

**Pharmakokinetische und
molekularpharmakodynamische Aspekte
inhalativ angewandter Glucocorticoide**

DISSERTATION

zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Anagnostis Valotis
aus Krinides/Kavala (Griechenland)

Würzburg 2005

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Petra Högger

im Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie
des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt

*Γία τήν Οικογένεια μου
Αντονία, Σοφία καί Μηχαέλα*

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Originalpublikationen:

Valotis A.; Neukam K.; Elert O.; Högger P.
Human receptor kinetics, tissue binding affinity, and stability of mometasone furoate.
J Pharm Sci. **2004** May; 93(5):1337-50.

Valotis A.; Högger P.
Significant receptor affinities of metabolites and a degradation product of mometasone furoate.
Respir Res. **2004** Jul 22; 5(1):7.

Freiwald M.; Valotis A.; Kirschbaum A.; McClellan M.; Mürdter T.; Fritz P.; Friedel G.; Thomas M.; Högger P.
Monitoring the initial pulmonary absorption of two different beclomethasone dipropionate aerosols employing a human lung reperfusion model.
Respir Res. **2005** Feb 24; 6(1):21.

Posterbeiträge:

Valotis A.; Högger P.
Rezeptorkinetik, Gewebefindung und Stabilität von Mometasonfuroat in biologischen Proben.
DPhG-Jahrestagung 2003, Würzburg.

Valotis A.; Högger P.
Mometasone furoate forms active metabolites and an active degradation product.
Eur Respir J. **2004** Sep; 24(Suppl. 48):346-7.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich direkt oder indirekt bei der Entwicklung, Bearbeitung und Durchführung der Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dr. Petra Högger für die Aufnahme in Ihren Arbeitskreis und die Überlassung eines aktuellen und interessanten Themas. Ohne Ihre geduldige, wissenschaftlich anregende und vor allem auch freundschaftliche Art wäre diese Arbeit in dieser Form nicht entstanden.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Roswitha Skrabala für die exzellente technische Assistenz vor allem bei der Durchführung der Gewebestudienn und ihre kompromisslose, tageszeitunabhängige Einsatzbereitschaft bedanken.

Dr. Keith B. Biggadike und seinem Team, GlaxoSmithKline, Greenford, UK, danke ich für die Bereitstellung der Glucocorticoide und die finanzielle Unterstützung.

Frau Dr. Ursula Rdest, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Mikrobiologie, möchte ich für das große Vertrauen in mich danken, durch das sie es mir ermöglichte, die Messungen zur Rezeptorkinetik im Isotopenlabor durchzuführen.

Herrn Dr. Manfred Jachmann und dem ganzen OP-Team, Klinik Michelsberg, danke ich für die unkomplizierte und kontinuierliche Zusammenarbeit und die Möglichkeit, eine Lobektomie direkt vor Ort verfolgen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Olaf Elert und Dr. Konrad Neukam, Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie, danke ich für die Bereitstellung von Gewebepuben.

Herrn Dr. Ulrich Käppler möchte ich für die ^1H - und ^{13}C -NMR-Messungen und die anschließenden sehr komplexen, kontroversen Diskussionen (...“ist das jetzt ein dd oder doch ein mp“...), die zu einer erfolgreichen Interpretation der Ergebnisse geführt haben, danken.

Bedanken möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Peter Schreier, Frau Dr. Dominique Kavvadias und insbesondere Herrn Michael Kraus, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, für die Durchführung der LC-MS/MS-Messungen.

Herrn Dr. Nikolaus Stiefl „Nik“ und Joseph Scheiber „Sepp“ danke ich für die Berechnung der Mol-Files und die Erstellung der zugehörigen Graphiken.

Prof. Dr. Georg Krohne, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Elektronenmikroskopie, danke ich für die kompetente Einführung in die REM.

PD. Dr. Knut Baumann danke ich für zahlreiche Diskussionen mathematischer und privater Natur. Zur Wahrscheinlichkeit gehört auch, dass das Unwahrscheinliche eintritt.

Bei Frau Barbara Gareiß, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Mikrobiologie, bedanke ich mich für die fachkundige Einführung in die Technik des *Real-time-PCR* Gerätes.

Meinen Kollegen im Biochemie-Praktikum Dr. Ralph Deubner, Dr. Ulrich Käßler, Angelika Schäfer, Meike Timmermann, Christine Weber und Dr. Rainer Zipf, danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die zuverlässige Planung und Durchführung der Praktikumsstunden.

Den Mitgliedern meines Arbeitskreises Samar Afify, Matthias Freiwald „Matse“, Tanja Grimm „Tänscha“, Nicole Rauschert „Niki“, Angelika Schäfer, Roswitha Skrabala „Rosi“, Julia Thern und Meike Timmermann danke ich für die tolle Zeit, den Spaß und das freundschaftliche Verhältnis. Dies alles werde ich sehr vermissen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Käßler „Uli“ für die unersetzliche Zeit und die Freundschaft, die mir sehr viel bedeutet.

Herrn Michael Kraus danke ich für seine Fürsorge und Aufmerksamkeit, mit der er mich immer bedachte.

Für das äußerst aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Ulrich Käßler, Meike Timmermann und ganz besonders Julia Thern für den englischen Teil.

Nicht vergessen möchte ich die tolle Besetzung der Instituts-Werkstatt Matthias Völker, Karl Vollmuth und Georg Walter.

Aber zuletzt möchte ich den Personen danken, die zwar keinen wissenschaftlichen Einfluss auf die Arbeit hatten, ohne deren Liebe, Vertrauen und Geduld diese Arbeit jedoch niemals zu Stande gekommen wäre. Danke Hildegard, Danke Antonia, Danke Sophia, Danke Michaela.

*„Der Beginn aller Wissenschaften
ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind“*

Aristoteles

Inhaltsverzeichnis:**A. Einleitung**

1	Einleitung	3
1.1	Molekulare Grundlagen der Glucocorticoidwirkung.....	4
1.1.1	Funktionelle Domänen des humanem Glucocorticoidrezeptors (hGR)	4
1.1.2	Struktur des humanen Glucocorticoidrezeptors (hGR).....	5
1.1.3	Glucocorticoidwirkungen auf molekularer Ebene	6
1.2	Pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften topisch angewandter Glucocorticoide	8
1.2.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen.....	8
1.2.2	Bioverfügbarkeit.....	11
1.2.3	Arzneiformen und Applikationssysteme	12
1.2.4	Plasmaproteinbindung	14
1.2.5	Gewebebindung.....	14
1.2.6	Metabolismus und Elimination	15
1.2.7	Prodrug-Prinzip	15
1.2.8	Rezeptoraffinität und klinische Potenz.....	16

B. Allgemeiner Teil

1	Bestimmung der relativen Rezeptoraffinität (RRA) von Glucocorticoiden	21
1.1	Zielsetzung	21
1.2	Prinzip der Untersuchungen und Durchführung	21
1.2.1	Bestimmung der RRA mittels kinetischer Konstanten.....	22
1.2.2	Bestimmung der RRA mittels Kompetitionstests	23
1.2.3	Isolierung des Glucocorticoidrezeptors.....	23
1.2.4	Bestimmung der Rezeptorkonzentration R_0 und der Gleichgewichts- dissoziationskonstante K_D	25
1.2.5	Durchführung der Affinitätsbestimmung nach der kinetischen Methode	27
1.2.5.1	Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten	27
1.2.5.2	Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten	30
1.2.5.3	Berechnung der Gleichgewichtdissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (K_D)	33
1.2.5.4	Berechnung der relativen Rezeptoraffinität (RRA) aus den kinetischen Konstanten.....	34

1.2.6	Bestimmung der Rezeptorbindungsaffinität mittels Kompetitionstests.....	37
1.2.7	Korrelation zwischen Lipophilie und relativer Rezeptoraffinität (RRA)	42
2	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen der mRNA-Expression von CD163	45
2.1	Quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
2.1.1	<i>Real-time</i> -PCR	46
2.1.2	mRNA-Quantifizierung	50
2.2	Prinzip der Untersuchung	52
2.3	Induktion der CD163-mRNA durch Glucocorticoide	52
2.4	Korrelation der Rezeptoraffinität mit zellulären Effekten <i>in vitro</i>	56
3	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur Gewebebindung inhalativ angewendeter Glucocorticoide	58
3.1	Prinzip der Bestimmung	59
3.2	Bindung inhalativer Glucocorticoide an humanes Lungengewebe	60
3.3	Freisetzung der Glucocorticoide in Humanplasma.....	63
3.4	Vergleich der Ergebnisse der Gewebebindung.....	67
3.5	Korrelation der Gewebebindung mit ausgewählten pharmakokinetischen Parametern	70
4	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur Stabilität des Mometasonfuroats in humanen Spezimen	74
4.1	Prinzip der Bestimmung	75
4.2	Stabilität des Mometasonfuroats in humanem Lungenhomogenat und Plasma <i>in vitro</i>	76
4.3	Charakterisierung der unbekannt Substanz mittels HPLC-MS/MS, ¹³ C- und ¹ H-NMR	79
4.3.1	Identifizierung und Strukturaufklärung der unbekannt Substanz.....	81
4.4	Degradation des Mometasonfuroats in Puffer	84
4.5	Vergleich der Ergebnisse zur Stabilität	87
4.6	Relevanz der Mometasonfuroatstabilität in biologischen Proben	90
5	Auflösungsverhalten von Glucocorticoidkristallen in humanem Bronchialsekret	94
5.1	Auflösungsverhalten des Beclomethasondipropionats am Beispiel von Ventolair [®] und Sanasthmax [®]	95

C. Experimenteller Teil

1	Bestimmung der relativen Rezeptoraffinität (RRA) von Glucocorticoiden.....	103
1.1	Verwendete Substanzen	103
1.2	Überprüfung der radiochemischen Reinheit	104
1.2.1	Verwendete Geräte und Materialien.....	104
1.2.2	Durchführung der DC- und HPLC-Chromatographie mit Radiodetektion	105
1.2.3	Berechnung der radiochemischen Reinheit.....	106
1.3	Radioaktivitätsmessung	107
1.3.1	Verwendete Geräte und Materialien.....	107
1.3.2	Durchführung und Auswertung.....	107
1.3.3	Berechnung der molaren Konzentration von radioaktiv markierten Glucocorticoiden aus dpm-Werten.....	107
1.4	Verwendete Probenmaterialien	108
1.5	Cytosolgewinnung	108
1.5.1	Reagenzien und Geräte.....	108
1.5.2	Homogenisierung des Lungengewebes	109
1.5.3	Ultrazentrifugation des Homogenats.....	109
1.6	Proteinbestimmung des Lungencytosols.....	110
1.6.1	Bestimmung nach Lowry	110
1.6.1.1	Reagenzien und Geräte	110
1.6.1.2	Durchführung.....	111
1.6.2	Bestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)	111
1.6.2.1	Reagenzien und Geräte	111
1.6.2.2	Durchführung.....	112
1.7	Bestimmung der Binderkonzentration R_0 und der Gleichgewichts- Dissoziationskonstanten K_D	112
1.7.1	Prinzip der Bestimmung.....	112
1.7.2	Auswertung	113
1.8	Bestimmung der relativen Rezeptoraffinität mittels kinetischer Konstanten	115
1.8.1	Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{Ass}	115
1.8.1.1	Prinzip der Bestimmung	115
1.8.1.2	Auswertung.....	115
1.8.2	Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{Diss}	117
1.8.2.1	Prinzip der Bestimmung	117

