werden die einzelnen Erkenntnisse detailliert beleuchtet und diskutiert.

4.1 Morpholinoethoxy-Regioisomere FS089, FS100 und SK807

4.1.1 Transport durch P-Gp, BCRP und MRP2

Die durchgeführten Studien gaben eindeutige Hinweise auf Transport von FS089, FS100 und SK807 durch die aktiven Effluxtransporter P-Gp, BCRP und MRP2. ABC-Transporter weisen sehr breite und häufig überlappende Substratspezifitäten auf, um eine möglichst vollständige Schutz- und Barrierefunktion im Körper einzunehmen [2, 25, 82]. Daher ist es schlüssig, dass die untersuchten Dibenzosuberone Substrate aller drei Transporter darstellen, da sie identische chemische Voraussetzungen wie Molekularmasse, log P- und pK_s -Werte aufweisen. Der Unterschied besteht lediglich in der Stellung der Morpholinoethoxy-Seitenkette. Dieser Stellungswechsel ist demnach dafür verantwortlich, dass das Ausmaß der Transporterbeteiligung unter den Regioisomeren variiert: Die Permeation von FS100 durch die apikale Membran wird hauptsächlich durch P-Gp limitiert, während die Aufnahme von SK807 MRP2-vermittelt abläuft. In ihren qualitativen Aussagen zu Transporterbeteiligungen sind die Aufnahmestudien als aussagekräftiger einzuschätzen als die Permeationsdaten: Bei den Aufnahmestudien wird lediglich der Durchtritt einer Membran betrachtet (AP oder BL), da die quantitative Bestimmung des APIs im Zellmonolayer erfolgt. In absorptiver Richtung können somit die „Netto“-Effekte apikal gelegener Transporter erfasst werden. Bei den Permeationsdaten handelt es sich um „Brutto“-Effekte, welche die Ereignisse an zwei Membranen beinhalten. In absorptiver Richtung erfasst man demnach die Summe der Permeation-beeinflussenden Effekte an der apikalen und basolateralen Membran. Wenn die Absorption an der apikalen Membran durch einen Effluxtransporter limitiert ist, die

Ausschleusung an der basolateralen Membran jedoch effektiv erfolgt (z.B. durch Unterstützung durch einen Carrier oder aktiven Transporter wie MRP1 oder MRP3), ist die Permeabilität weniger stark beeinträchtigt. Dies würde Effekte erklären, die bei der Aufnahme auftreten, bei der Permeation jedoch nicht mehr sichtbar sind. Allerdings verhielt es sich bei den hier durchgeführten Untersuchungen umgekehrt; alle Transporter hatten einen Einfluss auf die Permeabilität von FS089, FS100 und SK807, jedoch konnte der Effekt bei den Aufnahmestudien nur noch bei einzelnen Transportern in signifikantem Ausmaß beobachtet werden (FS100 und P-Gp, SK807 und MRP2). Warum limitiert also z.B. BCRP die transzelluläre Permeabilität von FS089, jedoch nicht die intrazelluläre Aufnahme der Verbindung? Eventuell liegt die Begründung dieses Phänomens in den Versuchsbedingungen: Die quantitative Bestimmung der APIs im Zellmonolayer wurde nach einer Inkubationszeit von 2 h durchgeführt. Möglicherweise war dieser Zeitrahmen zu lang gewählt, sodass der API bei Inaktivierung aktiver Transporter zwar effektiver intrazellulär aufgenommen wurde, jedoch aufgrund des höheren Konzentrationsgradienten über der basolateralen Membran auch effektiver wieder ausgeschleust wurde. Nach Abschluss dieser Umverteilung hätte sich der API somit im basolateralen Kompartiment angereichert (zu sehen an höheren p_{app} unter Inhibierung aktiver Transporter), der intrazelluläre Anteil hätte sich jedoch ebenfalls wieder reduziert (aufgenommene Menge unter Inhibierung entspricht in etwa der Menge im Kontrollexperiment) (vgl. 3.2.4 Abb. 28). Die trotz langer Inkubationszeit sichtbaren Effekte deuten auf eine stärkere Beteiligung dieser Transporter hin (FS100 und P-Gp, SK807 und MRP2), sodass aufgrund der ausgeprägten intrazellulären Anreicherung der Abtransport über die basolaterale Membran während der gegebenen Inkubationsdauer noch nicht vollständig erfolgte. Um dies eindeutig klären zu können, müssten die Experimente unter Einhaltung einer kürzeren Inkubationszeit wiederholt werden.

4.1.2 Beteiligung von basolateral gelegenen Transportern oder Carriern?

Die Aufnahmestudien deuteten eine effektive Permeation über die basolaterale Membran an, welche in der Ausschleusung durch aktive Transporter oder Carrier begründet sein kann. Weitere Hinweise auf die Beteiligung basolateral gelegener Transporter- oder Carrierproteine ergaben sich aus den Untersuchungen zur Wiederfindungsbilanz (3.3.1). Hier fand in sekretorischer Richtung unter Inhibierung apikaler Effluxsysteme eine Umverteilung des APIs aus dem Donorkompartiment (hier: Das basolaterale Kompartiment) ins Intrazellularmedium

statt. Wie unter 3.3.1 bereits diskutiert, besteht die Möglichkeit, dass die eingesetzten Inhibitoren außer den apikalen Effluxtransportern ebenfalls basolateral gelegene Proteine wie MRP1 und MRP3 beeinträchtigen können und somit den Efflux aus den Zellen ins basolaterale Kompartiment abschwächen. Zum Beispiel stimuliert das in dieser Arbeit als P-Gp-Inhibitor eingesetzte Verapamil den Transport von MRP1-Substraten, obwohl es selbst kein Substrat für MRP1 darstellt [123-125]. Weiterhin inhibiert MK571, welches in dieser Arbeit als MRP2-Inhibitor eingesetzt wurde, ebenfalls den Transport von MRP1-Substraten [126, 127] und stimuliert MRP5-vermittelten Efflux [128]. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Aufklärung von Beteiligungen von relevanten MDR-Transportern P-Gp, BCRP und MRP2 am Transport der p38 α -MAPK-Inhibitoren. Weiterführende Studien sollten jedoch weitere Transportsysteme und deren Beeinflussung durch eingesetzte Modulatoren/Inhibitoren untersuchen, um die hier beobachteten Effekte an der basolateralen Membran vollständig aufzuklären.

4.1.3 Klinische Relevanz der erhobenen Daten

Trotz der geringen Werte für die Permeabilität der Regioisomere FS089, FS100 und SK807, waren diese deutlich höher als für das MRP2-Substrat und den BCS Klasse IV Wirkstoff Furosemid ($0,7 \times 10^{-6}$ cm/s), welches in vivo peroral verabreicht immer noch eine (intra- und interindividuell stark schwankende) Bioverfügbarkeit von 20 – 80 % erreicht [130]. Verbindungen mit Permeationswerten größer als 1×10^{-6} cm/s weisen in der Regel eine gute bzw. vollständige Resorption auf [22, 113]. Jedoch empfehlen sowohl die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) als auch die European Medicines Agency (EMA) zur Klärung möglicher Wechselwirkungen mit praktisch eingesetzten Wirkstoffen eine Untersuchung auf Affinitäten zu aktiven Transportern [4, 5]. Verbindungen, deren Effluxrate einen Wert von 2 übersteigt, zeigen häufig in der klinischen Praxis Drug-Drug-Interaktionen (DDIs), was zur Limitierung des Einsatzes führen kann. Die hier beobachteten Effluxraten liegen zwar unterhalb dieser Grenze (1,4 -1,6), lassen sich jedoch in beachtlichem Ausmaß durch Inhibierung aktiver Transporter reduzieren; eine Multibeteiligung der aktiven Effluxtransporter P-Gp, BCRP und MRP2 konnte für FS089 nachgewiesen werden (vgl. 3.2.5 *Diagramm 15*) und ist für die weiteren Regioisomere ebenfalls wahrscheinlich. Im Gastrointestinaltrakt sind vor allem diese drei apikal gelegenen Transporter am Efflux von vielen Pharmaka und Xenobiotika beteiligt, und somit für die Limitierung ihrer Bioverfügbarkeit verantwortlich. Im verwendeten Caco-2/TC7 Modell konnte dies eindrücklich gezeigt werden: Coffein als Nicht-Substrat wies eine Permeabilität von

$25,4 \times 10^{-6}$ auf, während die Permeabilität von Rhodamin 123 (P-Gp-Substrat), Hoechst 333342 (BCRP-Substrat) und Furosemid (MRP2-Substrat) mit $0,87$, $0,33$ und $0,71 \times 10^{-6}$ cm/s deutlich geringer ausfiel (siehe 3.2.1 Diagramm 6). Allerdings scheint der Efflux der Regioisomere nicht so stark ausgeprägt zu sein wie bei den genannten Referenzverbindungen, denn die resultierende Permeabilität war mit Werten $> 10^{-6}$ cm/s in einem Bereich, der durchaus noch eine ausreichende Bioverfügbarkeit vermuten lässt. Dennoch ist die Affinität zu aktiven Transportern zu berücksichtigen, vor allem im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz der Verbindungen. Da diese von P-Gp, BCRP und MPR2 transportiert werden, sind Wechselwirkungen mit Substraten dieser Transporter wahrscheinlich. Da in Multidrug Resistance (MDR) involvierte Transporter nicht nur im Gastrointestinaltrakt sondern ebenfalls z.B. im Gehirn und metabolisierenden Organen wie der Leber exprimiert werden, sind Beeinträchtigungen der Pharmakokinetik von Substraten auf drei Ebenen möglich: a) Limitierung der gastrointestinalen Absorption durch Efflux im Gastrointestinaltrakt, b) Begrenzung der Penetration in Zielgewebe wie Gehirn oder Tumorzellen und c) eine Förderung der Metabolisierung und Exkretion durch Ausschleusung in Galle oder Urin. Diese Effekte können sogar noch verstärkt werden, wenn die Administration von Substraten aktiver Transporter die Expression dieser Transporter *und* Enzymen des Cytochrom P450 Systems induzieren, da beide Systeme durch den nuklearen Pregnan-X-Rezeptor stimuliert werden [52]. Eine Interaktion zweier Substrate aktiver Transporter kann auf allen genannten Ebenen stattfinden und somit die Aufnahme und Biotransformation von einer großen Reihe an Verbindungen schwer vorhersehbar beeinflussen. Von hoher klinischer Relevanz, da im klinischen Alltag häufig eingesetzt, ist unter anderem die erhöhte Toxizität von Digoxin durch Coadministration mit P-Gp-Substraten/-Inhibitoren und die reduzierte Wirksamkeit und Sicherheit der Statintherapie durch Wechselwirkungen mit BCRP- und OATB1B1-Substraten [84].

Die FDA rät von der Markteinführung von Substraten für CYP3A4 und P-Gp ab, da im klinischen Gebrauch von solchen Verbindungen mit ausgeprägten DDIs zu rechnen ist [5]. Jedoch ist ein in vitro festgestellter Efflux nicht zwangsläufig klinisch relevant. Erst bei zusätzlich geringen Permeationskoeffizienten und ausgeprägter Metabolisierung steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Pharmakokinetik eines in vitro festgestellten Efflux-Substrates beeinträchtigt wird. Da die Morpholinoethoxy-Regioisomere p_{app} -Werte $> 1 \times 10^{-6}$ cm/s

aufwiesen und die hier durchgeführten Studien keine hinreichenden Hinweise auf Art und Umfang einer Metabolisierung lieferten, ist eine deutliche Limitierung der oralen Bioverfügbarkeit für FS089, FS100 und SK807 unwahrscheinlich. Dennoch bietet Skepinone-L, welches keinerlei Affinität zu den genannten Effluxtransportern im Caco-2/TC7 Modell aufwies, einen großen Vorteil. Skepinone-L hat gute Voraussetzungen schnell und vollständig aus dem Gastrointestinaltrakt absorbiert zu werden und viele Zielgewebe erfolgreich zu penetrieren, da es nicht durch die genannten Effluxsysteme transportiert wird.

4.1.4 Ist die Aktivität an der p38 α -MAP-Kinase im Vollblut-Assay Transporter-abhängig?

Die Dibenzosuberonderivate FS089, FS100 und SK807 ergaben eine potente und effektive Inhibierung der p38 α -MAPK am isolierten Enzym [20]. Allerdings trat im Vollblutassay ein nahezu vollständiger Verlust der inhibitorischen Potenz von FS089 und FS100, nicht jedoch von SK807 auf. Eine Transporter-spezifische Ursache für diesen Effekt konnte in den hier durchgeführten Permeationsstudien zunächst nicht aufgedeckt werden, da alle drei Regioisomere Substrate für die Effluxtransporter P-Gp, BCRP und MRP2 in Caco-2/TC7 Zellen darstellten. Die Permeabilitäten durch Caco-2/TC7 Zellen aller drei Verbindungen lagen in einem ähnlich geringen Bereich und die intrazelluläre Aufnahme war für alle Verbindungen Transporter-abhängig. Jedoch setzt sich die Transporterausstattung im Hämatopoetischen System überwiegend aus P-Gp und BCRP zusammen [131], während im Gastrointestinaltrakt zusätzlich das MRP2 auf apikalen Membranen exprimiert wird [33, 79]. Die Aufnahme von SK807 wurde im Gegensatz zu FS089 und FS100 durch MRP2 beeinflusst, nicht jedoch durch P-Gp und BCRP (3.2.4 Diagramm 13 C). Dies könnte eine mögliche Erklärung für den Wirkverlust von FS089 und FS100 am Zielprotein p38 α im Vollblutassay sein: Da die Aufnahme der beiden Verbindungen durch P-GP und BCRP limitiert wird, können keine effektiven intrazellulären Wirkspiegel erreicht werden. Die Aufnahme von SK807 hingegen erfolgt unabhängig von P-Gp und BCRP und es kann somit die intrazellulär gelegene p38 α -MAPK erfolgreich inhibieren.

Dies bietet ein sehr gutes Beispiel dafür, wie MDR-Transporter die Penetration von Pharmaka in Zielgewebe limitieren können. Die qualitative und quantitative Ausstattung mit Transportern variiert in Abhängigkeit des entsprechenden Organs. Zum Beispiel wird die Barriere der Bluthirnschranke in großem Ausmaß durch die Co-Expression von P-Gp und BCRP gebildet [132, 133], während Effluxtransporter im Gastrointestinaltrakt durch BCRP, MRP2 und P-Gp [28] vertreten sind, und die ABC-Transporter P-Gp, MRP2 und BSEP (Bile Salt Export Pump,

ABCB11) in der canalikulären Membran von Hepatozyten exprimiert werden [134]. Durch diese Variabilität in dem Expressionsausmaß kann die Zugänglichkeit von Xenobiotika zu den verschiedenen Geweben gesteuert werden. So ergibt sich für das MRP2-Substrat SK807 eine gute Permeabilität in Zellen des Hämatopoetischen Systems, da hier wenig MRP2 exprimiert wird – die Absorption im Dünndarm kann jedoch durch den MRP2-vermittelten Efflux eingeschränkt werden. Ob bei peroraler Verabreichung die Permeabilität durch gastrointestinale Epithelien ausreicht, um anschließend weitere Zielgewebe zu penetrieren (z.B. das Gehirn bei der Indikation Morbus Alzheimer oder Tumorzellen bei Krebserkrankungen) kann anhand dieser Daten nur schwer vorhergesagt werden und müsste für die einzelnen Verbindungen in vivo getestet werden.

Obwohl sich die Strukturen von FS089, FS100 und SK807 lediglich in der Positionierung der der Morpholinoethoxy-Seitenkette unterscheiden, unterliegen die Regioisomere einem unterschiedlich stark ausgeprägten Transport durch die aktiven Effluxproteine P-Gp, BCRP und MRP2. Stereoselektiver Transport durch P-Gp wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet und diskutiert [135, 136]. Unter anderem wird z.B. Chinidin (8R, 9S Konfiguration) stärker durch P-Gp transportiert als sein Diastereoisomer Chinin (8S, 9S Konfiguration), während eine R-Konfiguration am chiralen Zentrum von Dihydropyridinen zu einer Verstärkung der P-Gp- Interaktion führt [135]. Die Änderung der Positionierung einer größeren Seitenkette, wie es bei den in dieser Arbeit untersuchten Regioisomeren der Fall war, resultiert in einer starken Veränderung der räumlichen Ausrichtung. Es ist daher schlüssig, dass die Regioisomere FS089, FS100 und SK807 unterschiedlich starkem Transport durch P-Gp, BCRP und MRP2 unterlagen: Während die Aufnahme von FS100 hauptsächlich durch P-Gp limitiert wurde, erfolgte die Permeation von SK807 über die apikale Membran von Caco-2/TC7 Zellen in Abhängigkeit von MRP2. Da jedoch keine exakten Wechselwirkungsmechanismen zu den entsprechenden Transportern bekannt sind, kann hier kein maßgeblich für die Interaktion verantwortliches Strukturelement abgeleitet werden.

4.2 Skepinone-L

Die Permeationskoeffizienten vom Dihydroxypropoxy-Dibenzosuberone Skepinone-L lagen deutlich höher als die der Morpholinoethoxy-Regioisomere (6,3 vs. $2 - 3 \times 10^{-6}$ cm/s) und Transport sowie Aufnahme war unabhängig von Effluxtransportern. Da es ebenfalls eine sehr

gute metabolische Stabilität aufgrund von höherer Hydrophilie aufweist [137], ist mit einer schnellen und vollständigen, Transporter-unabhängigen Permeation durch gastrointestinale Epithelien in vivo zu rechnen – dies konnte auch bereits in vivo an Mäusen gezeigt werden [1]. Skepinone-L hat gute Voraussetzungen, in viele Zielgewebe wie Leber, Nieren und Gehirn ungehindert aufgenommen zu werden, da es keinem Efflux durch P-Gp, BCRP oder MRP2 unterliegt. Allerdings könnten sich Interaktionen mit klinisch eingesetzten BCRP-Substraten wie Statinen, HIV-Protease-Inhibitoren oder Zytostatika wie Topotecan ergeben, da es sich in Versuchen dieser Arbeit zeigte, dass Skepinone-L BCRP in Caco-2/TC7 Zellen zu inhibieren scheint. Aus diesem inhibitorischen Effekt können sich jedoch auch therapeutische Vorteile ergeben, indem Skepinone-L die Permeabilität von BCRP-Substraten steigert und somit die Resistenzen von Zielgeweben kompensiert. Ein wirksamkeitssteigernder Effekt konnte in einer Studie beobachtet werden, bei welcher Skepinone-L zusammen mit Sorafenib appliziert wurde [138]. Sorafenib, ein zur peroralen Applikation geeigneter Multikinaseinhibitor, welcher unter anderem für die Behandlung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) zugelassen ist, unterliegt häufig einer Limitierung seiner Wirksamkeit, weshalb zugrundeliegende Resistenzmechanismen in HCC-Zellen diskutiert werden [138-140]. Die Arbeitsgruppe um Rudalska et al. [138] stellte eine erhöhte Aktivität der MAPK14 (p38 α) in Sorafenib-resistenten HCC-Zellen fest, wobei der Einsatz des p38 α -MAPK-Inhibitors Skepinone-L zu einer Inhibierung der p38 α -MAPK und Wirksamkeitssteigerung von Sorafenib führte. Daher postulierten die Autoren, dass der Resistenzmechanismus von Sorafenib-resistenten HCC-Zellen aufgrund von einer Überexpression der MAPK14 entsteht und durch Inhibierung eben dieser kompensiert werden kann. Sorafenib ist jedoch ein affines BCRP-Substrat [141, 142]. BCRP wiederum wird sowohl in gesundem als auch in entartetem Lebergewebe exprimiert, wo es die Exkretion von Xenobiotika aus Hepatozyten über die canalikuläre Membran in die Galle fördert [143, 144]. Daher könnte der von Rudalska et al. beobachtete Effekt möglicherweise nicht nur in der Inhibierung der p38 α -MAPK begründet sein, sondern ebenfalls durch eine durch Skepinone-L verursachte BCRP-Inaktivierung und durch resultierende gesteigerte intrahepatozelluläre Wirkkonzentrationen von Sorafenib vermittelt sein.

4.3 Schlussfolgernde Anmerkungen

Potente und selektive Inhibitoren der p38 α -MAPK bieten neue Ansätze zur Behandlung von Erkrankungen wie der RA, CEDs, COPD und Tumorerkrankungen. Vielversprechende Wirkstoffkandidaten sind Skepinone-L, FS089, FS100 und SK807, welche eine ausreichend hohe Permeabilität durch Caco-2/TC7 Zellen aufweisen. Somit ist für diese Verbindungen eine schnelle und vollständige Absorption in vivo zu erwarten. Das hydrophilere Dihydroxypropoxy-Dibenzosuberone Skepinone-L weist eine höhere Permeabilität auf als die Morpholinoethoxy-Derivate FS089, FS100 und SK807. Dies ist durch Folgendes zu begründen: a) Die Morpholinoethoxy-Regioisomere erfahren im Gegensatz zu Skepinone-L eine ausgeprägte intrazelluläre Anreicherung und b) Skepinone-L permeiert vorrangig passiv durch Caco-2/TC7 Zellen, während die Morpholinoethoxy-Regioisomere einem Efflux durch die aktiven Transporter P-Gp, BCRP und MRP2 unterliegen.

Obwohl sich die Strukturen von FS089, FS100 und SK807 lediglich in der Positionierung der der Morpholinoethoxy-Seitenkette unterscheiden, unterliegen die Regioisomere einem unterschiedlich stark ausgeprägten Transport durch die aktiven Effluxproteine P-Gp, BCRP und MRP2. Während die Aufnahme von FS100 hauptsächlich durch P-Gp limitiert wird, erfolgt die Permeation von SK807 über die apikale Membran von Caco-2/TC7 Zellen in Abhängigkeit von MRP2. Daraus ergeben sich die festgestellten Unterschiede in der Wirkeffizienz der Verbindungen im Vollblutassay [20]: Durch die geringe Expression von MRP2 im hämatopoetischen System ist SK807 im Gegensatz zu den P-Gp- und BCRP-Substraten FS089 und FS100 zur Überwindung der Zellmembranen und somit zur Inhibierung der intrazellulär gelegenen p38 α -MAPK befähigt. Das in Position 7 substituierte SK807 bietet daher unter den Morpholinoethoxy-Dibenzosuberonen die vielversprechendste Verbindung für weitere Testungen. Da die Gesamtpermeabilität aller drei Verbindungen ausreichend hoch war, ist nicht mit einer eingeschränkten in vivo Absorption zu rechnen. Allerdings können beim Einsatz im klinischen Alltag Drug-Drug Interaktionen (DDIs) mit anderen Substraten/Inhibitoren von P-Gp, BCRP oder MRP2 auftreten, wie zum Beispiel mit Digoxin oder Statinen. Einen großen Vorteil bietet daher das Transporter-unabhängig permeierende Skepinone-L.

Obwohl schon seit Jahrzehnten an den Mechanismen hinter dem Phänomen der Multidrug Resistance (MDR) ausführlichst geforscht wurde, ist bis heute kein Inhibitor für die verantwortlichen Effluxtransporter auf dem Markt [40]. Gründe sind entweder unzureichende

Potenz oder mangelnde Selektivität und daraus resultierende Toxizität. Dadurch besteht immer noch ein großer Bedarf an der weiteren Entwicklung und Untersuchung von geeigneten Inhibitoren. Diese Arbeit ergab Hinweise auf eine nicht kompetitive Inhibierung von BCRP durch Skepinone-L. Dies könnte einen großen Potenzgewinn gegenüber den viel häufiger auftretenden kompetitiven Inhibitoren bedeuten, da der Effekt nicht durch affinere Substrate verringert werden kann.

Die vorliegende Arbeit konnte somit herausstellen, dass der potente und selektive p38 α -MAPK-Inhibitor Skepinone-L kein Substrat für P-Gp, BCRP oder MRP2 darstellt und eine erfolgreiche und wechselwirkungsarme perorale Administration daher sehr wahrscheinlich ist. Weiterhin ergab sich mit der effektiven, nicht auf kompetitive Wechselwirkungen zurückzuführenden BCRP-Inhibierung ein neues mögliches Einsatzgebiet für Skepinone-L.