1.8.2.2	Auswertung.....	118
1.8.3	Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und Ermittlung der relativen Rezeptoraffinität (RRA).....	119
1.9	Bestimmung der relativen Rezeptoraffinität mittels Kompetitionstests.....	120
1.9.1	Prinzip der Bestimmung.....	120
1.9.2	Auswertung.....	121
1.10	Bestimmung der Kapazitätsfaktoren verschiedener Glucocorticoide.....	122
1.10.1	Prinzip der Bestimmung.....	122
2	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen der mRNA-Expression von CD163 durch verschiedene Glucocorticoide in humanen Monocyten.....	123
2.1	Reagenzien.....	123
2.2	Geräte und Materialien.....	124
2.3	Gewinnung humaner Monocyten aus Blutzellkonzentraten.....	125
2.4	Stimulation der Monocyten zur CD163-Induktion.....	126
2.5	Isolierung der Gesamt-RNA aus $1-2 \times 10^7$ humanen Monocyten.....	127
2.6	Reverse Transkription (RT) und quantitative <i>Real-Time</i> -PCR.....	128
2.6.1	Reagenzien.....	128
2.6.2	Durchführung.....	129
2.7	Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von CD163 mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) im <i>Real-time</i> -Modus.....	130
2.7.1	Reagenzien und Primer.....	130
2.7.2	Durchführung.....	130
2.7.3	Auswertung.....	133
3	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur Gewebebindung inhalativ angewendeter Glucocorticoide.....	137
3.1	Bindung inhalativ angewendeter Glucocorticoide an menschliches Lungengewebe.....	137
3.1.1	Reagenzien und Geräte.....	137
3.1.2	Durchführung.....	137
3.2	Freisetzung der Glucocorticoide aus Lungengewebe in Humanplasma.....	138
3.2.1	Durchführung.....	138
3.3	Probenaufarbeitung.....	138
3.4	HPLC-Bedingungen.....	139
3.5	Quantitative Auswertung der HPLC-Ergebnisse.....	140

4	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur Stabilität topisch angewendeter Glucocorticoide in humanen Spezimen	141
4.1	Stabilität der Glucocorticoide in humanen Lungengewebs suspensionen	141
4.2	Stabilität der Glucocorticoide in humanem Plasma	142
4.3	pH-abhängige Stabilität von Mometasonfuroat in Puffer	142
4.4	Probenaufarbeitung	142
4.5	Identifizierung der unbekannt en Substanz	142
4.5.1	Identifizierung der unbekannt en Substanz mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	143
4.5.2	Identifizierung der unbekannt en Substanz mittels ¹ H- und ¹³ C-NMR	144
5	Validierung der analytischen Methoden	147
5.1	Selektivität	147
5.2	Kalibrierfunktion.....	148
5.2.1	Linearität	148
5.3	Prüfung auf Präzision und Richtigkeit der Methoden.....	150
5.4	Bestimmungsgrenzen	152
5.5	Wiederfindung	153
5.6	Extraktionseffektivität.....	155
6	Auflösungsverhalten von Glucocorticoidkristallen in Bronchialsekret	156
6.1	Verwendete Geräte und Materialien	156
6.2	Probenvorbereitung und Durchführung	156
D. Tabellarischer Anhang		
1	Bestimmung der relativen Rezeptoraffinitäten von Glucocorticoiden	161
1.1	Einzel ergebnisse zur Bestimmung der kinetischen Konstanten	161
1.1.1	Einzel ergebnisse zur Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_1)	161
1.1.2	Einzel ergebnisse zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-1})	162
1.2	Einzel ergebnisse der Konkurrenztests.....	163
1.3	Relative Retentionszeiten zur Bestimmung der Kapazitätsfaktoren (k').....	165
2	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen der mRNA-Expression von CD163	166

2.1	Einzelresultate der Genexpression von CD163 bei Stimulation mit GC	166
2.2	Einzelresultate der Genexpression von CD163 bei equipotenten GC-Konzentrationen	167
2.3	Kalibrierdaten bei der <i>Real-time</i> -PCR.....	168
3	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur Gewebefindung inhalativ angewendeter Glucocorticoide	169
3.1	Einzelresultate zur Glucocorticoidbindung an menschliches Lungengewebe	169
3.2	Einzelresultate der Freisetzung der untersuchten Glucocorticoide aus Lungengewebe in Humanplasma.....	170
4	Stabilität der untersuchten Glucocorticoide in humanen Spezimen und Puffer.....	172
4.1	Einzelresultate der Stabilität in Lungenhomogenat mit und ohne Zusatz von Esteraseinhibitor (Dichlorvos, DCV)	172
4.2	Einzelresultate der Stabilität in Humanplasma mit und ohne Zusatz von Esteraseinhibitor (Dichlorvos, DCV)	173
4.3	Einzelresultate der Stabilität von Mometasonfuroat (MF), Beclomethasondipropionat (BDP) und Dexamethason (Dexa) in Phosphat-Puffer.....	174
4.4	Einzelresultate zur Wiederfindung des 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats in humanem Plasma und Lungenhomogenat	176
4.5	Pharmakokinetische und Pharmakodynamische Parameter ausgewählter Glucocorticoide (GC)	177
E.	Zusammenfassung.....	179
F.	Abkürzungsverzeichnis.....	187
G.	Literaturverzeichnis.....	189

A. Einleitung

1 Einleitung

Glucocorticoide sind die stärksten bekannten antiinflammatorisch wirksamen Substanzen. Sie spielen eine unentbehrliche Rolle in der Therapie lokaler und systemischer entzündlicher Erkrankungen. Zu den wichtigsten lokalen Erkrankungen gehören Asthma bronchiale, allergische Rhinitis und verschiedene entzündlich verlaufende Hauterkrankungen.

Die klinische Effektivität topisch applizierter Corticosteroide setzt sich aus der effektiv im therapeutischen Zielgewebe deponierten Dosis und der substanzspezifischen relativen Rezeptoraffinität zusammen [1]. Bei inhalativ angewandten Glucocorticoiden hängt der Anteil deponierter Dosis stark von dem verwendeten Applikationssystem ab. Hier spielt es beispielsweise eine Rolle, ob die Substanz gelöst oder suspendiert im Treibmittel vorliegt oder in Form mikronisierter Kristalle verabreicht wird. Der Substanzanteil, der nach Inhalation nicht die Lunge erreicht, sondern verschluckt wird, spielt bei modernen Glucocorticoiden aufgrund ihrer geringen oralen Bioverfügbarkeit praktisch keine Rolle mehr für die erwünschten oder unerwünschten Wirkungen.

Die unerwünschten Wirkungen bzw. die Sicherheit topisch angewandter Glucocorticoide werden durch die Effektivität der Substanz, ihre Gewebeaffinität und durch die Geschwindigkeit bzw. Umfang der metabolischen Inaktivierung determiniert. Die Gewebeaffinität bestimmt die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Umverteilung aus dem Zielgewebe in die systemische Zirkulation. Die unerwünschten Wirkungen werden maßgeblich durch die Konzentration der aktiven Substanz, welche die systemische Zirkulation erreicht, bestimmt. In diesem Zusammenhang ist auch eine vollständige Inaktivierung des aktiven Glucocorticoids von großer Bedeutung. Diese Inaktivierungsreaktion kann beispielsweise für dermal angewandte Corticosteroide mit 17, 21-Doppelesterstruktur schon in der Haut erfolgen [2], für inhalative Glucocorticoide erst bei der ersten Leberpassage. Bezüglich der genannten Eigenschaften, die Effektivität und Sicherheit determinieren, lassen sich deutliche Unterschiede zwischen den individuellen Vertretern der Glucocorticoide erkennen. Kenntnisse der Glucocorticoidkinetik und -dynamik sind die Grundlage für das Verständnis ihrer erwünschten und unerwünschten Effekte und die Basis gezielter Neuentwicklungen von Glucocorticoiden mit verbessertem therapeutischen Index.

1.1 Molekulare Grundlagen der Glucocorticoidwirkung

Die Mehrzahl der bekannten genomischen Effekte natürlicher und synthetischer Glucocorticoide werden über deren Bindung an den ubiquitär vorkommenden humanen Glucocorticoidrezeptor (hGR), ein im Cytosol lokalisiertes, etwa 94 kDa großes Protein [3], vermittelt. Der hGR gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren, die an einer Vielzahl von essentiellen Funktionen im Organismus wie Glucose-Homöostase, Zelldifferenzierung, Reifung der Lunge und Entzündungsprozessen beteiligt sind [4]. Zur Familie der Steroidhormonrezeptoren gehören neben hGR auch Mineralcorticoid-, Androgen-, Progesteron- und Estrogenrezeptoren. Alle Steroidhormonrezeptoren weisen eine gemeinsame Struktur mit drei funktionellen Domänen auf und wirken als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren [5, 6].

Die Steroidhormonrezeptoren zählen aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zusammen mit den Schilddrüsenhormon- (Thyroid-) Rezeptoren, den Vitamin A- und D-Rezeptoren, den PPA-Rezeptoren γ (*peroxisome proliferator activated receptor γ*) und einigen Orphanrezeptoren zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. In den letzten Jahren wurden viele neue Orphanrezeptoren entdeckt über deren Funktion und deren Liganden jedoch wenig bekannt ist. Für die so genannte SF-1 Variante (*steroidogenic factor 1*) wurden erst vor kurzem Phospholipide als endogene Liganden dieses Rezeptors identifiziert [7].

1.1.1 Funktionelle Domänen des humanem Glucocorticoidrezeptors (hGR)

Die einzelnen Funktionen des hGR können drei großen Domänen zugeordnet werden (Abb. 1) [5, 8].

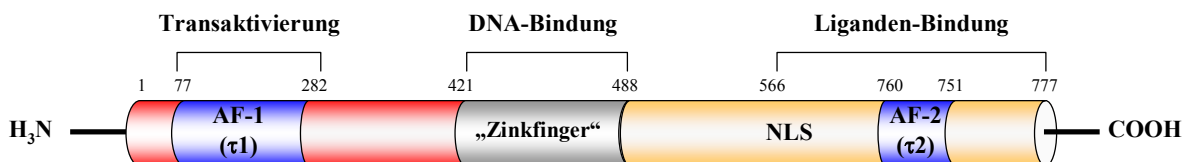


Abb. 1: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen sowie der strukturellen Organisation des humanen Glucocorticoidrezeptors (hGR). AF: Transaktivierungsdomäne (*activation function*), NLS: Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*).

Eine Domäne nahe dem N-terminalen Abschnitt des hGR ist an der Aktivierung der Transkription beteiligt und wird daher als Transaktivierungsdomäne (AF1) bezeichnet. Der

zentrale, aus zwei „Zinkfingern“ gebildete Anteil des Proteins, ist für die Bindung an die DNA verschiedener Zielgene verantwortlich und wird daher als DNA-Bindungsdomäne bezeichnet. Diese Domäne ist die Voraussetzung für eine Modulation der Gentranskription. Am C-terminalen Abschnitt des Rezeptors befindet sich die Ligandbindungsdomäne. In dieser befindet sich eine ligandabhängige Transaktivierungsdomäne (AF2) [9]. Der gerichtete Transport in den Zellkern wird durch die Freilegung einer spezifischen als „Kernlokalisierungssignal“ bezeichneten Peptidsequenz (*nuclear localization signal*, NLS) ermöglicht [10]. Weitere Bereiche der hGR-Ligandbindungsdomäne dienen der Bindung von Hitzeschockproteinen (hsp), der Dimerisierung zweier GR-Moleküle oder der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren.

1.1.2 Struktur des humanen Glucocorticoidrezeptors (hGR)

In den letzten Jahren wurden Kristallstrukturen der Ligandbindungsdomäne (LBD) vieler nukleärer Rezeptoren veröffentlicht, darunter die des Retinsäurerezeptors γ [11], Retinoid-X-Rezeptors α [12], Vitamin-D-Rezeptors [13], Thyroidrezeptors [14], PPA-Rezeptors γ (*peroxisome proliferator activated receptor* γ) [15] und der Androgen-, Estrogen-, Mineralcorticoid- und Progesteronrezeptoren [16-19]. Erst vor kurzem konnte auch die Kristallstruktur des humanen Glucocorticoidrezeptors (hGR) aufgeklärt werden [9]. Interessanterweise zeigen alle bekannten LBD trotz abweichender Aminosäuresequenzen sehr große strukturelle Ähnlichkeiten. Sie bestehen aus 10-12 Helices, die in einem dreischichtigen, antiparallelen α -Helix-Sandwich mit zwei bis vier eingeschlossenen β -Faltblättern angeordnet sind [9]. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass die Bindung eines Liganden an seinem spezifischen Rezeptor zu einer Konformationsänderung führt, wodurch die LBD eine kompakte, weniger durch Proteasen angreifbare Struktur annimmt [20]. Im Falle des hGR führt die Bindung eines Liganden zur Konformationsänderung der AF2-Helix. Dadurch wird der Rezeptor so stabilisiert, dass die Assoziation weiterer Coaktivator-Proteine, wie SRC-1 (*steroid coactivator-1*) und TIF2 (*transcriptional intermediary factor 2*) ermöglicht wird.

Die Kristallstruktur der hGR-Ligandbindungsdomäne weist auf ein Wasserstoffbrückenetzwerk zwischen den Hydroxylgruppen der Glucocorticoide und dem hGR hin [9]. Die Struktur des hGR-Dexamethason-TIF2-Komplexes ist in folgender Abbildung dargestellt (Abb. 2).