5 Literaturverzeichnis

1. Koeberle, S.C., et al., *Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor*. *Nat Chem Biol*, 2012. **8**(2): p. 141-143.
2. Giacomini, K.M. and S.M. Huang, *Transporters in Drug Development and Clinical Pharmacology*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2013. **94**(1): p. 3-9.
3. Choudhuri, S. and C.D. Klaassen, *Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphisms of Human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) Efflux Transporters*. *International Journal of Toxicology*, 2006. **25**(4): p. 231-259.
4. European Medicines Agency (EMA), *Guideline on the Investigation of Drug Interactions*. Jun 2012.
5. Food and Drug Administration (FDA), *Guidance for Industry: Drug Interaction Studies –Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing and Labeling Recommendations*. Feb 2012.
6. Schett, G., J. Zwerina, and G. Firestein, *The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis*. *Annals of the rheumatic diseases*, 2008. **67**(7): p. 909-916.
7. Cuenda, A. and S. Rousseau, *p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2007. **1773**(8): p. 1358-1375.
8. Kaminska, B., *MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005. **1754**(1): p. 253-262.
9. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2004. **68**(2): p. 320-344.
10. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1*. *Endocrine reviews*, 2001. **22**(2): p. 153-183.
11. Millan, D.S., et al., *Design and synthesis of inhaled p38 inhibitors for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease*. *Journal of medicinal chemistry*, 2011. **54**(22): p. 7797-7814.
12. Wagner, E.F. and Á.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. *Nature Reviews Cancer*, 2009. **9**(8): p. 537-549.
13. Thalhamer, T., M. McGrath, and M. Harnett, *MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation*. *Rheumatology*, 2008. **47**(4): p. 409-414.
14. Munoz, L., et al., *A novel p38 α MAPK inhibitor suppresses brain proinflammatory cytokine up-regulation and attenuates synaptic dysfunction and behavioral deficits in an Alzheimer's disease mouse model*. *Journal of neuroinflammation*, 2007. **4**(1): p. 21.
15. Igea, A. and A.R. Nebreda, *The Stress Kinase p38 α as a Target for Cancer Therapy*. *Cancer research*, 2015. **75**(19): p. 3997-4002.
16. Bühler, S. and S.A. Laufer, *p38 MAPK inhibitors: a patent review (2012 – 2013)*. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2014. **24**(5): p. 535-554.
17. Laufer, S.A., et al., *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Phenylamino-Substituted 6, 11-Dihydro-dibenzo [b, e] oxepin-11-ones and Dibenzo [a, d] cycloheptan-5-ones: Novel p38 MAP Kinase Inhibitors*. *Journal of medicinal chemistry*, 2006. **49**(26): p. 7912-7915.
18. Cohen, S.B., et al., *Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis*. *Arthritis & Rheumatism*, 2009. **60**(2): p. 335-344.

19. Hill, R.J., et al., *Pamapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor: preclinical analysis of efficacy and selectivity*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008. **327**(3): p. 610-619.
20. Koeberle, S.C., et al., *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Disubstituted Dibenzosuberones as Highly Potent and Selective Inhibitors of p38 Mitogen Activated Protein Kinase*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012. **55**(12): p. 5868-5877.
21. Stenberg, P., et al., *Experimental and Computational Screening Models for the Prediction of Intestinal Drug Absorption*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2001. **44**(12): p. 1927-1937.
22. Artursson, P., K. Palm, and K. Luthman, *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. **64**: p. 280-289.
23. Hidalgo, I.J. and J. Li, *Carrier-mediated transport and efflux mechanisms in Caco-2 cells*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996. **22**(1-2): p. 53-66.
24. Klaassen, C.D. and L.M. Aleksunes, *Xenobiotic, Bile Acid, and Cholesterol Transporters: Function and Regulation*. *Pharmacological Reviews*, 2010. **62**(1): p. 1-96.
25. Marquez, B. and F. Van Bambeke, *ABC Multidrug Transporters: Target for Modulation of Drug Pharmacokinetics and Drug-Drug Interaction*. *Current drug targets*, 2011. **Vol. 12, Nr. 5, May**: p. 600-620.
26. *Discover Clarity in Transporters: Transporter Primer*. 2013, Absorption Systems.
27. Ieiri, I., S. Higuchi, and Y. Sugiyama, *Genetic polymorphisms of uptake (OATP1B1, 1B3) and efflux (MRP2, BCRP) transporters: implications for inter-individual differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins and other clinically relevant drugs*. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2009. **5**(7): p. 703-729.
28. Hilgendorf, C., et al., *Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007. **35**(8): p. 1333-1340.
29. Mealey, K.L., et al., *Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene*. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2001. **11**(8): p. 727-733.
30. Aller, S.G., et al., *Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding*. *Science*, 2009. **323**(5922): p. 1718-1722.
31. Ni, Z., et al., *Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. *Current drug metabolism*, 2010. **11**(7): p. 603.
32. Zelcer, N., et al., *Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2)*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(26): p. 23538-23544.
33. Dietrich, C.G., A. Geier, and R.P.J. Oude Elferink, *ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut*. *Gut*, 2003. **52**(12): p. 1788-1795.
34. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987. **84**(21): p. 7735-7738.
35. Englund, G., et al., *Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006. **29**(3-4): p. 269-277.
36. Mottino, A.D., et al., *Expression and Localization of Multidrug Resistant Protein mrp2 in Rat Small Intestine*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000. **293**(3): p. 717-723.
37. Mouly, S. and M. Paine, *P-Glycoprotein Increases from Proximal to Distal Regions of Human Small Intestine*. *Pharmaceutical Research*, 2003. **20**(10): p. 1595-1599.

38. Jedlitschky, G., U. Hoffmann, and H.K. Kroemer, *Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2006. **2**(3): p. 351-366.
39. *Discover Clarity in Transporters: Transporter Reference Guide*. 2012, Absorption Systems.
40. Ecker, G. and P. Chiba, *Transporters as Drug Carriers: Structure, Function, Substrates*, ed. R. Mannhold, H. Kubinyi, and G. Folkers. Vol. 44. 2009: Wiley-VCH.
41. Deeley, R.G., C. Westlake, and S.P.C. Cole, *Transmembrane Transport of Endo- and Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassette Multidrug Resistance Proteins*. Physiological Reviews, 2006. **86**(3): p. 849-899.
42. Higgins, C.F. and K.J. Linton, *The ATP switch model for ABC transporters*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(10): p. 918-926.
43. Rosenberg, M.F., et al., *The human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) shows conformational changes with mitoxantrone*. Structure, 2010. **18**(4): p. 482-493.
44. Williamson, G., et al., *Interaction of Positional Isomers of Quercetin Glucuronides with the Transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2)*. Drug Metabolism and Disposition, 2007. **35**(8): p. 1262-1268.
45. Fromm, M.F., *Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers*. Trends in Pharmacological Sciences, 2004. **25**(8): p. 423-429.
46. Kirn, R.B., et al., *Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein*. Pharmaceutical research, 1999. **16**(3): p. 408-414.
47. Benet, L., C. Cummins, and C. Wu, *Transporter-enzyme interactions: implications for predicting drug-drug interactions from in vitro data*. Current drug metabolism, 2003. **4**(5): p. 393-398.
48. Zhou, S.-F., *Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4*. Current Drug Metabolism, 2008. **9**(4): p. 310-322.
49. Watkins, P.B., *The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **27**(2-3): p. 161-170.
50. Christians, U., *Transport Proteins and Intestinal Metabolism: P-Glycoprotein and Cytochrome P4503A*. Therapeutic Drug Monitoring, 2004. **26**(2): p. 104-106.
51. Christians, U., V. Schmitz, and M. Haschke, *Functional interactions between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2005. **1**(4): p. 641-654.
52. Tolson, A.H. and H. Wang, *Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(13): p. 1238-1249.
53. Callaghan, R., R.C. Ford, and I.D. Kerr, *The translocation mechanism of P-glycoprotein*. FEBS Letters, 2006. **580**(4): p. 1056-1063.
54. Rosenberg, M.F., et al., *Three-dimensional Structure of P-glycoprotein: THE TRANSMEMBRANE REGIONS ADOPT AN ASYMMETRIC CONFIGURATION IN THE NUCLEOTIDE-BOUND STATE*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(4): p. 2857-2862.
55. Gottesman, M.M. and I. Pastan, *BIOCHEMISTRY OF MULTIDRUG RESISTANCE MEDIATED BY THE MULTIDRUG TRANSPORTER*. Annual reviews of biochemistry, 1993. **62**: p. 385-427.
56. Martin, C., C.F. Higgins, and R. Callaghan, *The Vinblastine Binding Site Adopts High- and Low-Affinity Conformations during a Transport Cycle of P-glycoprotein†*. Biochemistry, 2001. **40**(51): p. 15733-15742.
57. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *The Drug-Binding Pocket of the Human Multidrug Resistance P-Glycoprotein Is Accessible to the Aqueous Medium*. Biochemistry, 2004. **43**.
58. Dey, S., et al., *Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein*. Proceedings of the

- National Academy of Sciences, 1997. **94**(20): p. 10594-10599.
59. Martin, C., et al., *Communication between Multiple Drug Binding Sites on P-glycoprotein*. *Molecular Pharmacology*, 2000. **58**(3): p. 624-632.
 60. Tamai, I. and A.R. Safa, *Azidopine noncompetitively interacts with vinblastine and cyclosporin A binding to P-glycoprotein in multidrug resistant cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(25): p. 16796-16800.
 61. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *Substrate-induced Conformational Changes in the Transmembrane Segments of Human P-glycoprotein: DIRECT EVIDENCE FOR THE SUBSTRATE-INDUCED FIT MECHANISM FOR DRUG BINDING*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(16): p. 13603-13606.
 62. Ekins, S., et al., *Future directions for drug transporter modelling*. *Xenobiotica*, 2007. **37**(10-11): p. 1152-1170.
 63. Chang, C., et al., *Pharmacophore-based discovery of ligands for drug transporters*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**(12-13): p. 1431-1450.
 64. Ueda, K., Y. Taguchi, and M. Morishima, *How does P-glycoprotein recognize its substrates?* *Seminars in Cancer Biology*, 1997. **8**(3): p. 151-159.
 65. Langer, T., et al., *Lead Identification for Modulators of Multidrug Resistance based on in silico Screening with a Pharmacophoric Feature Model*. *Archiv der Pharmazie*, 2004. **337**(6): p. 317-327.
 66. Ecker, G., et al., *The Importance of a Nitrogen Atom in Modulators of Multidrug Resistance*. *Molecular Pharmacology*, 1999. **56**(4): p. 791-796.
 67. Seelig, A. and E. Landwojtowicz, *Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000. **12**(1): p. 31-40.
 68. Cairo, M.S., et al., *Clinical Trial of Continuous Infusion Verapamil, Bolus Vinblastine, and Continuous Infusion VP-16 in Drug-resistant Pediatric Tumors*. *Cancer Research*, 1989. **49**(4): p. 1063-1066.
 69. Benson, A.B., et al., *Phase I study of vinblastine and verapamil given by concurrent iv infusion*. *Cancer treatment reports*, 1985. **69**(7-8): p. 795-799.
 70. Scheithauer, W., et al., *Phase I/II trial of dexverapamil, epirubicin and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1995. **121**(3): p. R7-R10.
 71. Bissett, D., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of D-verapamil and doxorubicin*. *British Journal of Cancer*, 1991. **64**(6): p. 1168-1171.
 72. Plumb, J.A., R. Milroyf, and S.B. Kaye, *The activity of verapamil as a resistance modifier in vitro in drug resistant human tumour cell lines is not stereospecific*. *Biochemical Pharmacology*, 1990. **39**(4): p. 787-792.
 73. Lajos Pusztai, et al., *Phase II Study of Tariquidar, a Selective P-glycoprotein Inhibitor, in Patients with Chemotherapy-Resistant, Advanced Breast Carcinoma*. *Cancer*, 2005. **104**(4).
 74. Kuppens, I.E.L.M., et al., *A Phase I, Randomized, Open-Label, Parallel-Cohort, Dose-Finding Study of Elacridar (GF120918) and Oral Topotecan in Cancer Patients*. *Clinical Cancer Research*, 2007. **13**(11): p. 3276-3285.
 75. Kelly, R.J., et al., *A Pharmacodynamic Study of Docetaxel in Combination with the P-glycoprotein Antagonist Tariquidar (XR9576) in Patients with Lung, Ovarian, and Cervical Cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2011. **17**(3): p. 569-580.
 76. Doyle, L.A. and D.D. Ross, *Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)*. *Oncogene*, 2003. **22**(47): p. 7340-7358.
 77. Maliepaard, M., et al., *Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues*. *Cancer research*, 2001. **61**(8): p. 3458-3464.