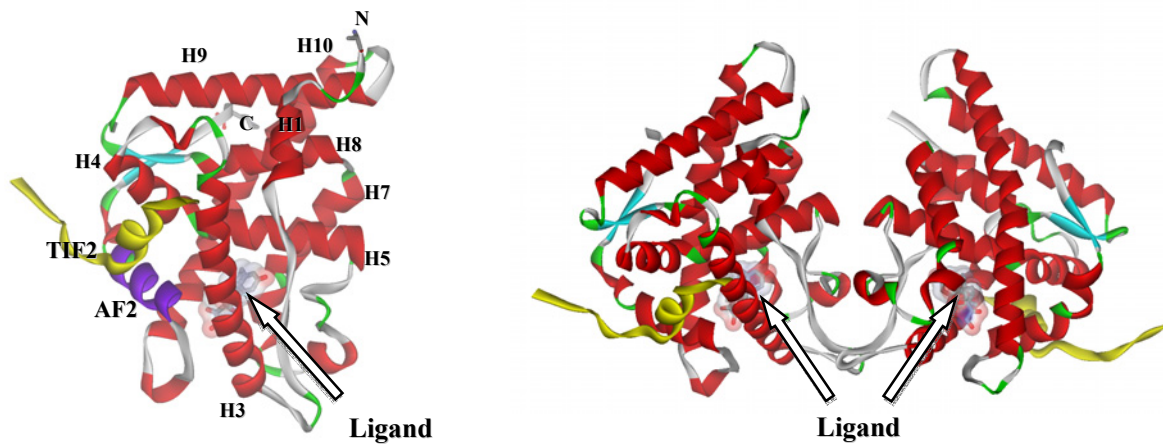


Abb. 2: Kristallstruktur des hGR im Komplex mit Dexamethason (Ligand) (PDB 1M2Z) [9]. Dargestellt sind das Monomer (links) und das Homodimer (rechts). Alle bekannten Kristallstrukturen nukleärer Rezeptoren zeigen analoge Strukturmerkmale. Die C-terminale-Helix (AF2 violett) verschließt die Bindungstasche. Das TIF2 Peptid (Coaktivator) ist gelb dargestellt. Alle α -Helices sind rot hervorgehoben.

1.1.3 Glucocorticoidwirkungen auf molekularer Ebene

Extrazelluläre Glucocorticoide (GC) passieren ungehindert die lipophile Zellmembran und binden an ihre cytosolischen Rezeptoren [21, 22]. Dieser Rezeptor wird im inaktiven Zustand durch einen multimeren Proteinkomplex stabilisiert [23], der unter anderem aus zwei Molekülen des Hitzeschockproteins hsp90 (*heat-shock proteins*, HSP) und dem Immunophilin p59 besteht (Abb. 3). Hitzeschockproteine haben generell die Aufgabe, als *Chaperones* die Zelle vor Schäden durch Hitze und anderen Stressfaktoren zu schützen. Funktionell erfüllen *Chaperones* diese Aufgabe, indem sie die für die Funktion von Proteinen essentielle dreidimensionale Faltung stabilisieren.

Die Bindung des Liganden führt zur Dissoziation der begleitenden hsp90 und p59 Proteine, wodurch die DNA-Bindungsdomäne des Rezeptors mit ihren sogenannten Zinkfinger-Strukturen exponiert wird [9, 24]. Der erste Zinkfinger enthält Aminosäuren zur Erkennung spezifischer DNA-Sequenzen. Über den zweiten Zinkfinger können sich jeweils zwei Glucocorticoidrezeptoren zu einem Homodimer verbinden (Abb. 3).

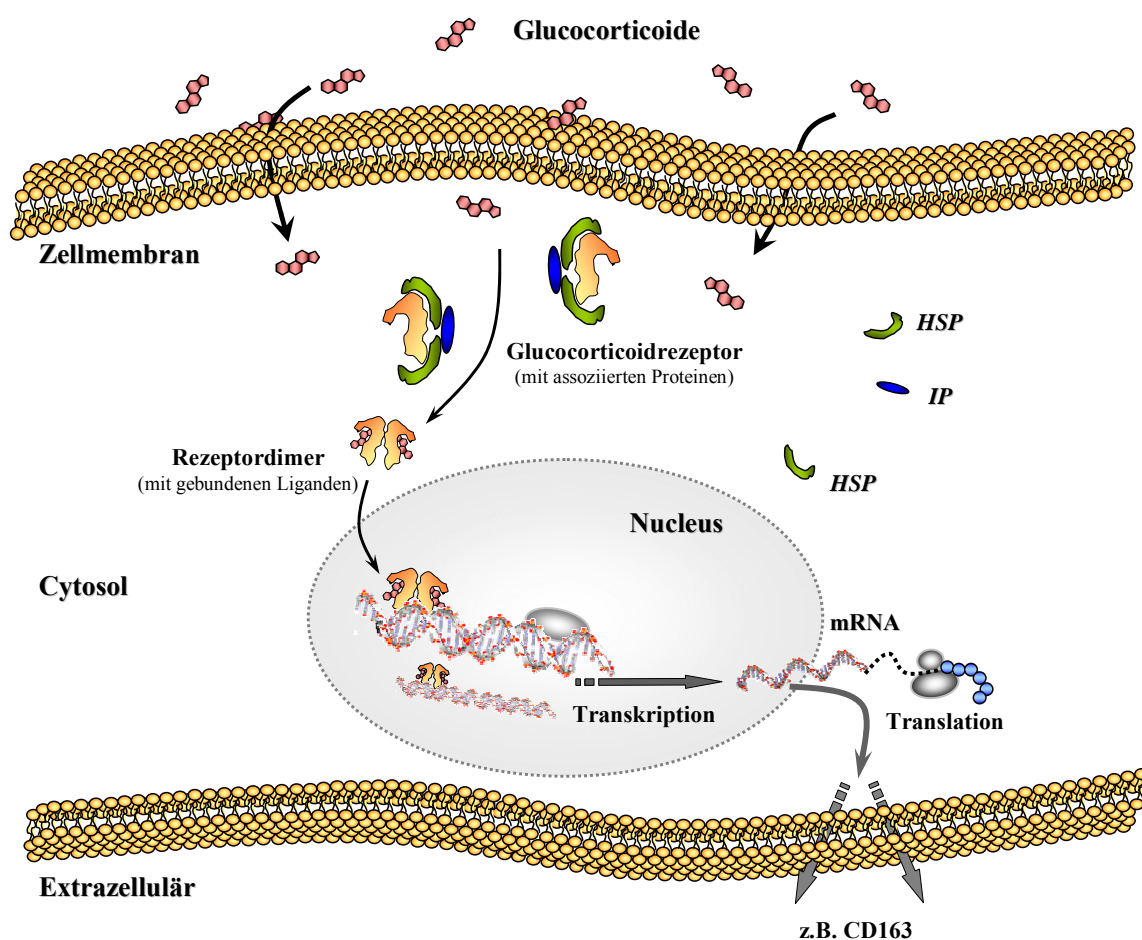


Abb. 3: Schematische Darstellung der Aktivierung einer Glucocorticoid-induzierten Gentranskription (Transaktivierung). HSP (*heat-shock proteins*), IP: Immunophilin.

Nur in Form eines dimeren Komplexes ist der hGR in der Lage, an die Glucocorticoid-spezifischen Erkennungssequenzen der DNA im regulatorischen Bereich von Genen zu binden. Diese hGR-bindenden Kontrollbereiche der DNA werden auch als *glucocorticoid response elements* bezeichnet und sind durch die charakteristische Basensequenz AGAACAXXTGTTCT (wobei X eine beliebige Nukleotidbase sein kann) gekennzeichnet [25, 26]. Der aktivierte Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex kann nach Translokation in den Nucleus auf unterschiedliche Art die Genexpression regulieren. Zum einen wird nach DNA-Bindung die Transkription spezifischer Zielgene (z.B. CD163) aktiviert (Abb. 3) oder reprimiert. Ferner kann durch Interaktion des aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes mit Transkriptionsfaktoren deren Aktivität gehemmt werden [27, 28]. Neben diesen Mechanismen der Modulation der Gentranskription durch Glucocorticoide sind weitere Wirkungen des aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes nachgewiesen worden [28]. Dazu zählen posttranskriptionelle Wirkungen,

etwa durch Veränderung spezifischer mRNA- oder Proteinstrukturen [29], sowie die Modulation der Chromatinstruktur, die dann anderen gegenregulatorischen Proteinen eine Bindung an die DNA erlaubt [28].

Ausgangspunkt der komplexen Wechselwirkungen von Glucocorticoiden mit ihren zellulären Effektorsystemen ist in jedem Fall die Bindung der Substanzen an ihren spezifischen Rezeptor. Da alle bisher bekannten Glucocorticoidwirkungen rezeptorvermittelt sind, können die relevanten klinischen Effekte auf der Basis von Glucocorticoid-Glucocorticoidrezeptor-Interaktionen erklärt werden.

1.2 Pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften topisch angewandter Glucocorticoide

1.2.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Verschiedene funktionelle Gruppen und Modifikationen des Pregnangrundgerüsts ermöglichen eine selektive Bindung an die verschiedenen Steroidhormonrezeptoren. Ein Progesteronrezeptor-Ligand bindet an den humanen Glucocorticoidrezeptor (hGR) nur mit niedriger Affinität. Hydroxylierungen in Position C11, C17 und C21 führen zum physiologisch vorkommenden Hydrocortison (Abb. 4) [30]. Die synthetischen Abwandlungen der Struktur des Hydrocortisons zielten zunächst auf die Erhöhung der Selektivität zum Glucocorticoid- gegenüber dem Mineralocorticoidrezeptor. Weitere Ziele waren die Erhöhung der Affinität zum Glucocorticoidrezeptor und – für topisch angewandte Corticosteroide – die Einführung von metabolisch labilen Strukturelementen, die im Zielgewebe entweder eine Aktivierung der Substanz (Prodrug-Prinzip) ermöglichen oder aber zu einer raschen hepatischen Inaktivierung führen, um unerwünschte systemische Effekte zu vermeiden. Die Positionen der bevorzugten strukturellen Variationen am Steroidmolekül sind: Position C1, C2 im A-Ring, C6, C9 im B-Ring und C16, C17 im D-Ring (Abb. 4). Ein für die Therapie mit Glucocorticoiden entscheidender Vorteil gelang mit der Differenzierung von gluco- und mineralocorticoiden Wirkungen durch die Einführung einer zweiten Doppelbindung zwischen Position C1 und C2 in Ring A des Hydrocortisons (Abb. 4) [31].

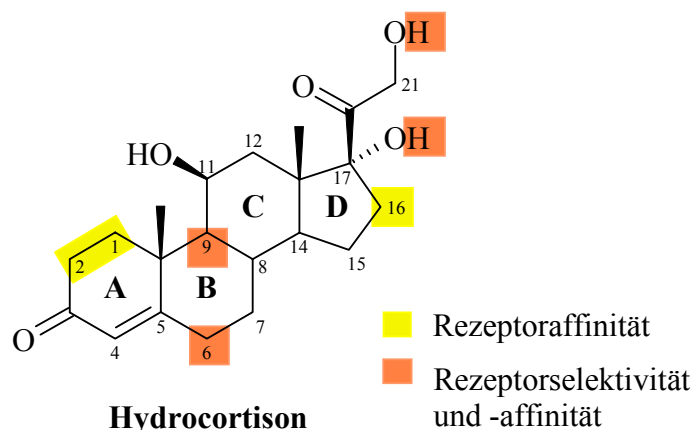


Abb. 4: Positionen der strukturellen Modifikation des endogenen Glucocorticoidliganden Hydrocortison, mit Einfluss auf die Rezeptoraffinität und -selektivität.

Das daraus resultierende Prednisolon bindet stärker an den hGR als Hydrocortison und nur 2/3 so stark an den Mineralocorticoidrezeptor. Für die glucocorticoid Wirkung sind eine freie Hydroxygruppe in Position 11 am C-Ring und der Ketonsauerstoff am C20-Atom essentiell [32].

Die Reduktion der mineralocorticoiden Wirkung unter gleichzeitiger Erhöhung der glucocorticoiden Wirkung wurde durch eine Methylierung (Dexamethason) oder Hydroxylierung (Triamcinolon) in C16-Position im D-Ring [33] erreicht. Eine Erhöhung der Affinität zum Glucocorticoidrezeptor kann durch eine Fluorierung (Fluocortolon, Flunisolid) oder Methylierung (Methylprednisolon) in C6-Position des B-Rings erzielt werden. Auch eine Halogenierung in C9-Position mit Fluor (Dexamethason) oder Chlor (Beclomethason-dipropionat, Mometasonfuroat) oder eine zweifache Fluorsubstitution in C6- und C9-Position (Fluticasonpropionat) resultiert in einer deutlichen Affinitätssteigerung [32].

Die größten strukturellen Modifikationen findet man im D-Ring der Glucocorticoide (Abb. 5). Zwei große Gruppen von Strukturvariationen lassen sich hier unterscheiden: zum einen Veresterungen in C17- und/oder C21-Position (z.B. Beclomethasondipropionat), zum anderen eine Acetal- bzw. Ketalbildung unter Beteiligung von Hydroxygruppen in Position C16 und C17 (Flunisolid, Budesonid, Ciclesonid). Während eine Veresterung in Position C17 eine deutliche Affinitätssteigerung mit sich bringt, sind C21-Ester nahezu inaktiv (Abb. 6). Durch die Acetalisierung bzw. Ketalisierung wird ebenfalls eine deutliche Steigerung der Affinität zum Glucocorticoidrezeptor erzielt.

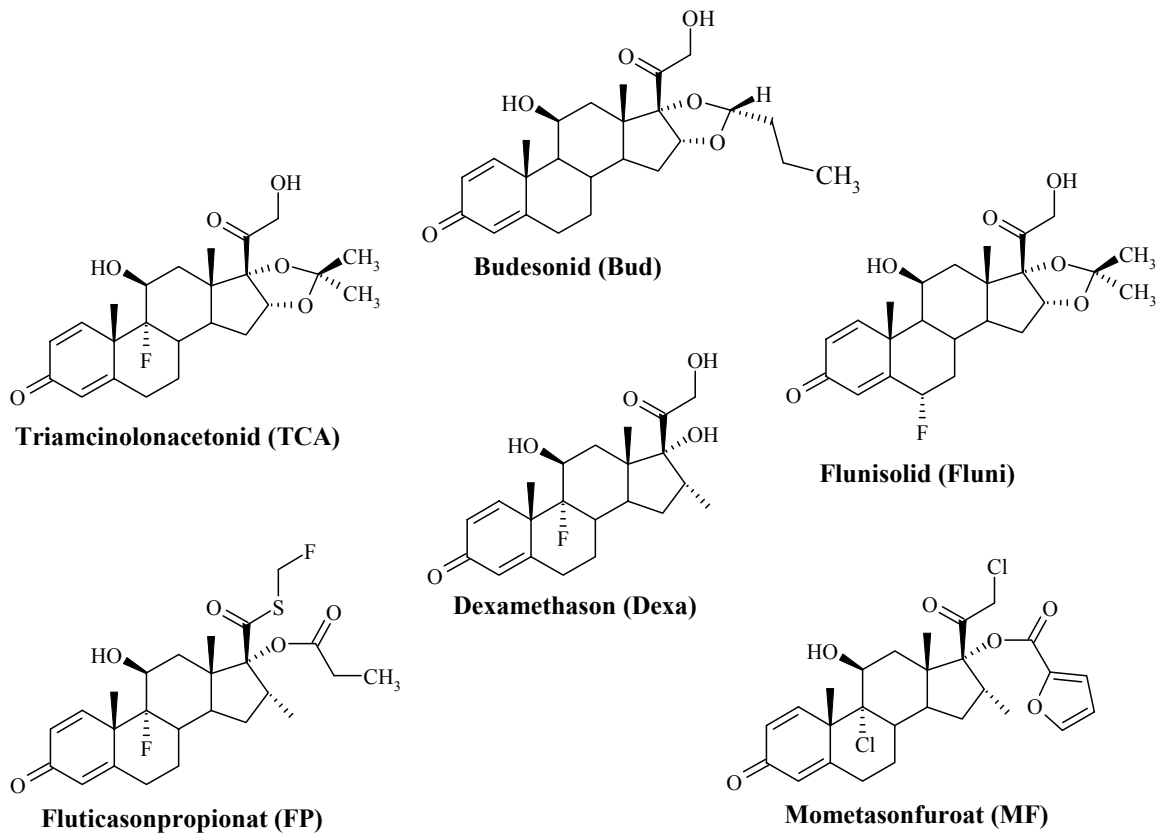


Abb. 5: Strukturen ausgewählter Glucocorticoide.

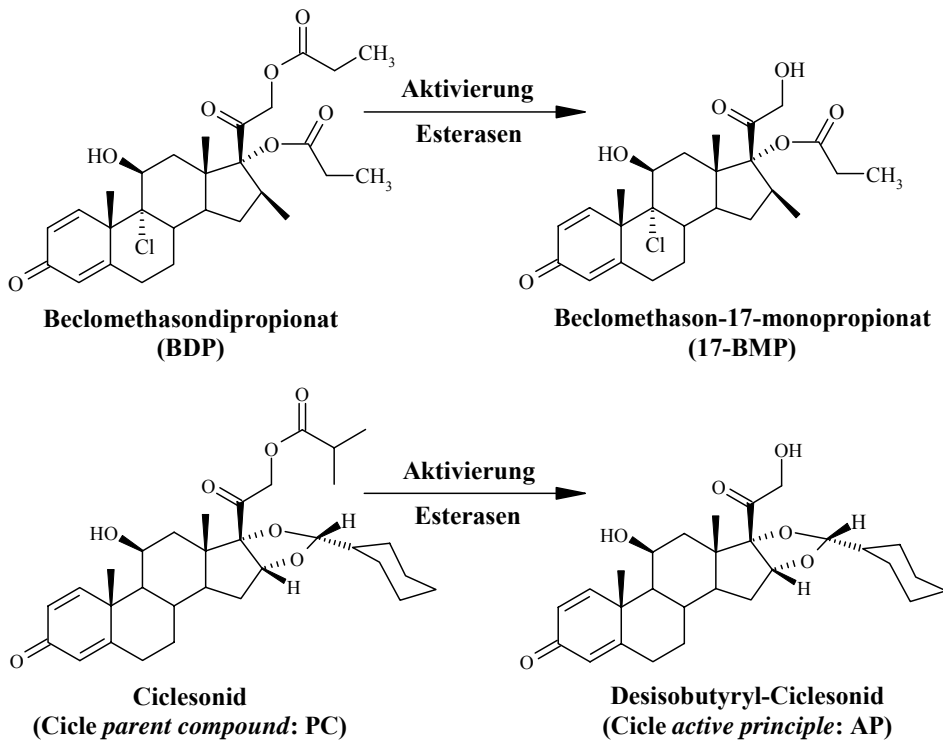


Abb. 6: In der Asthmatherapie eingesetzte Prodrugs und ihre aktive Metabolite.

Betrachtet man die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, so ist gut zu erkennen wie die Eigenschaften und Formen zwischen Dexamethason (Ligand) und der Bindetasche zueinander komplementär sind (Abb. 7, links). Obwohl Dexamethason nur 65 % des zur Verfügung stehenden Volumens der Bindetasche belegt, kann seine Bindungsaffinität zum Glucocorticoidrezeptor anhand der deutlich ausgeprägten hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein erklärt werden (Abb. 7, rechts) [9].

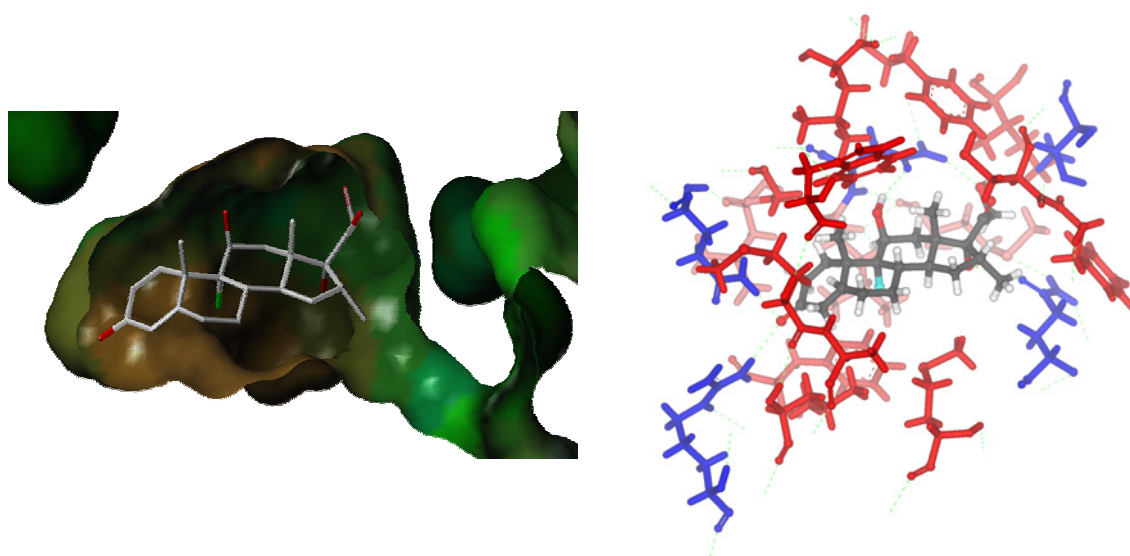


Abb. 7: Dexamethason im Komplex mit dem Glucocorticoidrezeptor (PDB: 1M2Z). Links dargestellt ist die Moleküloberfläche der Bindetasche mit dem lipophilen Potential der umgebenen Aminosäuren (hydrophob: braun, neutral: grün). Rechts: Aminosäuren der Ligandbindungsdomäne, die zu hydrophoben Wechselwirkungen beitragen, sind rot angefärbt. Aminosäuren, die Wasserstoffbrückenbindungen mit Dexamethason eingehen, sind blau dargestellt.

1.2.2 Bioverfügbarkeit

Inhalativ oder nasal applizierte Glucocorticoide sollen eine lokale Wirkung in ihrem therapeutischen Zielgewebe Lunge bzw. Nase entfalten. Die Konzentration, die in der systemischen Zirkulation erreicht wird, kann zu unerwünschten Effekten der Corticosteroide führen (Abb. 8).

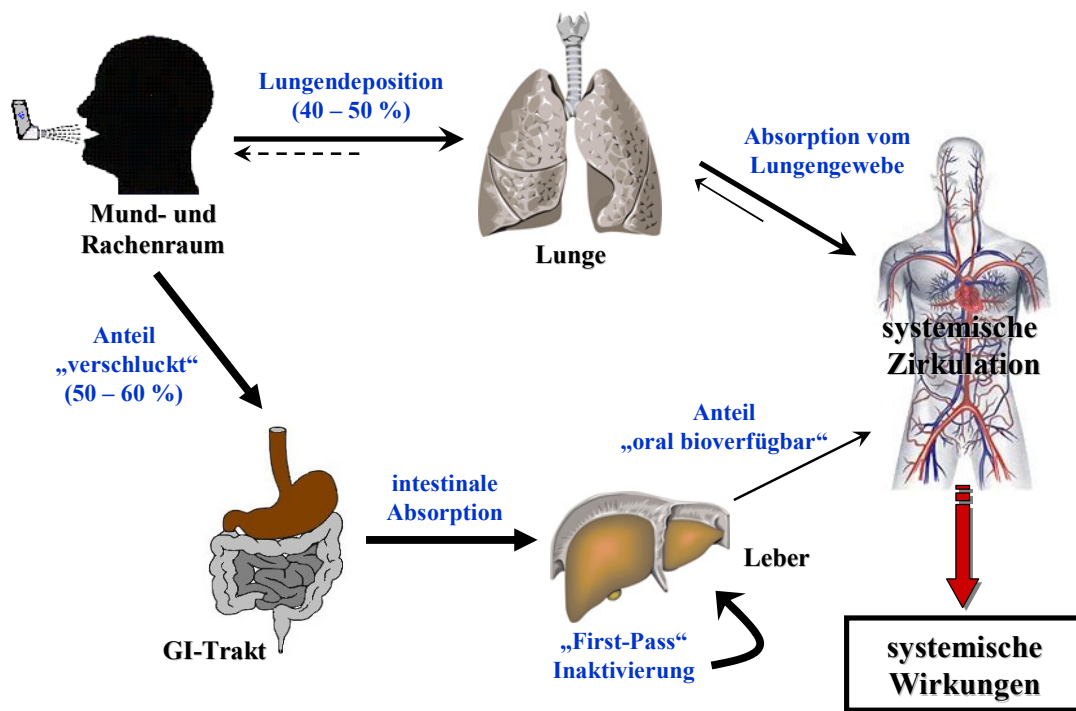


Abb. 8: Schematische Darstellung des pharmakokinetischen Schicksals inhalativer Glucocorticoide nach [34, 35]. GI: gastrointestinal

Da bei jeder inhalativen oder nasalen Verabreichung ein nicht unerheblicher Dosisanteil verschluckt wird, ist für diese Glucocorticoide eine möglichst geringe orale Bioverfügbarkeit vorteilhaft. Dies ist bei allen modernen inhalativen Glucocorticoiden realisiert (siehe Tabellarischer Anhang unter 4.5). So weisen Fluticasonpropionat, Mometasonfuroat und Ciclesonid eine orale Bioverfügbarkeit von weniger als 1 % auf. Für inhalativ applizierte Glucocorticoide kann neben der oralen auch eine pulmonale Bioverfügbarkeit definiert werden, worunter man den Dosisanteil versteht, der aus dem Lungengewebe in die systemische Zirkulation umverteilt wird (Abb. 8). So liegt die pulmonale Bioverfügbarkeit für Beclomethasondipropionat zwischen 10 % und 53 % [36] bzw. für Fluticasonpropionat zwischen 16 % und 30 % [34], abhängig von der verwendeten Darreichungsform.