78. Leslie, E.M., R.G. Deeley, and S.P.C. Cole, *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005. **204**(3): p. 216-237.
79. Giacomini, K.M., et al., *Membrane transporters in drug development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(3): p. 215-236.
80. Mao, Q., *Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport*. *The AAPS journal*, 2005. **7**(1): p. E118-E133.
81. Krishnamurthy, P. and J. Schuetz, *Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2006. **46**: p. 381-410.
82. Schinkel, A.H. and J.W. Jonker, *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(1): p. 3-29.
83. Jonker, J.W., et al., *Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000. **92**(20): p. 1651-1656.
84. Generaux, G.T., et al., *Impact of SLCO1B1 (OATP1B1) and ABCG2 (BCRP) genetic polymorphisms and inhibition on LDL-C lowering and myopathy of statins*. *Xenobiotica*, 2011. **41**(8): p. 639-651.
85. Kruijtzter, C., et al., *Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918*. *Journal of Clinical Oncology*, 2002. **20**(13): p. 2943-2950.
86. Haimeur, A., et al., *The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation*. *Curr Drug Metab*, 2004. **5**(1): p. 21-53.
87. Kage, K., et al., *Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization*. *International journal of cancer*, 2002. **97**(5): p. 626-630.
88. Ishikawa, T., et al., *Expression and functional characterization of human ABC transporter ABCG2 variants in insect cells*. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 2003. **18**(3): p. 194-202.
89. Rosenberg, M.F., et al., *Three-dimensional structure of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in an inward-facing conformation*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2015. **71**(8): p. 1725-1735.
90. van Loevezijn, A., et al., *Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2001. **11**(1): p. 29-32.
91. Rost, D., et al., *Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(5): p. 1203-1208.
92. König, J., et al., *MRP2, the apical export pump for anionic conjugates*. *ABC proteins: from bacteria to man*. Academic, London, 2003: p. 423-443.
93. zu Schwabedissen, H.E.M., et al., *Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation*. *Drug metabolism and disposition*, 2005. **33**(7): p. 896-904.
94. Depeille, P., et al., *Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects*. *Molecular pharmacology*, 2004. **65**(4): p. 897-905.
95. Dubin, I. and F.B. Johnson, *CHRONIC IDIOPATHIC JAUNDICE WITH UNIDENTIFIED PIGMENT IN LIVER CELLS*. *Medicine*, 1954. **33**(3): p. 155-198.
96. König, J., et al., *Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1999. **1461**(2): p. 377-394.
97. Evers, R., et al., *Vinblastine and sulfapyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated*

- with glutathione export. *British journal of cancer*, 2000. **83**(3): p. 375.
98. Rappa, G., et al., *Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins*. *Cancer Research*, 1997. **57**(23): p. 5232-5237.
 99. Reddy, B.B.K. and A. Karunakar, *Biopharmaceutics Classification System: A Regulatory Approach*, in *Dissolution Technologies*. 2011.
 100. Wu, C.-Y. and L.Z. Benet, *Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system*. *Pharmaceutical research*, 2005. **22**(1): p. 11-23.
 101. Pinto, M., *Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture*. *Biology of the Cell*, 1983. **47**(3).
 102. Artursson, P., *Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1991. **8**(4): p. 305-30.
 103. Yang, X.-w., et al., *Establishment of Caco-2 cell monolayer and standard operation procedure for assessing intestinal absorption of chemical components of traditional Chinese medicine*. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2007. **5**(6).
 104. Hidalgo, I.J., T.J. Raub, and R.T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. *Gastroenterology*, 1989. **96**(3): p. 736-49.
 105. Spielberger, K.N., *Quantum dots als Instrumente in der Arzneistoffforschung: Eigenschaften und Aufnahmemechanismen*, in *Pharmazeutische Technologie*. 2014, Universität Tübingen.
 106. Carriere, V., et al., *Expression of cytochrome P-450 3A in HT29-MTX cells and Caco-2 clone TC7*. *FEBS Lett*, 1994. **355**(3): p. 247-50.
 107. Raeissi, S.D., et al., *Comparison of CYP3A activities in a subclone of Caco-2 cells (TC7) and human intestine*. *Pharm Res*, 1997. **14**(8): p. 1019-25.
 108. Grès, M.C., et al., *Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line*. *Pharm Res*, 1998. **15**(5): p. 726-33.
 109. Artursson, P., *Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1990. **79**(6): p. 476-482.
 110. Tanaka, Y., et al., *Characterization of drug transport through tight-junctional pathway in Caco-2 monolayer: comparison with isolated rat jejunum and colon*. *Pharmaceutical research*, 1995. **12**(4): p. 523-528.
 111. Amidon, G.L., P.I. Lee, and E.M. Topp, *Biological Transport Phenomena in the Gastrointestinal Tract: Cellular Mechanisms*, in *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*. 2000, Marcel Dekker, Inc.: New York, Basel. p. 147-184.
 112. Walter, E., et al., *HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: In vitro–in vivo correlation with permeability data from rats and humans*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1996. **85**(10): p. 1070-1076.
 113. Artursson, P. and J. Karlsson, *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991. **175**(3): p. 880-885.
 114. Yee, S., *In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth*. *Pharmaceutical research*, 1997. **14**(6): p. 763-766.
 115. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. 2003, Kiel: Thieme.
 116. Berginc, K., et al., *Fluorescein transport properties across artificial lipid*

- membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007. **66**(2): p. 281-285.
117. Weisblum, B. and E. Haenssler, *Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA*. *Chromosoma*, 1974. **46**(3): p. 255-260.
118. Seigel, G.M. and L.M. Campbell, *High-throughput microtiter assay for Hoechst 33342 dye uptake*. *Cytotechnology*, 2004. **45**(3): p. 155-160.
119. Scharenberg, C.W., M.A. Harkey, and B. Torok-Storb, *The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors*. *Blood*, 2002. **99**(2): p. 507-512.
120. Ingels, F.M. and P.F. Augustijns, *Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003. **92**(8): p. 1545-1558.
121. Palmgrén, J.J., et al., *Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006. **64**(3): p. 369-378.
122. Baur, B., et al., *Metabolically Stable Dibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ones as Highly Selective p38 MAP Kinase Inhibitors: Optimizing Anti-Cytokine Activity in Human Whole Blood*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013. **56**(21): p. 8561-8578.
123. Leslie, E.M., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1)*. *Drug metabolism and disposition*, 2003. **31**(1): p. 11-15.
124. Cullen, K.V., R.A. Davey, and M.W. Davey, *Verapamil-stimulated glutathione transport by the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in leukaemia cells*. *Biochemical pharmacology*, 2001. **62**(4): p. 417-424.
125. Loe, D.W., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1)*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000. **293**(2): p. 530-538.
126. Gekeler, V., et al., *The Leukotriene LTD4 Receptor Antagonist Mk571 Specifically Modulates MRP Associated Multidrug Resistance*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995. **208**(1): p. 345-352.
127. Leier, I., et al., *The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(45): p. 27807-10.
128. Minich, T., et al., *The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes*. *Journal of neurochemistry*, 2006. **97**(2): p. 373-384.
129. Gupta, A., et al., *HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2004. **310**(1): p. 334-341.
130. Hammarlund-Udenaes, M. and L.Z. Benet, *Furosemide pharmacokinetics and pharmacodynamics in health and disease—An update*. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, 1989. **17**(1): p. 1-46.
131. de Jonge-Peeters, S.D., et al., *ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance*. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2007. **62**(3): p. 214-226.
132. Zlokovic, B.V., *The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders*. *Neuron*, 2008. **57**(2): p. 178-201.
133. Löscher, W. and H. Potschka, *Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family*. *NeuroRx*, 2005. **2**(1): p. 86-98.
134. Meier, Y., et al., *Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette*

- (ABC)–transporter expression in human liver. *Hepatology*, 2006. **44**(1): p. 62-74.
135. Bhatia, P., et al., *Determination and modelling of stereoselective interactions of ligands with drug transporters: A key dimension in the understanding of drug disposition*. *Xenobiotica*, 2008. **38**(7-8): p. 656-675.
136. Prueksaritanont, T., et al., *Differences in the absorption, metabolism and biliary excretion of a diastereomeric pair of α v β 3 - antagonists in rat: limited role of P-glycoprotein*. *Xenobiotica*, 2002. **32**(3): p. 207-220.
137. Storch, K., *Untersuchungen zum Metabolismus und Pharmakokinetik neuer p 38 alpha Kinase Inhibitoren*. 2014.
138. Rudalska, R., et al., *In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer*. *Nat Med*, 2014. **20**(10): p. 1138-1146.
139. Zhai, B. and X.-Y. Sun, *Mechanisms of resistance to sorafenib and the corresponding strategies in hepatocellular carcinoma*. *World journal of hepatology*, 2013. **5**(7): p. 345.
140. Chen, K.-F., et al., *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011. **337**(1): p. 155-161.
141. Agarwal, S., et al., *The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011. **336**(1): p. 223-233.
142. Lagas, J.S., et al., *Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation*. *Molecular cancer therapeutics*, 2010. **9**(2): p. 319-326.
143. Vander Borght, S., et al., *Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is expressed by progenitor cells/reactive ductules and hepatocytes and its expression pattern is influenced by disease etiology and species type: possible functional consequences*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2006. **54**(9): p. 1051-1059.
144. Faber, K.N., M. Müller, and P.L.M. Jansen, *Drug transport proteins in the liver*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(1): p. 107-124.
145. Hubatsch, I., E.G.E. Ragnarsson, and P. Artursson, *Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers*. *Nat. Protocols*, 2007. **2**(9): p. 2111-2119.
146. Balimane, P.V. and S. Chong, *Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique*. *Drug Discovery Today*, 2005. **10**(5): p. 335-343.
147. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 2011: Springer-Verlag.

6 Anhang

6.1 Löslichkeit der Morpholinoethoxy-Derivate

Zur Untersuchung der Löslichkeit der Testverbindungen wurden die Stammlösungen in DMSO mit HBSS auf 100 μM verdünnt (Endkonzentration DMSO: 1 %). HBSS wurde vorher auf den entsprechenden pH eingestellt (7,4; 6,2; 4,2 und 2,3). Ab pH 6,2 hat sich bei allen Morpholinoethoxy-Regioisomeren ein sichtbarer Niederschlag gebildet.

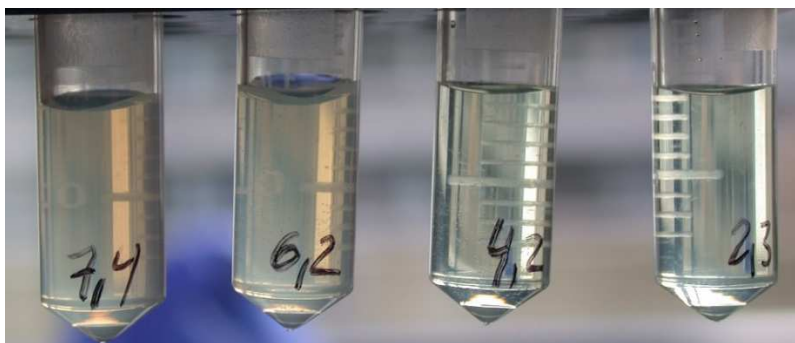
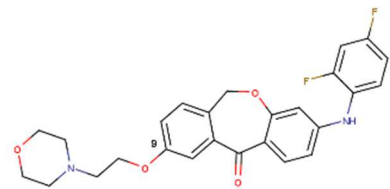


Abb. 32: pH-Abhängige Löslichkeit von BB400

Exemplarische Aufnahme der Testsubstanz BB400



Die erhaltenen Prüflösungen wurden unter Aufnahme eines Spektrums UV-metrisch vermessen, 5 min bei 9840 g zentrifugiert und der Überstand anschließend erneut photometrisch vermessen. Der ab pH 6 makroskopisch sichtbare Niederschlag war photometrisch durch eine erhöhte Absorption im Bereich 500–900 nm (außerhalb des Absorptionsmaximums bei 360 nm) für alle Proben außer pH 2,3 erkennbar (*Diagramm 24*). Nach Zentrifugation der Proben sank die Absorption der Proben bei pH 7,4, 6,2 und 5 im Bereich 500–900 nm wieder ab, was ebenfalls für das Vorhandensein eines Niederschlages sprach.