1.2.3 Arzneiformen und Applikationssysteme

Die Inhalationstherapie stellt die wichtigste Therapieform chronisch verlaufender, entzündlicher Atemwegserkrankungen dar. Übliche Arzneiformen für inhalative Glucocorticoide sind Dosieraerosole, Pulverinhalatoren und wässrige Zubereitungen zur Vernebelung. Die

treibgasbetriebenen Dosieraerosole stellen dabei die größte Gruppe der Inhalativa dar. Der Wirkstoff kann dabei in einem druckverflüssigten Treibgasgemisch gelöst oder suspendiert sein. Als Treibmittel kommen zurzeit die Fluorkohlenwasserstoffe (HFKW bzw. HFA) Norfluran (Tetrafluorethan, HFA134a) und Apafluran (Heptafluorpropan, HFA227) zum Einsatz. Norfluran und Apafluran besitzen für fast alle Arzneistoffe ein sehr schlechtes Lösungsvermögen, so dass man bei Lösungsaerosolen den Einsatz von Co-Solventien nicht umgehen kann. Als Löslichkeitsverbessernder Hilfsstoff für Corticosteroide wird Ethanol ab einer Konzentration von etwa acht Prozent zugesetzt. Ferner enthalten die meisten Präparate, in denen der Wirkstoff suspendiert vorliegt, gelöste Hilfsstoffe wie Sorbitantrioleat, Ölsäure oder Lecithin, die als Suspensionsstabilisatoren und Ventilschmiermittel fungieren [37].

Die Entwicklung von Lösungsdosieraerosolen mit den Treibmitteln Norfluran und Apafluran veränderte auch das Teilchengrößenspektrum der Aerosole. In einem HFA-Lösungsspray sind die Partikelgrößen im Vergleich zu einem Chlorfluorkohlenwasserstoff (CFC) -haltigen Suspensionsspray zu kleineren Tröpfchendurchmessern (2,2 bis 1,1 μm) verschoben und führen so im Alveolar-Raum zu einer etwa 5fach höheren Wirkstoffdeposition [36].

Eine Weiterentwicklung der Lösungsdosieraerosole ist die Modulite-Technologie [38]. Dieses System ist zurzeit für die Arzneistoffe Beclomethasondipropionat (Sanasthmax[®], Becloturmant[®]) und Budesonid (Budair[®] 0,2 mg) verfügbar [39]. Durch den Zusatz von Glycerol als schwerflüchtige, flüssige Komponente zu einer Lösung des Arzneistoffs in Norfluran und Ethanol sowie durch ein neues Düsendesign wurde ein Dosieraerosol entwickelt, dessen mittlere Partikelgröße bei etwa 2,5 μm liegt [40].

Zurzeit stehen in Deutschland zur Therapie des Asthma bronchiale Präparate mit fünf verschiedenen Glucocorticoiden zur Verfügung: die Prodrugs Beclomethasondipropionat (Sanasthmax[®], Ventolair[®]) und Ciclesonid (Alvesco[®]), sowie Budesonid (Pulmicort[®], Budair[®]), Fluticasonpropionat (atemur[®], Flutide[®]) und Mometasonfuroat (Asthmanex[®]). Klinisch relevante Vorteile der inhalativen Therapie des Asthma bronchiale können durch die Kombination inhalativer Glucocorticoide mit langwirksamen β_2 -Sympatomimetika erzielt werden [41]. Hierfür sind zurzeit zwei Kombinationspräparate, Fluticasonpropionat/Salmeterol (Viani[®]) und Budesonid/Formoterol (Symbicort[®]), verfügbar.

1.2.4 Plasmaproteinbindung

Corticosteroide, die in die systemische Zirkulation gelangen, zeigen eine ausgeprägte Bindung an Plasmaproteine (siehe Tabellarischer Anhang unter 4.5). Während Hydrocortison und Prednisolon mit hoher Affinität vorwiegend an das corticoidtransportierende Transcortin gebunden werden, binden andere synthetische Glucocorticoide vorzugsweise an Albumin, das die Substanzen mit niedriger Affinität, aber hoher Kapazität bindet [42]. Die prozentuale Bindung von topisch angewandten Glucocorticoiden der neuen Generation an Plasmaproteine ist mit > 98 % sehr hoch.

1.2.5 Gewebefindung

Glucocorticoide zeigen eine bevorzugte Aufnahme und Anreicherung in bestimmten Geweben. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Prednisolon nach intravenöser Verabreichung eine bevorzugte Bindung an Gewebestrukturen des Gastrointestinaltraktes, des Herzens, der Nieren, der Lungen, der Skelettmuskulatur und der Milz zeigt und nur wenig an Fett- oder Hirngewebe bindet. Die Aufnahme bzw. Anreicherung im Lebergewebe war nicht linear [42]. Im Falle der inhalativen Glucocorticoide ist eine hohe Gewebefinität von Vorteil, denn das Applikationsgebiet ist gleichzeitig das therapeutische Zielgewebe. Glucocorticoide mit hoher Gewebefinität bilden ein Wirkstoffdepot im Gewebe: Dadurch wird der Abtransport in die systemische Zirkulation verlangsamt und hohe Plasmakonzentrationen werden vermieden. Damit wird die Gefahr von unerwünschten Wirkungen reduziert. Die einzelnen Glucocorticoide zur inhalativen Anwendung unterscheiden sich deutlich in ihrer Gewebefinität [43].

Einige Glucocorticoide wie Budesonid und Ciclesonid können eine intrazelluläre reversible Veresterung mit Fettsäuren (Lipidkonjugation) eingehen, die zu einer verlängerten Verweildauer der Wirksubstanz im Gewebe beiträgt [44, 45].

Das Verteilungsvolumen, das den Quotienten zwischen der absolut verabreichten Dosis und der im Blut bestimmten Wirkstoffkonzentration beschreibt, kann als ein Hinweis für das Ausmaß der Gewebefindung herangezogen werden (siehe Tabellarischer Anhang unter 4.5). Je größer die Tendenz einer Substanz ist, an periphere Gewebestrukturen zu binden, desto höher ist ihr Verteilungsvolumen. So hat das sehr lipophile Fluticasonpropionat ein hohes Verteilungsvolumen und zeigt eine besonders ausgeprägte Gewebefinität.

1.2.6 Metabolismus und Elimination

Der hepatische Metabolismus stellt für peroral, inhalativ, nasal, aber auch für parenteral verabreichte Glucocorticoide die wichtigste Inaktivierungsreaktion dar. Typische Biotransformationsreaktionen sind die Reduktionen von Carboxylgruppen, Oxidation freier Hydroxylgruppen, Hydroxylierungen des Steroid-Grundgerüsts und Konjugation mit Glucuronsäure. Darüber hinaus kommt es bei veresterten Glucocorticoiden zur Hydrolyse der Ester in C17- bzw. C21-Position, falls diese Reaktion nicht schon zuvor in extrahepatischen Geweben erfolgt ist. Die Acetalisierung bzw. Ketalisierung der Hydroxylgruppen in den Positionen C16 und C17 führt in der Regel zu hoher metabolischer Stabilität.

Die pharmakokinetische Größe, die Eliminationsvorgänge beschreibt, ist die *Clearance*, die angibt, welches Blutvolumen pro Zeiteinheit theoretisch von dem Arzneistoff vollständig befreit wird. Die totale *Clearance* ist die Summe aller an der Elimination bzw. Metabolisierung beteiligten Prozesse. Inhalativ angewandte Glucocorticoide zeigen eine hohe *Clearance*, die mit 69 bzw. 84 l/h für Fluticasonpropionat [46] bzw. Budesonid [34] ungefähr dem hepatischen Blutfluss und damit der maximalen *Clearance*-Rate für hepatisch metabolisierte Arzneistoffe entspricht. Die noch höheren *Clearance*-Raten des Beclomethasondipropionats deuten an, dass diese Verbindung auch extrahepatisch metabolisiert wird [34].

Topisch applizierte Glucocorticoide, die in nur geringeren Konzentrationen in der systemischen Zirkulation auftreten, werden vollständig biotransformiert. Diese Molekülveränderungen resultieren letztendlich in pharmakologisch inaktiven Metaboliten, die bilär und renal ausgeschieden werden.

1.2.7 Prodrug-Prinzip

Nur zwei der topisch verabreichten Glucocorticoide zur inhalativen Anwendung sind inaktive Prodrugs, es sind C17- C21-Doppelester (Abb. 6). Der C21-Ester kann im therapeutischen Zielgewebe von unspezifischen Esterasen gespalten werden. Die daraus resultierenden C21-Alkohole sind um ein Vielfaches aktiver als ihre korrespondierenden Ester. Beclomethasondipropionat wird im Lungengewebe zum aktiven Beclomethason-17-monopropionat gespalten und Ciclesonid wird zum aktiven Desisobutyryl-Ciclesonid hydrolysiert (Abb. 6). Die C21-Ester sind lipophiler als ihre korrespondierenden Alkohole und zeigen eine hohe Gewebebindung [43].

1.2.8 Rezeptoraffinität und klinische Potenz

Alle bisher bekannten, klinisch relevanten Glucocorticoideffekte sind rezeptorvermittelt. Die Affinität eines Corticosteroids zu seinem Rezeptor determiniert seine intrinsische Aktivität. Die therapeutisch verwendeten Glucocorticoide unterscheiden sich beträchtlich in Bezug auf ihre Rezeptoraffinität. Die Rezeptorbindung kann an intakten Zellen oder mit partiell isolierten cytosolischen Rezeptoren aus Gewebshomogenaten bestimmt werden, wobei grundsätzlich zwei verschiedene Methoden zur Verfügung stehen: die Bestimmung der Bindungskinetik oder alternativ Wettbewerbsversuche am Rezeptor. Dabei kann die relative Rezeptoraffinität eines Glucocorticoids mit Bezug auf eine Referenzsubstanz, häufig Dexamethason, berechnet werden.

Die relative Rezeptoraffinität (RRA) korreliert für alle topisch angewandten Glucocorticoide nicht nur ausgezeichnet mit den auf zellulärer Ebene gemessenen, antiinflammatorischen Effekten, sondern auch sehr gut mit den beobachteten, klinischen Wirksamkeiten [47]. Dies schlägt sich unmittelbar in den empfohlenen klinischen Äquivalenzdosierungen der Glucocorticoide nieder. So muss beispielsweise Budesonid (RRA: 935) bei der inhalativen Asthmatherapie in der doppelten Dosis im Vergleich zu Fluticasonpropionat (RRA 1800) eingesetzt werden, um bei vergleichbarer pulmonaler Deposition eine vergleichbare Effektivität zu erzielen. Eine Korrelation der relativen Rezeptoraffinität mit der pharmakodynamischen Wirkung gelingt insbesondere bei topisch angewandten Glucocorticoiden, da weitere pharmakokinetische Einflüsse hierbei kaum eine Rolle spielen.