Zusammenfassend ließen sich vollständig gelöste Testlösungen der Morpholinoethoxy-Derivate in einer Konzentration von 100 μM in HBSS ausschließlich bei pH-Werten < 4,5 herstellen (*Diagramm 25*). Ab einer Konzentration von 10 μM und pH 7,4 war UV-metrisch kein Niederschlag feststellbar (*Diagramm 26*), weshalb für alle weiteren Studien keine höheren Konzentrationen als 10 μM verwendet wurden.

Diagramm 24: pH-abhängige Löslichkeit von SK807

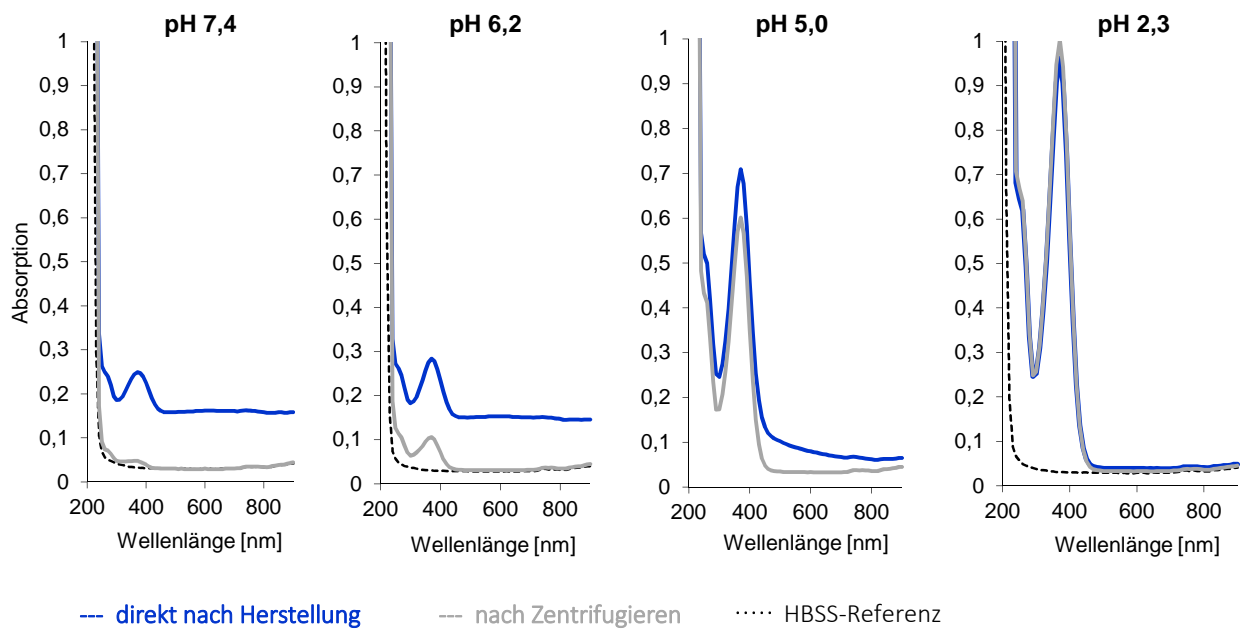
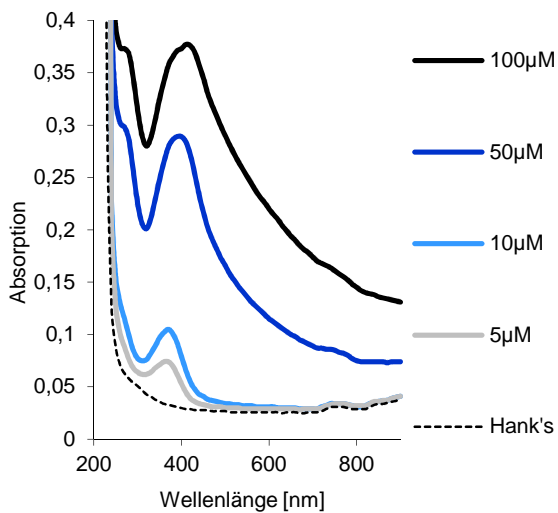
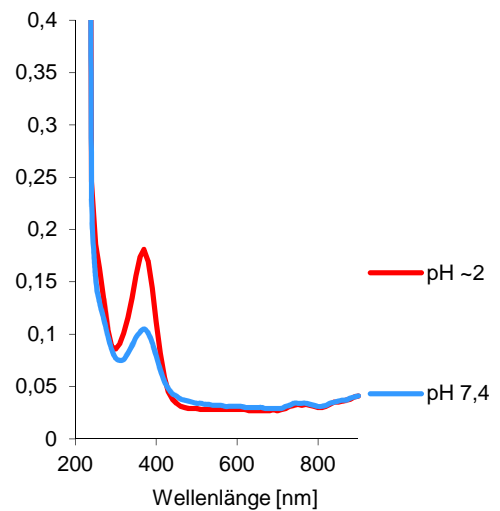


Diagramm 25: Konzentrations-abhängige Löslichkeit von SK807 bei pH 7,4



Erst unterhalb einer Konzentration von 10 µM ist UV-metrisch kein Niederschlag mehr zu detektieren.

Diagramm 26: Löslichkeit von SK807 10 µM bei pH 2 und pH 7,4



Bei einer Konzentration von 10 µM ist UV-metrisch kein Niederschlag mehr zu detektieren. Der Bereich bei 500 – 900 nm ist deckungsgleich mit der Kurve bei pH 2 (bei diesem pH-Wert liegt SK807 vollständig gelöst vor).

6.2 pH-Spezies Verteilungen

Für die Entwicklung einer HPLC-Methode zur Quantifizierung der untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren wurden pH-Spezies Tabellen erstellt. Mithilfe dieser Tabellen wurde ein pH-Wert ausgewählt, bei welchem alle Verbindungen zu über 90 % in einer Spezies vorliegen, um Schwankungen der Retentionszeiten zu vermeiden (pH 2,3 bzw. 8,0; siehe 2.4.2). Es wurden alle Verbindungen berücksichtigt, welche simultan in einer zu quantifizierenden Probe enthalten waren.

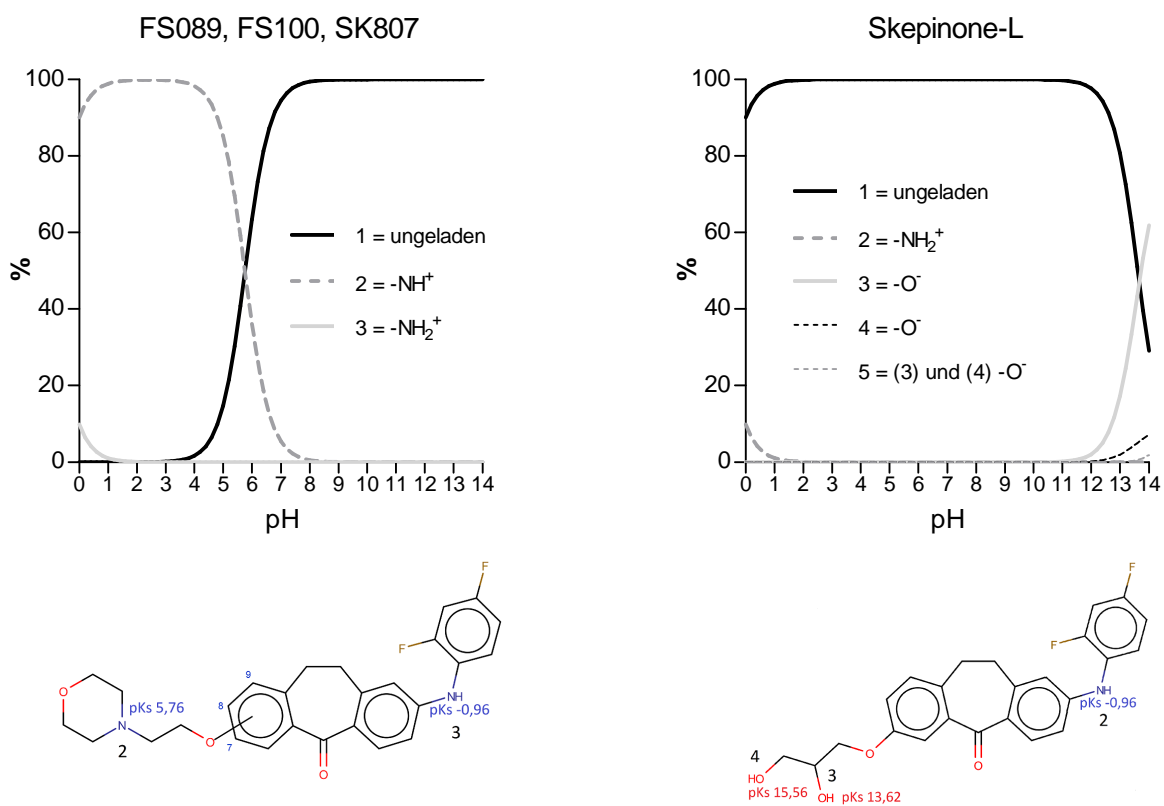


Abb. 33: pH-Spezies

Daten kalkuliert mit MarvinSketch Software

6.3 Volumenverhältnisse im Transwellsystem

Corning Life Sciences empfiehlt bei Verwendung der 12-Well Transwellsysteme ein Volumen von 0,5 mL für das apikale Kompartiment beziehungsweise 1,5mL für das basolaterale Kompartiment für die Kultivierung. Allerdings sollten diese Volumina für die durchgeführten Absorptions- und Aufnahmestudien aufgrund geringer Permeabilitäten verringert werden, um die Endkonzentration der bestimmten APIs in den jeweiligen Kompartimenten zu erhöhen.

Beispiele für geringere Volumina aus verschiedenen Arbeiten sind in *Abb. 34* zusammengefasst.

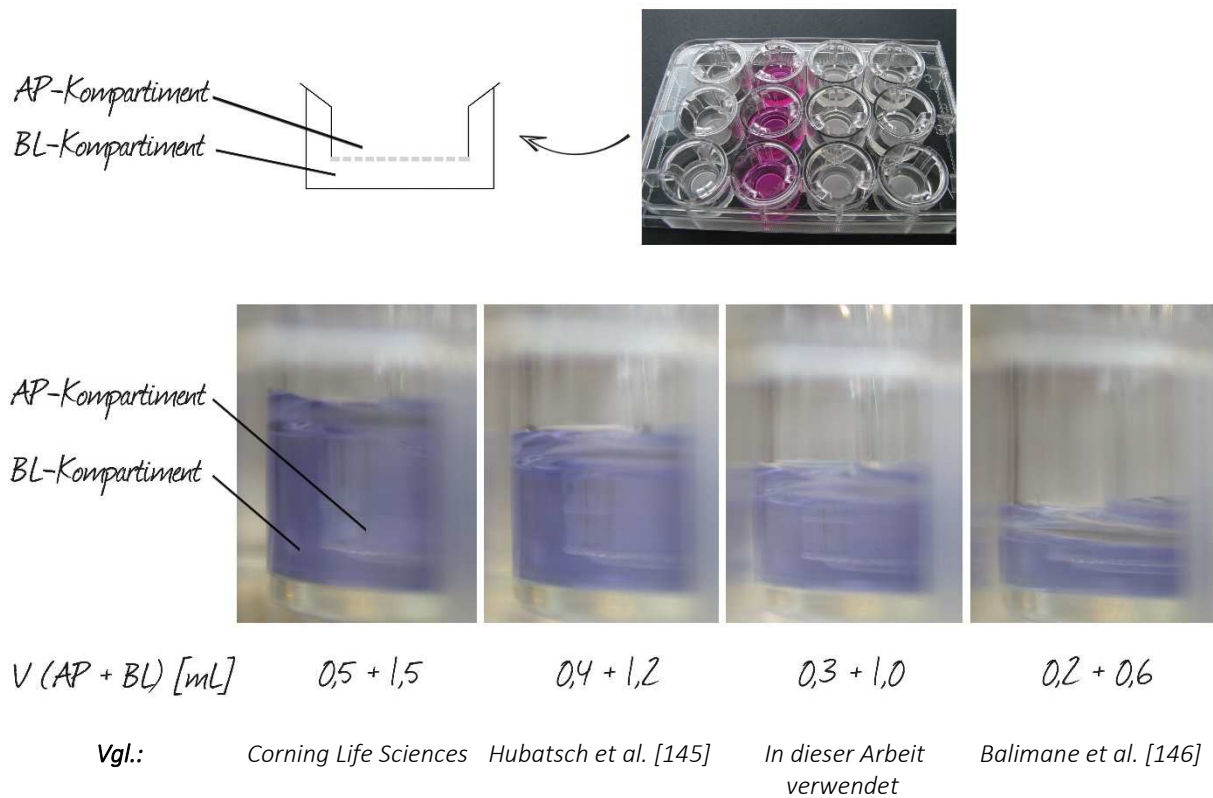


Abb. 34: Volumenverhältnisse im Transwellsystem

6.4 Dichtigkeit und Vitalität von Caco-2/TC7 Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert

6.4.1 Dichtigkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die wie unter 2.1 *Zellkulturflege* beschrieben in Transwells kultivierten Zellen wurden in HBSS bei verschiedenen pH-Werten für 180 min inkubiert (Schüttelwasserbad, 37 °C, 67 spm). Der Transepitheliale Elektrische Widerstand (TEER) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und in der Auswertung auf den jeweiligen Startwert bezogen (siehe *Diagramm 27*). Im Anschluss an die TEER-Messung wurden die Zellen durch Zugabe von Trypanblau (*Abb. 35*) angefärbt und mikroskopiert.