Glucocorticoide sind nicht alle gleich. Individuelle Vertreter dieser Wirkstoffklasse weisen ein unterschiedliches Verhältnis von erwünschten antiinflammatorischen zu unerwünschten systemischen Effekten auf. Diese Unterschiede im Nutzen-Risiko-Profil werden durch die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der einzelnen Substanzen bestimmt.

In Tab. 1 sind einige erstrebenswerte pharmakokinetische und -dynamische Eigenschaften eines „idealen“ inhalativen Glucocorticoids zur Langzeitmedikation des Asthma bronchiale zusammengefasst.

Tab. 1: Pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften eines „idealen“ inhalativen Glucocorticoids nach [48, 49].

Kategorie	Ideale Eigenschaft
Pharmakokinetik	Hohe pulmonale Bioverfügbarkeit (> 50 %) Niedrige orale und systemische Bioverfügbarkeit (< 1 %) Hohe Plasmaproteinbindung (> 99 %) Großes Verteilungsvolumen Hohe Lipophilie, ausgeprägte Lipidkonjugation Prodrug Struktur Rasche und vollständige systemische Elimination
Pharmakodynamik	Hohe Bindungsaffinität zum Glucocorticoidrezeptor Hohe antiinflammatorische Potenz

Im Folgenden sollten einige der pharmakokinetischen bzw. –dynamischen Eigenschaften von inhalativ angewandten Glucocorticoiden charakterisiert werden und die neuesten Vertreter Mometasonfuroat und Ciclesonid daraufhin untersucht werden, ob sie den „idealen“ Eigenschaften näher kommen als schon länger in der Therapie etablierte Substanzen.

B. Allgemeiner Teil

1 Bestimmung der relativen Rezeptoraffinität (RRA) von Glucocorticoiden

1.1 Zielsetzung

Voraussetzung für die pharmakodynamischen Effekte von Glucocorticoiden ist deren Bindung an ihren cytosolischen Glucocorticoidrezeptor (GR). Die Anwesenheit dieses Rezeptorproteins konnte in nahezu allen Organen des Menschen [50, 51], auch in der Lunge [52] [53], nachgewiesen werden. Die Affinität der Glucocorticoide zu diesem cytosolischen Rezeptor bestimmt dabei sowohl die erwünschten, als auch die unerwünschten Wirkungen.

In früheren Publikationen wurden Rezeptoraffinitäten verschiedener Glucocorticoide untersucht und miteinander verglichen [54-56]. Obwohl Hochhaus [57] zeigen konnte, dass synthetisch hergestellte Glucocorticoide an humanen Glucocorticoidrezeptoren verschiedener Organe mit derselben Affinität binden, können Affinitätsdaten aus der Literatur nicht unmittelbar miteinander verglichen werden, da sowohl unterschiedliche Rezeptorkonzentrationen im verwendeten Cytosol, als auch der Einsatz verschiedener Referenzsubstanzen die erzielten Ergebnisse beeinflussen [56]. Ein direkter Vergleich der Rezeptoraffinitäten von Glucocorticoiden ist somit nur dann möglich, wenn diese unter einheitlichen Bedingungen ermittelt werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die bislang nicht untersuchte Rezeptorbindungskinetik von Mometasonfuroat im Vergleich zu anderen topisch angewendeten Glucocorticoiden mit bekannten Affinitäten bei gleichen Versuchsbedingungen zu bestimmen.

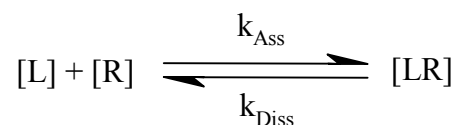
1.2 Prinzip der Untersuchungen und Durchführung

Um verschiedene Glucocorticoide miteinander zu vergleichen, können ihre relativen Rezeptoraffinitäten berechnet werden. Hierzu eignen sich prinzipiell zwei unterschiedliche Methoden:

- Bestimmung der Rezeptorbindungskinetik
- Kompetitionstests

1.2.1 Bestimmung der RRA mittels kinetischer Konstanten

Die Grundlage für die kinetische Untersuchung der Bindung eines Glucocorticoids (Ligand, L) an den Glucocorticoidrezeptor (Rezeptor, R) ist die reversible Reaktion des Liganden und Rezeptors zum Ligand-Rezeptor-Komplex (LR) [58, 59]. Zur Bestimmung der Affinität eines Glucocorticoids zum Glucocorticoidrezeptor werden zunächst die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{Ass}) und Dissoziation (k_{Diss}) der Komplexbildung berechnet [60, 61]:



Zur Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{Ass}) werden tritiummarkierte Glucocorticoide in einer Rezeptorsuspension bekannter Rezeptordichte inkubiert und deren spezifische Bindung zu festgelegten Zeitpunkten ermittelt [62].

Um die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{Diss}) zu bestimmen, wird eine Suspension aus cytosolischen Glucocorticoidrezeptoren mit tritiummarkiertem Glucocorticoid bis zur Sättigung der Bindungsstellen vorinkubiert. Die Dissoziation eines Glucocorticoids vom Rezeptor wird durch Zugabe eines Überschusses an nichtmarkiertem Glucocorticoid eingeleitet. Anschließend wird die spezifische Bindung über einen längeren Zeitraum untersucht [63].

Unter Kenntnis der k_{Ass} und k_{Diss} lässt sich die Gleichgewichtsdissoziationsgeschwindigkeitskonstante K_D berechnen:

$$K_D = \frac{k_{Diss}}{k_{Ass}}$$

Bei Kenntnis der K_D eines Glucocorticoids (GC) kann die relative Rezeptoraffinität (RRA) in Bezug auf eine Referenzsubstanz (Ref) wie folgt ermittelt werden:

$$RRA_{GC} = \frac{K_{D(Ref)}}{K_{D(GC)}} \cdot 100$$

1.2.2 Bestimmung der RRA mittels Konkurrenztests

Für Konkurrenzversuche werden verschiedene Konzentrationen eines nichtmarkierten Glucocorticoids (Kompetitor) mit einer bestimmten Konzentration markierter Substanz (Tracer, tritiummarkiertes Glucocorticoid) in einer Suspension aus cytosolischen Glucocorticoidrezeptoren inkubiert. Nichtmarkierte und markierte Substanz konkurrieren dann um eine begrenzte Anzahl spezifischer Bindungsstellen. Nach Gleichgewichtseinstellung kann der Anteil markierter, rezeptorgebundener Substanz bestimmt werden. Die prozentualen Anteile der spezifischen Bindung werden nach einer logit-Transformation [62] gegen den Logarithmus der eingesetzten Konkretorkonzentration graphisch aufgetragen. Der Schnittpunkt der daraus resultierenden Regressionsgerade mit der x-Achse ergibt die Konzentration an Konkretitor ($C_{GC,50}$), die notwendig ist, um eine 50 %ige Abnahme der spezifischen Bindung zu verursachen. Die relative Rezeptoraffinität (RRA) eines Glucocorticoids (GC) kann mit Bezug auf eine Referenzsubstanz (Ref) wie folgt berechnet werden:

$$RRA_{GC} = \frac{C_{Ref,50}}{C_{GC,50}} \cdot 100$$

Die RRA der Referenzsubstanz wird auf einen definierten Wert festgelegt, z.B. 100.

1.2.3 Isolierung des Glucocorticoidrezeptors

Zur *In-vitro*-Bestimmung der relativen Rezeptoraffinitäten wurde im Hinblick auf die inhalative Anwendung der untersuchten Glucocorticoide Cytosol aus menschlichem Lungengewebe von mindestens drei verschiedenen Spendern eingesetzt. In Anlehnung an frühere Arbeiten [55-57] wurde der Glucocorticoidrezeptor durch Homogenisierung und anschließende Ultrazentrifugation aus dem Gewebe isoliert (siehe Experimenteller Teil 1.5).

Zur Gewinnung des Cytosols wurde das Gewebe zunächst zerkleinert und homogenisiert. Die Glucocorticoidrezeptoren sind im zellfreien Cytosol wegen der dort vorhandenen Enzyme, wie z.B. Serinproteasen, ohne Zusatz weiterer Reagenzien auch bei niedrigen Temperaturen instabil [60, 64, 65]. Durch den Einsatz verschiedener Stabilisatoren kann die Degradation der Rezeptoren nahezu vollständig verhindert werden. Reduzierende Substanzen wie Mercaptoethanol und Dithiothreitol verhindern die Oxidation von rezeptoreigenen SH-Gruppen

und können so die Stabilität der Rezeptoren bei niedrigen Temperaturen erhöhen [66]. Molybdationen stabilisieren den Rezeptor [67], wobei der Mechanismus nicht vollständig bekannt ist. Diskutiert werden zurzeit ein indirekter Einfluss von cGMP [68] oder Interaktionen der Molybdationen mit anderen Molekülen, wie dem Hitzeschockprotein hsp90 [69], die zur Stabilisierung des Rezeptors führen [23]. Leach et al. [67] beobachteten auch eine Erhöhung der Thermostabilität des Rezeptors durch Molybdationen, wodurch Inkubationsversuche bei Raumtemperatur möglich wurden. Obwohl Molybdationen den Rezeptor durch eine direkte Wechselwirkung zu stabilisieren scheinen, wurde keine Veränderung in der Bindungskinetik von Glucocorticoiden beobachtet [69, 70].

Glycerin in Mengen von 10 bis 40 % kann die Degradation der Rezeptoren beim Einfrieren und Wiederauftauen ebenfalls verhindern [63]. Die Lagerung des Cytosols über mehrere Monate in flüssigem Stickstoff unter Zusatz von Stabilisatoren führt zu keiner Abnahme der Rezeptorkonzentration [71]. Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Stabilität des Steroidrezeptors bei tiefen Temperaturen. Deshalb wurden die für diese Untersuchungen verwendeten Gewebeproben und das daraus hergestellte Cytosol in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und maximal drei Monate bei -80 °C gelagert.

Der von Würthwein [55] verwendete Puffer zur Aufarbeitung des Gewebes und Lagerung des Cytosols wurde bei den eigenen Untersuchungen dahingehend abgeändert, dass zusätzlich zur weiteren Stabilisierung des Rezeptors ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete™) verwendet wurde. Dieser Cocktail, der in wässrigen Puffern bei neutralem pH-Wert sehr stabil ist, führt zur irreversiblen Hemmung eines breiten Spektrums von Proteasen (siehe Kapitel C 1.4).

1.2.4 Bestimmung der Rezeptorkonzentration R_0 und der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D

Die Rezeptorkonzentration im Lungencytosol wurde nach der Methode von Toft und Gorski [72] ermittelt. Für die Bestimmung der Rezeptorkonzentration R_0 und der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D wurde das Lungencytosol mit unterschiedlichen Mengen an [^3H]-Dexamethason inkubiert. Nach Abtrennung des gebundenen vom ungebundenen Glucocorticoid mit Hilfe einer Aktivkohlesuspension, wurde der am Rezeptor gebundene Anteil an tritiummarkiertem Dexamethason gemessen. R_0 und K_D ergeben sich aus der von Scatchard [73] aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Beziehung:

$$\frac{[B_s]}{[H]} = \frac{[R_0]}{K_D} - \frac{[B_s]}{K_D}$$

$[B_s]$: Konzentration an spezifisch gebundenem [^3H]-Dexamethason

$[H]$: Konzentration an nicht gebundenem [^3H]-Dexamethason

Bei dieser Methode besteht eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration des [^3H]-Dexamethason-Rezeptor-Komplexes ($[B_s]$) und dem Verhältnis zwischen dem [^3H]-Dexamethason-Rezeptor-Komplex und nicht gebundenem [^3H]-Dexamethason ($[B_s]/[H]$). Wenn man $[B_s]/[H]$ gegen $[B_s]$ für verschiedene [^3H]-Dexamethason-Konzentrationen in einem Koordinatensystem aufträgt, ergibt sich unter der Voraussetzung gleicher Versuchsbedingungen eine Gerade. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der x-Achse stellt die Rezeptorkonzentration ($[B_0]$) des untersuchten Cytosols dar. Aus der Steigung der so ermittelten Gerade wird die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des [^3H]-Dexamethason-Rezeptor-Komplexes berechnet (Abb. 9).