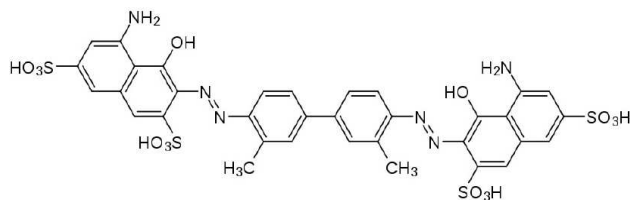
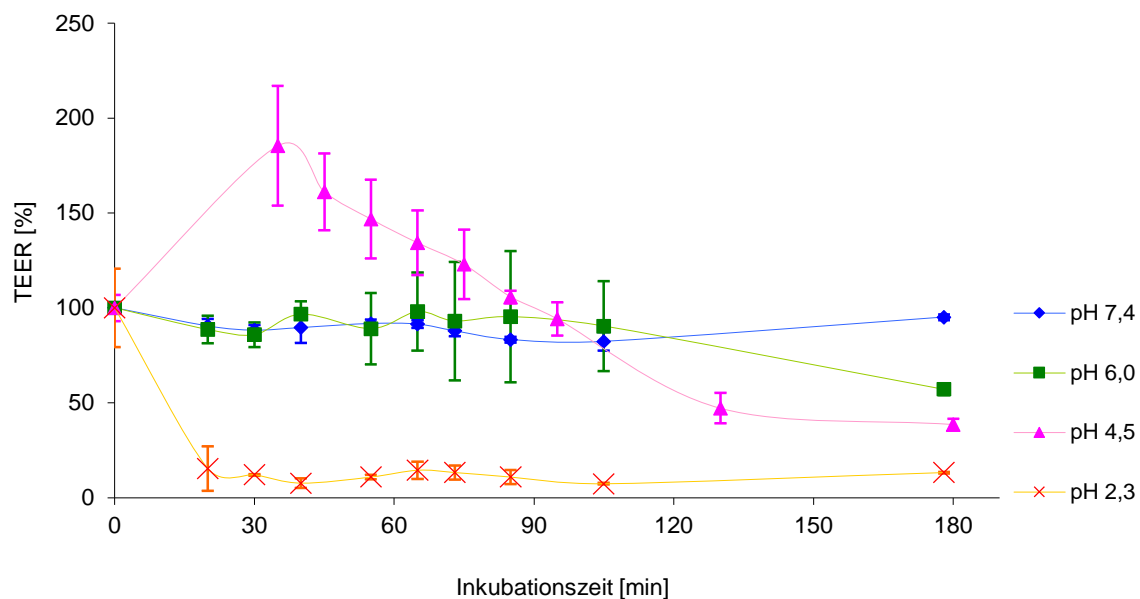


Abb. 35: Trypanblau

Aufgrund der Größe und negativen Ladung des Moleküls bei pH 7 durchdringt Trypanblau nur beschädigte Membranen und eignet sich daher zur Anfärbung abgestorbener Zellen [147].

Diagramm 27: TEER in Abhängigkeit des pH-Wertes



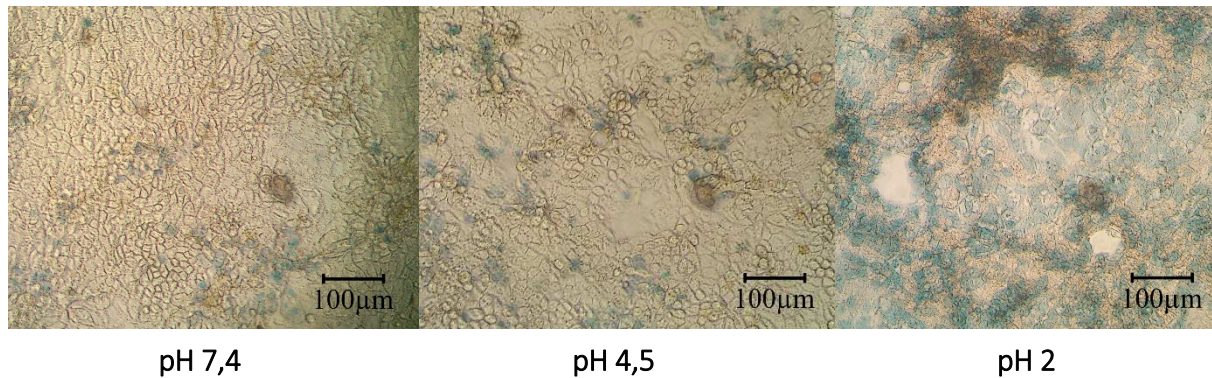


Abb. 36: Makroskopie von Caco-2/TC7 Zellen in Abhängigkeit des pH-Wertes

Die Zellen wurden nach 180 min Inkubationsphase mit Trypanblau angefärbt und mikroskopiert.

Während bei pH 7,4 der TEER über den kompletten Versuchszeitraum von 180 min konstant blieb, war bei pH 6 ein leichtes Absinken ab ca. 100 min zu beobachten. Bei einem pH-Wert von 4,5 stieg der TEER-Wert innerhalb der ersten 30 min auf ca. 170 % des ursprünglichen Wertes an, um anschließend konstant abzusinken. Ab einer Inkubationsdauer von 100 min unterschritt die Dichtigkeit der Zellen den ursprünglichen Wert. Bei einem pH von 2 war der TEER bereits ab der ersten Messung nach 20 min stark abgesunken. Dass die Dichtigkeit der Zellen bei diesem pH-Wert nicht mehr gewährleistet war, ließ sich ebenfalls mikroskopisch feststellen. Hier war eine deutliche Blaufärbung und stark beschädigte Bereiche im Monolayer zu erkennen (siehe *Abb. 36*).

6.4.2 Vitalität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die wie unter *2.1 Zellkulturpflege* in 96-Well Assayplatten ausgesäten und für 8 Tage kultivierten Zellen wurden für 120 min in DPBS bei verschiedenen pH-Werten inkubiert (CO₂-Inkubator, 5 % CO₂, 37 °C, 98 % rF). Anschließend wurde jedem Well 10 µL WST-1 Reagenz zugefügt und erneut für 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 440 und 600 nm (Referenzwellenlänge) vermessen. Die erhobenen Daten wurden auf die Werte bei pH 7 normiert.

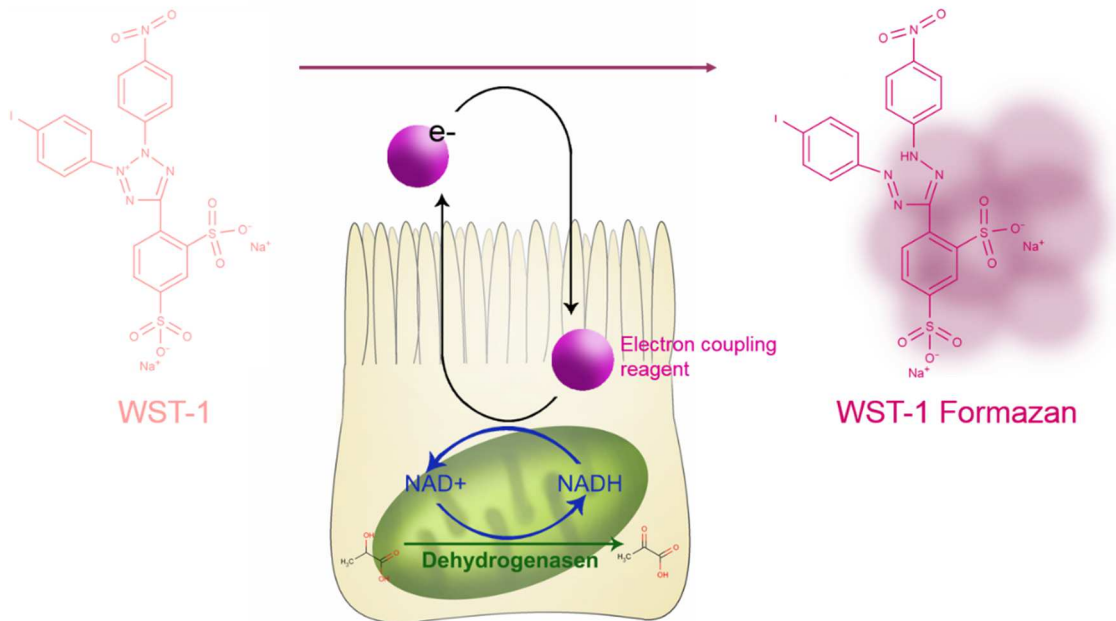


Abb. 37: WST-1 Proliferationstest Test

Proliferierende Zellen setzen durch mitochondrial gelegene Dehydrogenasen NAD^+ zu NADH um. Bei diesem Prozess wird ein Elektron (e^-) frei, welches an ein Kupplungsprotein gebunden (Electron coupling reagent) auf der apikalen Seite der Zelle ausgeschleust wird. Das Tetrazoliumsalz WST-1 (water soluble tetrazolium) wird bei Anwesenheit von Elektronen zum intensiv gefärbten WST-1 Formazan reduziert, welches ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 420–480 nm aufweist. Die Menge an gebildetem Formazan ist direkt von der Proliferationsrate abhängig, welche wiederum in proportionalem Zusammenhang zur Zellvitalität steht.

Diagramm 28: Zeitverlauf WST-1 Test

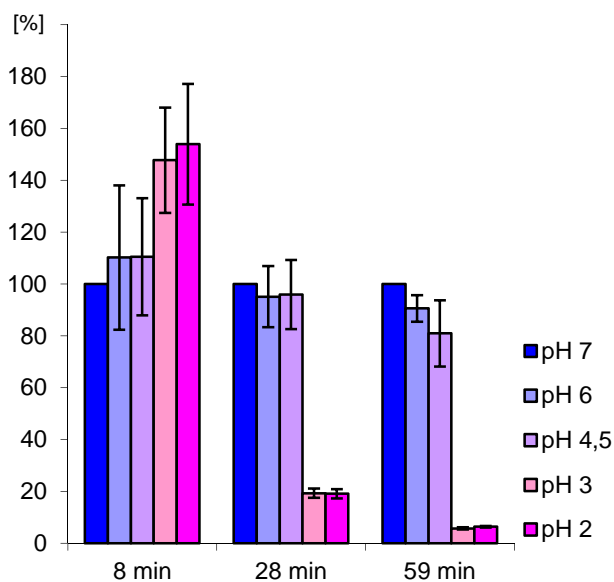
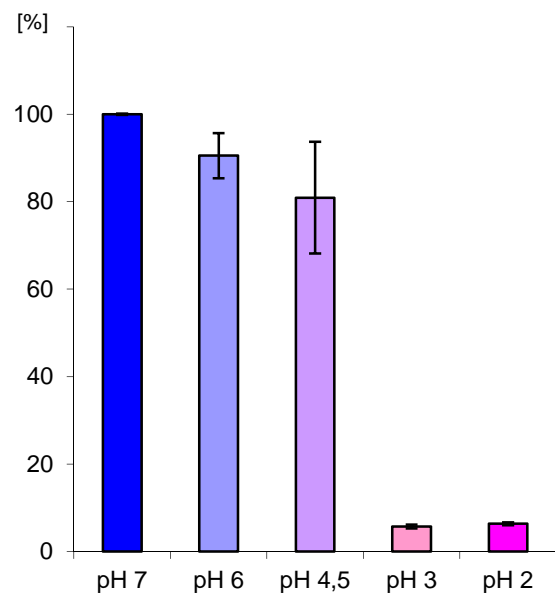


Diagramm 29: Zellvitalität in Abhängigkeit des pH-Wertes



WST-1 Test nach 120 min Inkubationszeit für die pH-Testlösungen und anschließend 60 min WST-1.

Die Umsetzung von WST-1 bei geringen pH-Werten (2 und 3) stieg zunächst stark an (*Diagramm 28*). Dies ist mit der Beschädigung der Zellmembran zu begründen, wodurch intrazellulär gelegene Dehydrogenasen und NAD^+ freigesetzt werden. Dadurch wird die komplette Menge an vorhandenem NAD^+ zu NADH unter Freisetzung von Elektronen durch die Dehydrogenasen umgewandelt. Durch die Elektronen-abhängige Umsetzung von WST-1 zum farbigen Formazan (*Abb. 37*), war die Absorption initial höher als die der Kontrollgruppe, die Umsetzung stagnierte jedoch nachdem alle Elektronen verbraucht wurden. Die Zellen der Kontrollgruppe proliferierten weiterhin und setzten daher zeitabhängig mehr WST-1 um.

Nach einem Inkubationszeitraum von 120 min bei den entsprechenden pH-Werten und anschließendem WST-1 Test für 60 min war eine Beeinträchtigung der Zellvitalität bereits ab einem pH-Wert von 6 zu beobachten. Bei pH 4,5 betrug die Zellvitalität nach 120 min lediglich 80 % und bei pH 3 und 2 weniger als 10 % (*Diagramm 29*).

6.5 Fluoreszenzfärbungen

In Aufnahmestudien wurde eine ausgeprägte intrazelluläre Anreicherung der untersuchten Dibenzosuberonderivate festgestellt (siehe 3.2.4). Um die genaue intrazelluläre Lokalisation der Verbindungen zu untersuchen, wurden Präparate angefertigt, welche fluoreszenzmikroskopisch beurteilt wurden. Da die untersuchten Dibenzosuberonderivate eine Autofluoreszenz aufwiesen, war eine Anregung/Emission im blauen Bereich möglich (siehe Tab. 17).

Tab. 17: Anregungs- und Emissionsbereiche verwendeter Färbereagenzien

Wellenlänge	Verbindung	Zielantigen	Anregungsbereich λ_{Ex}	Emissionsbereich λ_{Em}
nm 400 violett 400 455 nm blau 455 492 nm	Dibenzosuberone		385 nm	420 – 500 nm
	Hoechst 33342	Zellkern / DNA	340 / 355 nm frei / DNA-gebunden	510 / 465 nm frei / DNA-gebunden
500 grün 492 577 nm	Alexa Fluor 488 Phalloidin	Zytoskelett / F-Aktin	495 nm	518 nm
gelb 577 597 nm				
600 orange 597 620 nm				
rot 620 700 nm	Propidium Iodid	Zellkern / DNA	493 / 535 nm frei / DNA-gebunden	636 / 617 nm frei / DNA-gebunden

6.5.1 Färbeprotokoll

Hierzu wurden Caco-2/TC7 Zellen zu 3×10^4 Zellen in 12-Wellplatten auf Deckgläsern (18 x 18 mm) ausgesät und für 21 – 28 Tage unter im Kapitel 2.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden 3 Mal mit HBSS gespült bevor die entsprechende Testlösung (10 μ M API in HBSS, 1 % DMSO) aufgegeben wurde. Anschließend erfolgte ein Inkubationszeitraum von 4 Stunden im CO₂-Inkubator. Folgend wurde 3 Mal mit DPBS gespült, um die Testlösung zu entfernen. Anschließend wurden die Deckgläser in eine Glaspetrischale überführt und mit Aceton (vorgekühlt auf -20 °C) für 10 min bei -20 °C fixiert und

permeabilisiert. Nach drei Waschschrinen (mit DPBS für jeweils 15 min) erfolgte eine Inkubation mit BSA 1 % für 30 min um Adsorptionsoberflächen abzusättigen und unspezifische Adsorption der Farbstoffe zu vermeiden. Nach dem Entfernen der BSA-Lösung erfolgte eine Färbung des Zytoskeletts mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (6,6 μ M) für 20 min. Nach zweifachem Spülen mit DPBS wurden die Zellkerne mit Propidium Iodid (500 nM) für 5 min eingefärbt. Die Präparate wurden nach zweifachem Spülen mit DPBS für 15 min zugedeckt trocken gelassen und anschließend nach dem Eindeckeln (ProLong Gold) für weitere 24 h trocken gelassen. Die Präparate wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Zeiss AxioImager Z.1 mit ApoTome-Einheit betrachtet.

6.5.2 Fluoreszenzfärbungen

Hoechst 33342 dringt in die Zellkerne ein und markiert die DNA durch Bindung an Adenin- und Thymin-reiche Bereiche [117]. In *Abb. 38* ist zu erkennen, dass das durch den Hoechst 33342-DNA-Komplex ausgelöste Emissionssignal auf die Zellkerne beschränkt ist (Vgl. die rote Färbung der Zellkerne durch Propidium Iodid). Die Referenzprobe (Blank), welche nur mit HBSS inkubiert wurden, zeigte im blauen Bereich eine diffus verteilte Autofluoreszenz.

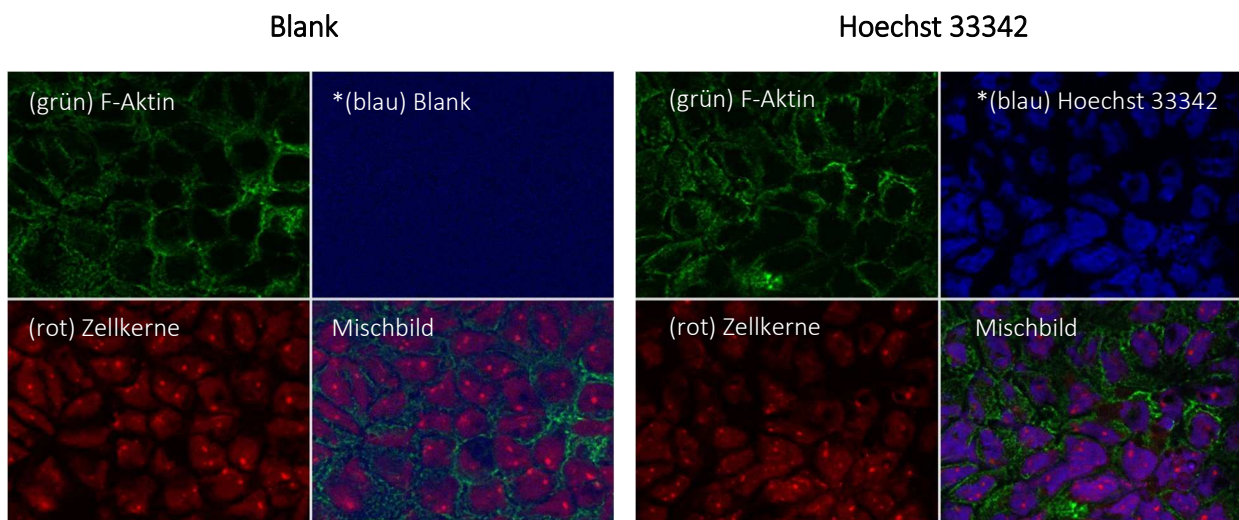


Abb. 38: Fluoreszenzfärbungen (Blank und Hoechst 33342)

Die Präparate, welche mit Dibenzosuberonderivaten inkubiert wurden, zeigten eine Fluoreszenz im blauen Emissionsbereich (*Abb. 39*). Die Fluoreszenz war im gesamten

Zellbereich sichtbar, jedoch deutlich abgegrenzt durch das Zytoskelett. Das Signal war gleichmäßig im Intrazellularraum und Zellkern verteilt.

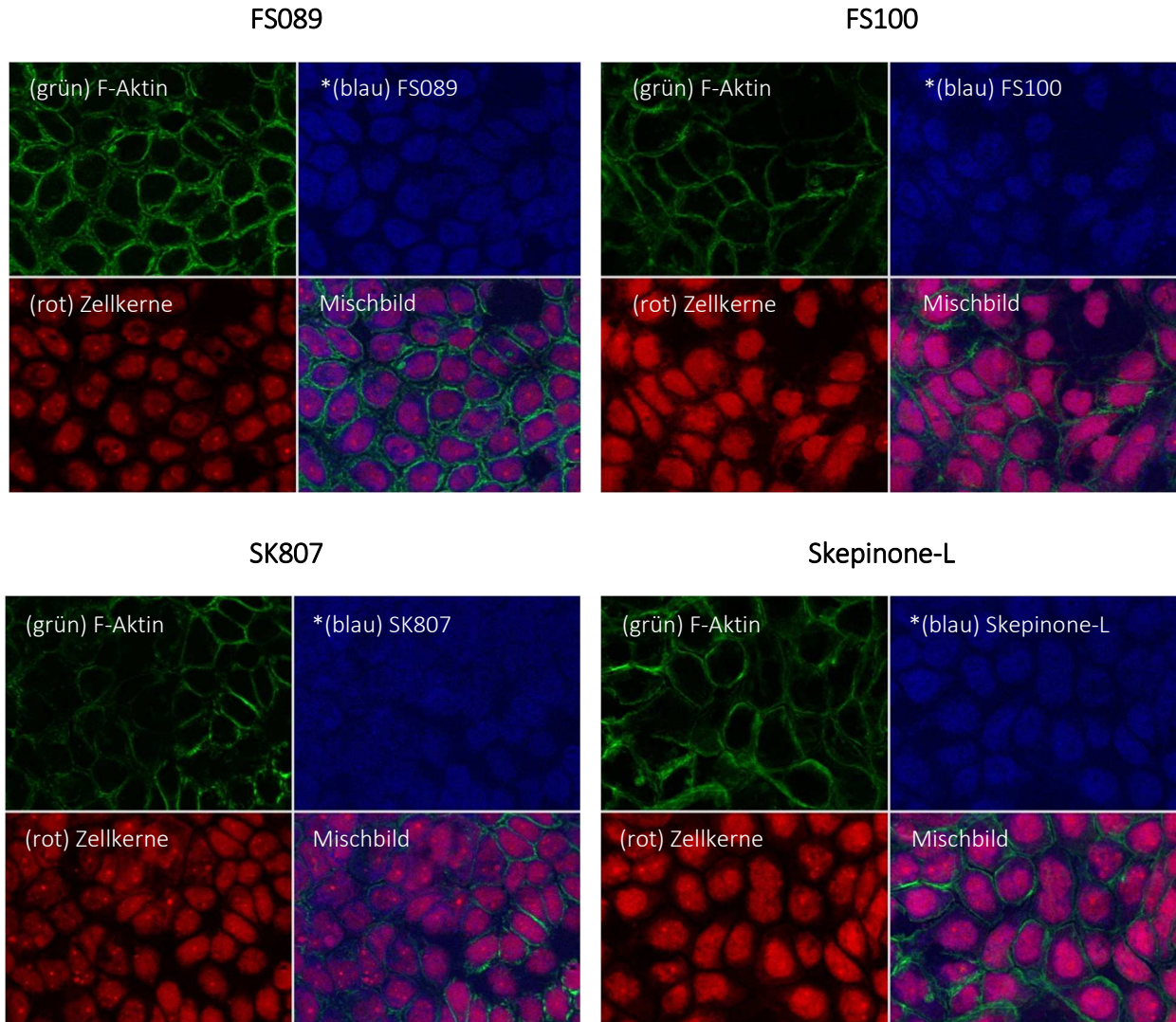


Abb. 39: Fluoreszenzfärbungen (Dibenzosuberonderivate)

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte die in den Aufnahmestudien (3.2.4) festgestellte intrazelluläre Anreicherung somit visualisiert werden. Eine spezifische Bindung an bestimmte Zellorganellen konnte hier nicht festgestellt werden, da sich die Verbindungen gleichmäßig im Intrazellularraum zu verteilen scheinen.

6.6 Morphologische Entwicklung von Caco-2/TC7 Zellen

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (vgl. 6.5.2) sollten Caco-2/TC7 Zellen auf Deckgläsern ausgesät werden. Um zu untersuchen, ob die Zellen auf dem Glas gut anwachsen und dichte Monolayer ausbilden, wurde eine mikroskopische Verlaufskontrolle durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen am Tag 1, 3 und 9 nach Aussaat in der Zellkulturflasche (PTFE-behandelt), im Transwellsystem (PE-Membran) und auf Deckgläsern mikroskopiert und verglichen (siehe *Abb. 40*).