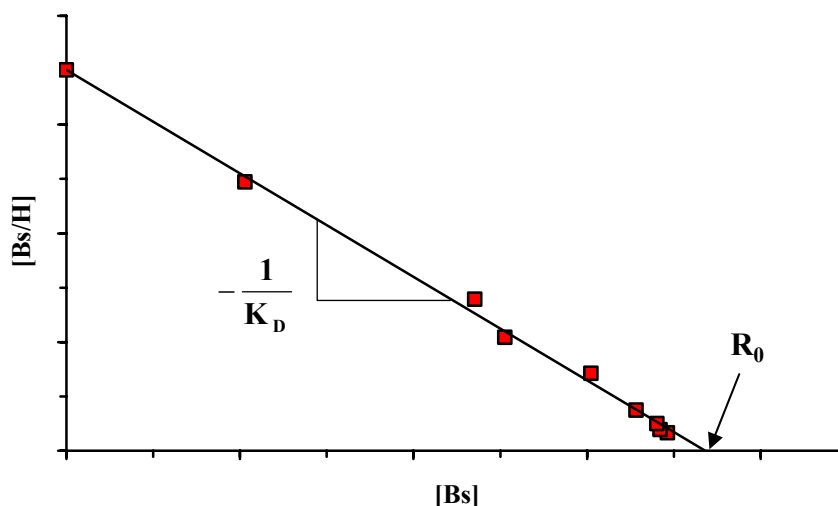


Abb. 9: Graphische Darstellung der Bestimmung von Rezeptorkonzentration R_0 und Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D nach der Scatchard-Methode.

Die so ermittelten Rezeptorgehalte, bezogen auf den Proteingehalt des Cytosols (14,5 bis 21,3 mg/ml), lagen zwischen 28 und 62 fmol/mg Gesamtprotein. Für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des Dexamethasons wurden Werte von 8,12 bis 10,3 nmol/l berechnet. Diese Ergebnisse sind mit denen aus anderen Untersuchungen vergleichbar (Tab. 2).

Tab. 2: Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für Dexamethason, berechnet nach der Scatchard-Methode, und Rezeptorgehalte B_0 in humanem Lungencytosol im Vergleich zu Literaturdaten.

	eigene Ergebnisse	Hochhaus [52]	Würthwein [55]	Högger [56]	Esmailpour [74]
K_D (nmol/l)	8,12 - 10,30	11,4	–	9,36	8,91 - 9,63
Rezeptorgehalt B_0 (fmol/mg)	28 - 62	–	25 - 41	–	66 - 76

1.2.5 Durchführung der Affinitätsbestimmung nach der kinetischen Methode

1.2.5.1 Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation wurde das Cytosol mit [^3H]-Glucocorticoid allein (zur Bestimmung der gesamten Bindung) oder zusammen mit einem 1000-fachen Überschuss an nicht markiertem Glucocorticoid (zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung) inkubiert. Die Zunahme der spezifischen Bindung wurde durch Probenentnahmen zu festgelegten Zeiten verfolgt. Das Assoziationsverhalten der untersuchten Glucocorticoide wurde zunächst graphisch dargestellt und miteinander verglichen. Eine graphische Darstellung des Assoziationsverhaltens erhält man, indem man die spezifische Bindung des Glucocorticoids an seinen Rezeptor gegen die Zeit aufträgt (Abb. 10).

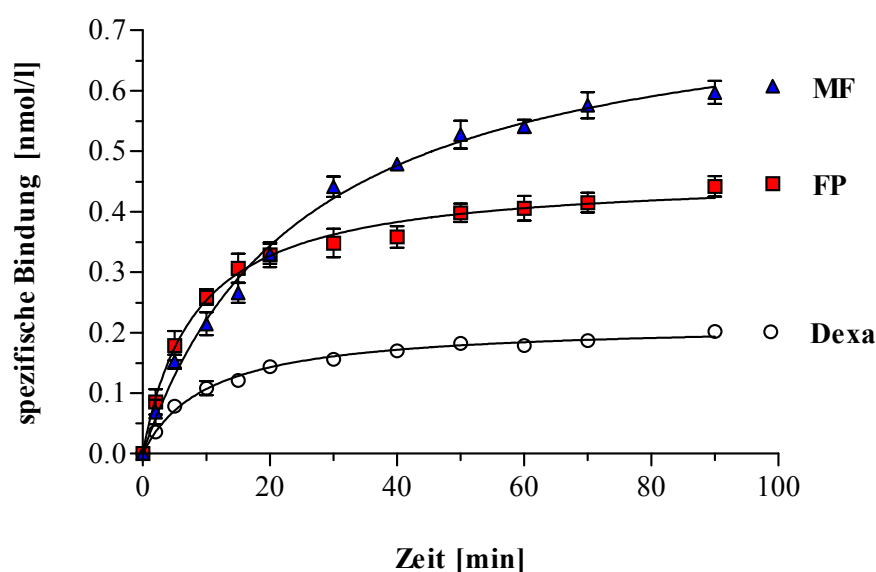


Abb. 10: Verlauf der Assoziation an den humanen Glucocorticoidrezeptor in Lungencytosol bei 20 °C dargestellt am Beispiel von Dexamethason (Dexa), Fluticasonpropionat (FP) und Mometasonfuroat (MF). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und mittlere Abweichungen vom Mittelwert aus vier Versuchen.

Die Assoziation des Dexamethasons und Fluticasonpropionats zum Glucocorticoidrezeptor erfolgt schnell und erreicht nach 30 bis 40 Minuten eine Plateauphase. Das Ausmaß der spezifischen Bindung des Fluticasonpropionats ist jedoch bedeutend höher, etwa um den Faktor 2, als im Falle des Dexamethasons (Abb. 10). Die spezifische Bindung des Mometasonfuroats (MF) zum humanen Glucocorticoidrezeptor verläuft sehr schnell und in höherem Ausmaß als bei

Fluticasonpropionat (FP) und Dexamethason (Dexa). Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen scheint die Assoziation des Mometasonfuroats in den ersten 40 Minuten noch nicht abgeschlossen zu sein (Abb. 10).

Zur Berechnung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{Ass}) wurden die Werte der spezifischen Bindung im aufsteigenden Bereich der Kurven zunächst nach einer von Rodbard vorgeschlagenen Linearisierungsmethode transformiert [62]. Die Konstanten (k_{Ass}) wurden dann aus der Steigung der resultierenden Geraden berechnet (siehe Experimenteller Teil, Kap. 1.8.1.2).

Erwartungsgemäß (Abb. 10) lag die errechnete Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{Ass}) für Mometasonfuroat höher als die des Dexamethasons und Fluticasonpropionats (Tab. 3).

Tab. 3: Ermittelte Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{Ass} für Dexamethason, Fluticasonpropionat und Mometasonfuroat zum Glucocorticoidrezeptor in humanem Lungencytosol bei 20 °C im Vergleich zu Literaturdaten.

Glucocorticoid	Dexamethason	Fluticasonpropionat	Mometasonfuroat
k_{Ass}	$\times 10^5$ (l/mol·min)	$\times 10^5$ (l/mol·min)	$\times 10^5$ (l/mol·min)
eigene Ergebnisse ¹⁾	10,53 ± 0,35	21,17 ± 0,56	29,46 ± 1,10
Högger [56]	12,45	23,9	–
Esmailpour [74]	9,6	27,4	–

¹⁾ Die dargestellten Daten geben die Mittelwerte ± mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert aus vier repräsentativen Versuchen wieder.

Bei der Bestimmung der Assoziationskonstanten (k_{Ass}) wurden die Ergebnisse aus vier Wiederholungen gemittelt und deren mittlere absolute Abweichung (MA) vom Mittelwert berechnet. Der daraus errechnete Variationskoeffizient¹⁾ lag bei allen untersuchten Glucocorticoiden unter 3,8 %. Die Assoziationskonstanten konnten so mit ausreichender Genauigkeit ermittelt werden.

Die Ergebnisse der k_{Ass} für Dexamethason und Fluticasonpropionat sind mit den ermittelten

¹⁾ Zur weiteren Übersichtlichkeit wird der Quotient aus der mittleren absoluten Abweichung (MA) vom Mittelwert zum Mittelwert als Variationskoeffizient definiert und ist mit der relativen Standardabweichung nicht zu verwechseln.

Werten aus früheren Untersuchungen in der Größenordnung vergleichbar. Das erstmalig hier untersuchte Mometasonfuroat zeigt mit $29,46 \cdot 10^5$ l/mol·min eine signifikant höhere Assoziationsgeschwindigkeitskonstante als die unter gleichen Bedingungen untersuchten Glucocorticoiden Dexamethason und Fluticasonpropionat.

Esmailpour [74] errechnete eine Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von $27,4 \cdot 10^5$ l/mol·min für Fluticasonpropionat am Glucocorticoidrezeptor aus humanen Lungengewebe. Eine mögliche Erklärung für diese Abweichung von den eigenen Ergebnissen ($21,2 \cdot 10^5$ l/mol·min) könnte darin zu finden sein, dass die eingesetzten Cytosole von verschiedenen Spendern stammen. Allein dieser Tatsache kann dazu führen, dass die ermittelten kinetischen Konstanten um 5 bis 13 % variieren können [57]. Da die Rezeptorkonzentration des eingesetzten Cytosols in die Berechnung der Assoziationskonstanten (k_{Ass}) mit einbezogen wird (siehe Experimenteller Teil, Kap. 1.8.1.2 Gl. 1-6) stellt sie somit einen möglichen Einflussparameter dar.

Bei Untersuchungen an Glucocorticoidrezeptoren aus humanem Muskelgewebe fand Snochowski [75] für Dexamethason einen k_{Ass} -Wert von $1,7 \cdot 10^5$ l/mol·min. Bell [64] bestimmte für Dexamethason eine Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von $4 \cdot 10^5$ l/mol·min mit aus Ratten isolierten Glucocorticoidrezeptoren. Beide Autoren führten allerdings ihre Assoziationsversuche bei 0 °C durch. Eine Erhöhung der Temperatur von 0 auf 20 °C führt zu einer Zunahme der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante um den Faktor 2 bis 3, wie von Wolff [76] und Hochhaus [57] beobachtet wurde. Die kleinen k_{Ass} von Bell und Snochowski dürften somit durch die niedrige Temperatur bedingt sein.

Längere Zeit wurde vermutet, dass sich verschiedene Glucocorticoide vorwiegend in ihren Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{Diss}), nicht jedoch in ihrer Assoziationskinetik voneinander unterscheiden [57, 77]. Tatsächlich wurden in späteren Untersuchungen nahezu identische Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten für Prednisolon, Methylprednisolon, Dexamethason und Triamcinolonacetonid gefunden [54].

Bei Untersuchungen mit hochaffinen inhalativ angewandten Glucocorticoiden der neueren Generation (Fluticasonpropionat, Budesonid) konnte gezeigt werden, dass Corticosteroide, die sich in ihrer Rezeptoraffinität stark voneinander unterscheiden, Unterschiede sowohl in ihrer Assoziations- als auch Dissoziationskinetik zeigen [56, 74]. Hierbei war die Affinität dieser Substanzen umso höher je schneller die Assoziation zum Rezeptor erfolgte. Dies wurde mit Mometasonfuroat in den eigenen Untersuchungen bestätigt.

1.2.5.2 Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten

Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (k_{Diss}) aus dem Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex kann aus der Abnahme der Konzentration des am Rezeptor spezifisch gebundenen [^3H]-Glucocorticoids [B_s] ermittelt werden. Dies ist jedoch nur dann möglich, wenn keine Rückassoziation des [^3H]-Glucocorticoids zum Rezeptor eintritt. Die Rückassoziation kann entweder durch Verdünnung des [^3H]-Glucocorticoids mit einem Überschuss an nicht markiertem Glucocorticoid oder durch Entfernung des nicht gebundenen Anteils nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichts mittels Aktivkohle verhindert werden [63]. Unter diesen Bedingungen und unter der Annahme, dass es sich dabei um eine Reaktion erster Ordnung handelt, kann die Konzentration des zum Zeitpunkt t am Rezeptor gebundenen [^3H]-Glucocorticoids [$B_{s,t}$] durch folgende Beziehung errechnet werden:

$$[B_{s,t}] = [B_{s,0}] \cdot e^{-k_{\text{Diss}} \cdot t}$$

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (k_{Diss}) wurde das Cytosol mit dem [^3H]-Glucocorticoid allein (Gesamtbindung) oder zusammen mit einem 1000-fachen Überschuss an nicht markiertem Glucocorticoid vorinkubiert. Anschließend wurde zum Inkubationsgemisch der Gesamtbindung ein 1000-facher Überschuss an nicht markiertem Glucocorticoid zugegeben und die Abnahme der spezifischen Bindung über mindestens 10 Stunden bei 20 °C verfolgt (siehe Experimenteller Teil, Kap. 1.8.2.1).