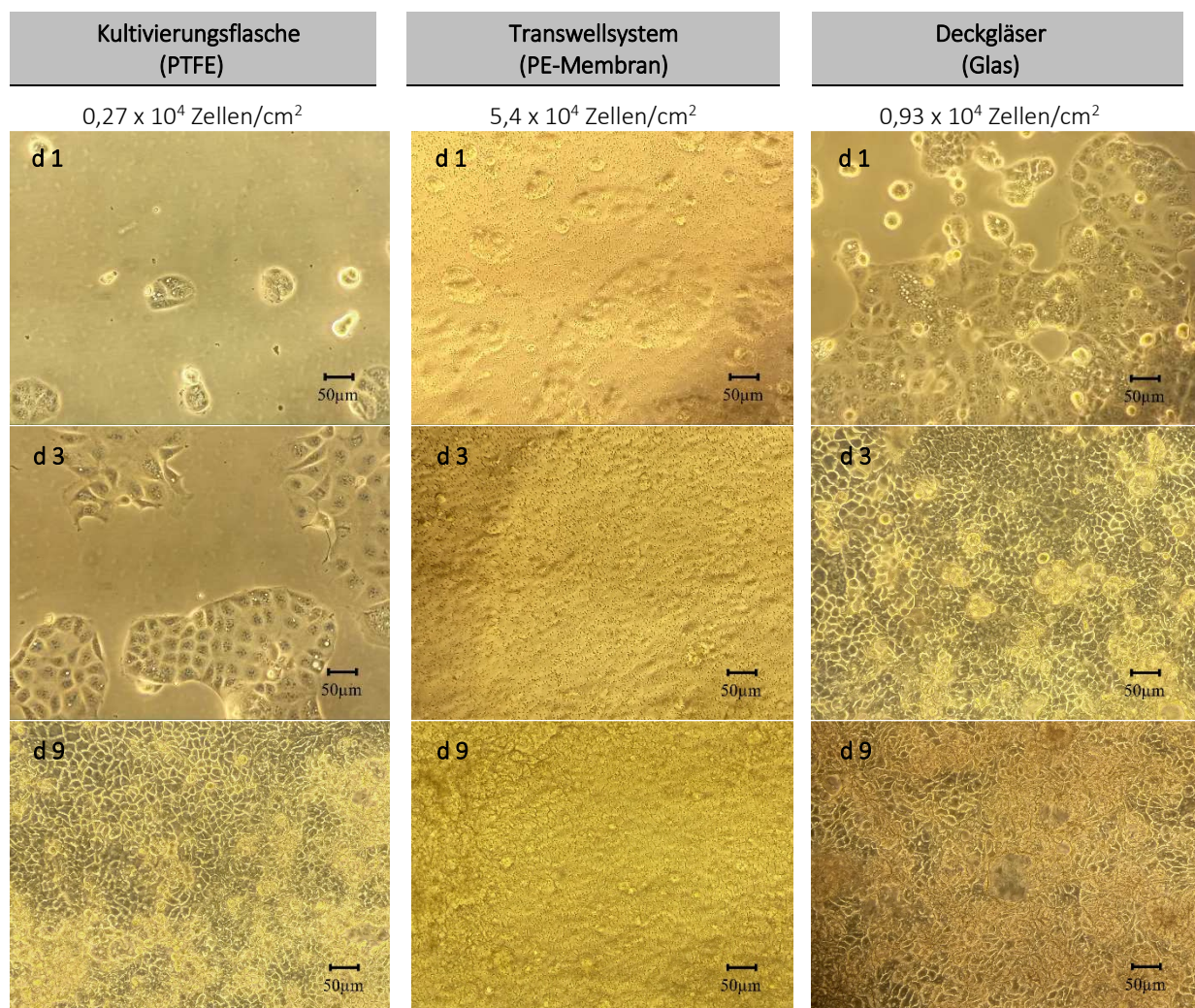


Abb. 40: Morphologische Entwicklung von Caco-2/TC7 Zellen

PTFE = ,Polytetrafluorethylen, PE = Polyethylen

Die Zellen, welche in einer Kultivierungsflasche und im Transwellsystem auf einer PE-Membran ausgesät wurden, benötigten durchschnittlich 5-7 Tage, bis zum Erreichen der Konfluenz. Im Vergleich hierzu wuchsen Zellen, welche auf Deckgläsern ausgesät wurden, bereits innerhalb von 1-3 Tagen zu einem dichten Monolayer zusammen.

Um die biochemische Differenzierung der Zellen zu ermöglichen, welche erst nach der Konfluenz einsetzt [23, 104], wurden die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie ebenfalls für 21-28 Tage kultiviert.

Appendix

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur von Skepinone-L und seiner Derivate	9
Abb. 2: Epitheliale Transportmechanismen	11
Abb. 3: Beispiele für gastrointestinale Transporter und ihre Substrate	13
Abb. 4: Gewebeverteilung von Transportern.....	20
Abb. 5: Topologie von ABC-Transportern.....	21
Abb. 6: Co-Expression von P-Gp und CYP3A4	23
Abb. 7: P-Gp Efflux Mechanismus.....	24
Abb. 8: P-Gp-Inhibitoren	26
Abb. 9: BCRP-Inhibitoren.....	28
Abb. 10: MRP2-Inhibitoren	30
Abb. 11: Biopharmaceutical Classification System (BCS)	31
Abb. 12: Adhärierende Caco-2/TC7 Zellen	32
Abb. 13: apikale Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen	32
Abb. 14: Korrelation zwischen Bioverfügbarkeit und p_{app} -Werten.....	34
Abb. 15: Vergleich von Absorptionsoberflächen im Intestinum und Caco-2 Zellen	34
Abb. 16: Transwellsystem	37
Abb. 17: Strukturformeln der eingesetzten Inhibitoren.....	38
Abb. 18: Tight Junctions	40
Abb. 19: TEER-Messung	40
Abb. 20: Fluorescein-Na	41
Abb. 21: Aufnahmestudien, Extraktion der bewachsenen Membran	43
Abb. 22: BCA-Assay.....	44
Abb. 23: Hoechst 33342	45
Abb. 24: Zellkernfärbung mit Hoechst 33342	45
Abb. 25: Hoechst 33342 Aufnahme.....	46
Abb. 26: Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsbedingungen.....	55
Abb. 27: Resuspendierung in Acetonitril (ACN) und Methanol (MetOH).....	56

Abb. 28: Verteilungsverhalten in absorptiver Richtung	69
Abb. 29: Verteilungsverhalten in sekretorischer Richtung.....	75
Abb. 30: Oberflächenverhältnis im Transwellsystem	78
Abb. 31: Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit von der Transportrichtung	79
Abb. 32: pH-Abhängige Löslichkeit von BB400	I
Abb. 33: pH-Spezies.....	III
Abb. 34: Volumenverhältnisse im Transwellsystem	IV
Abb. 35: Trypanlau	V
Abb. 36: Makroskopie von Caco-2/TC7 Zellen in Abhängigkeit des pH-Wertes	VI
Abb. 37: WST-1 Proliferationstest Test	VII
Abb. 38: Fluoreszenzfärbungen (Blank und Hoechst 33342).....	X
Abb. 39: Fluoreszenzfärbungen (Dibenzosuberonderivate)	XI
Abb. 40: Morphologische Entwicklung von Caco-2/TC7 Zellen	XII

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: HPLC-Chromatogramme	49
Diagramm 2: Massenbilanz in Abhängigkeit vom Lösungsmittel.....	57
Diagramm 3: Peakflächen nach Direktinjektion und nach Aufreinigung.....	58
Diagramm 4: Chromatogramme nach Direktinjektion und nach Aufreinigung	58
Diagramm 5: Chromatogramm für Proben aus Permeationsstudien	59
Diagramm 6: Permeation von Referenzverbindungen	60
Diagramm 7: Permeation von p38a-MAPK-Inhibitoren.....	62
Diagramm 8: FS089. Inhibitionsstudien; Permeation und Effluxrate	63
Diagramm 9: FS100. Inhibitionsstudien; Permeation und Effluxrate	64
Diagramm 10: SK807. Inhibitionsstudien; Permeation und Effluxrate	64
Diagramm 11: Skepinone-L. Inhibitionsstudien; Permeation und Effluxrate.....	64
Diagramm 12: Aufnahmestudien.....	66
Diagramm 13: Aufnahme der Morpholinoethoxy-Regioisomere	67
Diagramm 14: Aufnahme von Skepinone-L und Rhodamin123	67
Diagramm 15: Multiinhibierung von P-Gp, BCRP und MRP2	71

Diagramm 16: Massenbilanz von FS089.....	72
Diagramm 17: Massenbilanz von FS100.....	73
Diagramm 18: Massenbilanz von SK807	73
Diagramm 19: Massenbilanz von Rhodamin 123	74
Diagramm 20: Massenbilanz von Skepinone-L	75
Diagramm 21: Adsorptionsverhalten von p38 α -MAPK-Inhibitoren	77
Diagramm 22: BCRP-Inhibierungs Assay: Prüfung auf Eignung des Testsystems	80
Diagramm 23: Dibenzosuberonderivate als Inhibitoren für BCRP.....	81
Diagramm 24: pH-abhängige Löslichkeit von SK807	II
Diagramm 25: Konzentrations-abhängige Löslichkeit von SK807 bei pH 7,4.....	II
Diagramm 26: Löslichkeit von SK807 10 μ M bei pH 2 und pH 7,4.....	II
Diagramm 27: TEER in Abhängigkeit des pH-Wertes	V
Diagramm 28: Zeitverlauf WST-1 Test.....	VII
Diagramm 29: Zellvitalität in Abhängigkeit des pH-Wertes	VII

Formelverzeichnis

Formel 1: 1. Fick'sches Diffusionsgesetz	11
Formel 2: Diffusionskoeffizient	11
Formel 3: Verteilungskoeffizient.....	11
Formel 4: TEER.....	40
Formel 5: apparenter Permeationskoeffizient.....	42
Formel 6: Effluxrate	43
Formel 7: Wiederfindungsrate.....	43

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Eigenschaften der Dibenzosuberone	8
Tab. 2: Beispiele klinischer, Transporter-verursachter DDIs	16
Tab. 3: MDR-Transporter.....	17
Tab. 4: Ausgesäte Zellen und Filterdurchmesser	38

Tab. 5: Zusammensetzung von Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	39
Tab. 6: Eingesetzte Inhibitoren	39
Tab. 7: Probenzugsvolumina	42
Tab. 8: Inhaltsstoffe des Pierce BCA Assay Kits	44
Tab. 9: Quantifizierung via HPLC.....	49
Tab. 10: Quantifizierung via Fluoreszenzspektroskopie	49
Tab. 11: Kalibrierungen für Permeations und Aufnahmestudien	51
Tab. 12: Kalibrierungen für Adsorptionsstudien	51
Tab. 13: Reagenzien und Chemikalien für die Zellkultur	52
Tab. 14: Reagenzien und Chemikalien für Experimente	52
Tab. 15: Materialien für die Zellkultur	53
Tab. 16: verwendete Geräte	53
Tab. 17: Anregungs- und Emissionsbereiche verwendeter Färbereagenzien.....	IX

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorgestellt:

Nelli Peters, Martin A. Wahl, Influence of efflux transporters on uptake and permeation of the p38 α -MAPK inhibitor Skepinone-L and its analogues, Transporter- und Barrieretage 2015, Bad Herrenalb, 11th – 13th May 2015 (Poster)

Nelli Peters, Martin A. Wahl, Transport mechanism and intracellular uptake of p38 α -MAP kinase inhibitors, International PhD Students/Postdocs Meeting 2015 of the German Pharmaceutical Society (DPhG), Biberach, 18th – 20th March 2015 (Poster)

Nelli Peters, Martin A. Wahl, Transcellular transport mechanism of p38 α MAP kinase inhibitors FS089, FS100 and SK807, AAPS annual meeting and exposition, San Diego, November 2nd – 6th 2014 (Poster)

Nelli Peters, Martin A. Wahl, freeze-drying method for purification and enrichment of samples obtained from permeation studies with caco-2/TC7 cells, DPhG annual conference, Freiburg, October 9th – 11th 2013 (Poster)