Nach halblogarithmischer Auftragung der zur Zeit t gemessenen Konzentration an spezifisch gebundenem [^3H]-Glucocorticoid [$B_{s,t}$] gegen die Zeit wird die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{Diss}) des untersuchten Glucocorticoids aus der Steigung der resultierenden Regressionsgeraden berechnet (Abb. 11).

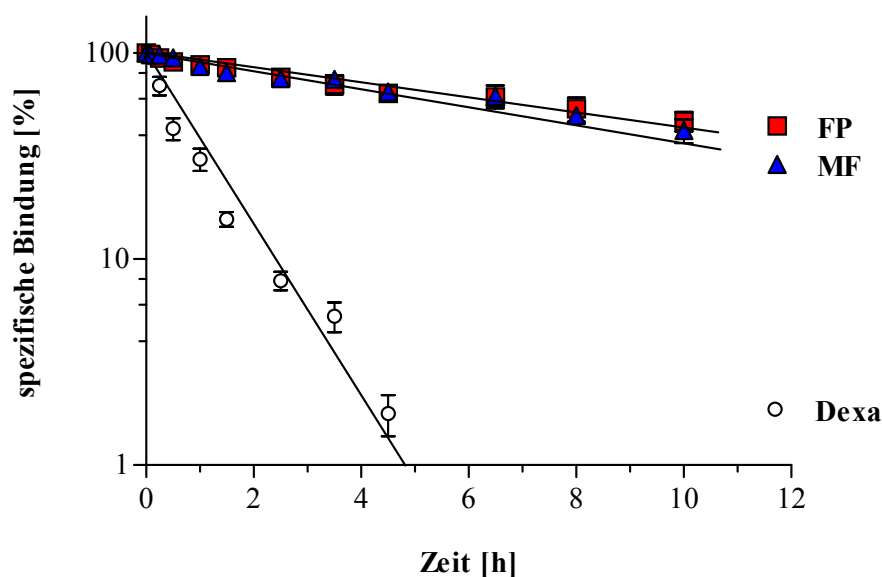


Abb. 11: Verlauf der Dissoziation aus dem Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex in humanem Lungencytosol bei 20 °C dargestellt am Beispiel von Dexamethason (Dexa), Fluticasonpropionat (FP) und Mometasonfuroat (MF). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und MA vom Mittelwert aus vier Versuchen.

Die Dissoziation des Mometasonfuroats aus dem Rezeptor-Komplex verläuft sehr langsam und ist nur geringfügig schneller als die des Fluticasonpropionats. Dexamethason dagegen dissoziiert im Vergleich dazu sehr schnell und wird nach etwa fünf Stunden nahezu vollständig aus dem Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex verdrängt.

Die aus den Dissoziationskurven der untersuchten Glucocorticoide abgeleiteten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{Diss}) sind in Tab. 4 im Vergleich zu anderen Literaturwerten wiedergegeben.

Tab. 4: Ermittelte Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{Diss} für Dexamethason, Fluticasonpropionat und Mometasonfuroat aus dem Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex in humanem Lungencytosol bei 20 °C im Vergleich zu Literaturdaten.

Glucocorticoid	Dexamethason	Fluticasonpropionat	Mometasonfuroat
k_{Diss}	$\times 10^{-4} (\text{min}^{-1})$	$\times 10^{-4} (\text{min}^{-1})$	$\times 10^{-4} (\text{min}^{-1})$
eigene Ergebnisse ¹⁾	$97,67 \pm 5,43$	$10,73 \pm 0,65$	$11,82 \pm 0,31$
Högger [56]	117	11,6	–
Esmailpour [74]	109	14,9	–

¹⁾ Mittelwerte \pm MA vom Mittelwert aus vier repräsentativen Versuchen.

Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten (k_{Diss}) wurden die Ergebnisse, wie bei den Assoziationsversuchen, aus vier Wiederholungen gemittelt und deren MA vom Mittelwert berechnet. Der daraus errechnete Variationskoeffizient lag bei allen untersuchten Glucocorticoiden unter 6,1 %. Auch die Dissoziationskonstanten konnten daher mit ausreichender Genauigkeit ermittelt werden.

Aus dem Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen wird sichtbar, dass die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten bei Fluticasonpropionat und Dexamethason mit den Werten von Högger [56] und Esmailpour [74] in der Größenordnung gut übereinstimmen (Tab. 4).

Die Halbwertszeit des Mometasonfuroat-Rezeptor-Komplexes unter den vorliegenden *in vitro* Bedingungen beträgt $9,8 (\pm 0,53)$ Stunden. Im Vergleich dazu verläuft die Dissoziation des Fluticasonpropionats aus dem Rezeptor-Komplex mit einer Halbwertszeit von $10,8 (\pm 0,64)$ Stunden noch langsamer ab. Der sehr steile Abfall der spezifischen Bindung von Dexamethason (Abb. 11) ergibt eine Halbwertszeit von durchschnittlich einer Stunde. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Mometasonfuroats unterscheidet sich nur wenig von der des Fluticasonpropionats, Mometasonfuroat dissoziiert sogar geringfügig schneller.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das im Vergleich zu Fluticasonpropionat neuere Mometasonfuroat sich ausschließlich in der Geschwindigkeitskonstante der Assoziation, nicht aber deutlich der Dissoziation von Fluticasonpropionat, dem Glucocorticoid mit bis dahin höchster bekannter Rezeptoraffinität, unterscheidet.

1.2.5.3 Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (K_D)

Bei Kenntnis der Assoziations- (k_{Ass}) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{Diss}) der hier unter gleichen Bedingungen untersuchten Glucocorticoide kann, wie unter 1.2.1 beschrieben, deren Gleichgewichtsdissoziationsgeschwindigkeitskonstante (K_D) berechnet werden. Die ermittelten K_D -Werte für Dexamethason und Fluticasonpropionat stehen erwartungsgemäß mit Werten aus früheren kinetischen Untersuchungen in guter Übereinstimmung (Tab. 5). Das zum ersten Mal untersuchte Mometasonfuroat zeigt mit 0,41 nmol/l die kleinste Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) zum humanen Glucocorticoidrezeptor gefolgt von Fluticasonpropionat mit 0,51 nmol/l.

Tab. 5: Berechnete Gleichgewichtsdissoziationsgeschwindigkeitskonstanten K_D für Dexamethason, Fluticasonpropionat und Mometasonfuroat im Vergleich mit Literaturdaten.

Glucocorticoid	Dexamethason	Fluticasonpropionat	Mometasonfuroat
K_D	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)
eigene Ergebnisse ¹⁾	8,80 ± 0,41	0,51 ± 0,03	0,41 ± 0,03
Högger [56]	9,36	0,49	–
Esmailpour [74]	11,25	0,55	–

¹⁾ Mittelwerte ± MA vom Mittelwert aus vier Versuchen.

Daraus kann eine hohe Bindungsaffinität des Mometasonfuroats zum Glucocorticoidrezeptor abgeleitet werden. Diese hohe Affinität beruht, wie zuvor ausgeführt, vorwiegend auf der vom Fluticasonpropionat deutlich verschiedenen Assoziationskinetik.

Für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Dexamethason mit 8,80 nmol/l wurden bei der Scatchard-Analyse (siehe 1.2.4 Tab. 2) zur Bestimmung der Rezeptorkonzentration ähnliche Werte (8,12 bis 10,30 nmol/l) berechnet.

Zur Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) wurden die Werte der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten aus vier Versuchen herangezogen. Der ermittelte Variationskoeffizient lag bei allen untersuchten Glucocorticoiden unter 7,3 %.

1.2.5.4 Berechnung der relativen Rezeptoraffinität (RRA) aus den kinetischen Konstanten

Um verschiedene Glucocorticoide miteinander zu vergleichen, können ihre sogenannten relativen Rezeptoraffinität (RRA) herangezogen werden. Bei Kenntnis der Gleichgewichtsdissoziationsgeschwindigkeitskonstante K_D eines Glucocorticoids kann dessen RRA mit Bezug auf Dexamethason berechnet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit aus den kinetischen Konstanten berechnete relative Rezeptoraffinität für Dexamethason, Fluticasonpropionat und Mometasonfuroat sind in Abb. 12 im Vergleich zu den Affinitäten anderer Glucocorticoiden dargestellt. Die RRA des Dexamethasons beträgt definitionsgemäß 100.

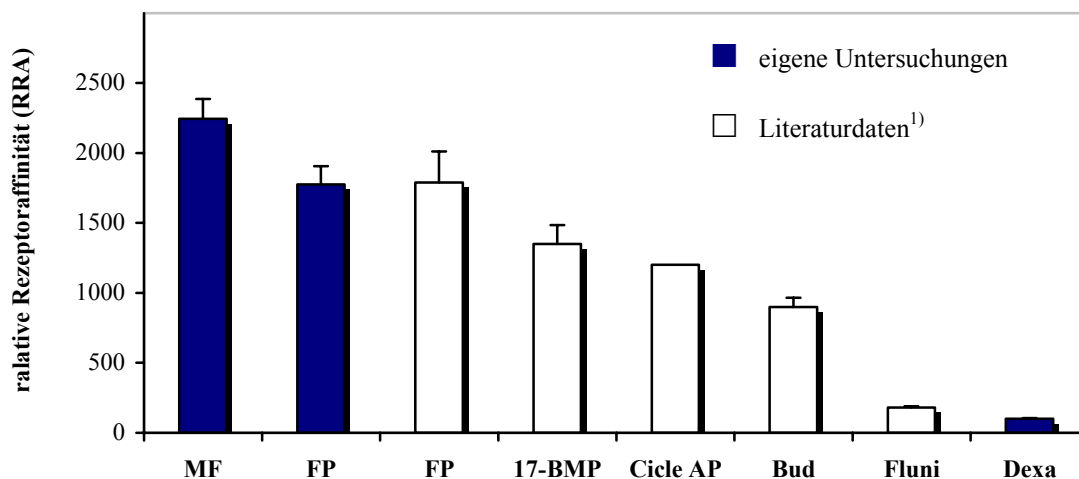


Abb. 12: Relative Rezeptoraffinitäten (RRA) zum humanen Glucocorticoidrezeptor von Mometasonfuroat (MF), Fluticasonpropionat (FP), Beclomethason-17-monopropionat (17-BMP), Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP) Budesonid (Bud) und Flunisolid (Fluni) im Verhältnis zur Dexamethason (Dexa) (RRA = 100). Die dargestellten RRA der eigenen Untersuchungen stellen die Mittelwerte und mittlere absolute Abweichungen (MA) vom Mittelwert aus vier Experimenten dar; ¹ RRA nach [55, 78].

Alle hier untersuchten Glucocorticoide zeigen entsprechend ihrer kinetischen Konstanten Unterschiede in ihrer Bindungsaffinität zum Glucocorticoidrezeptor. Basierend auf den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation wurde erwartungsgemäß für Mometasonfuroat mit 2244 ± 142 die höchste Affinität, gefolgt vom Fluticasonpropionat mit 1775 ± 130 , berechnet. Damit stellt die RRA des Mometasonfuroats die bislang höchste bekannte Bindungsaffinität eines Glucocorticoids zu seinem Rezeptor dar. Im Hinblick auf die Übereinstimmung der kinetischen Konstanten für Fluticasonpropionat und der daraus

errechneten relativen Rezeptoraffinität (RRA) von etwa 1800 mit Literaturdaten [55, 56, 74] kann eine RRA von 2200 für Mometasonfuroat zum Glucocorticoidrezeptor als gesichert angesehen werden.

In früheren Competitionstests mit Cytosol aus Rattenhaut zeigte Mometasonfuroat eine mit Betamethasonvalerat vergleichbar hohe Affinität zum Glucocorticoidrezeptor [79]. Zugleich wurden bei Untersuchungen der Bindung von Betamethasonvalerat und Fluticasonpropionat an den Glucocorticoidrezeptor humaner Lunge nahezu gleiche Affinitäten ermittelt [55]. Diese Ergebnisse waren die ersten Hinweise, dass es sich bei Mometasonfuroat um ein hochpotentes Glucocorticoid handelt. Anhand der verfügbaren *in vitro* und *in vivo* Daten konnte kürzlich gezeigt werden, dass beide Glucocorticoide vergleichbare physikochemische, pharmakologische und pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen [80].

Smith und Kreutner ermittelten mittels Wettbewerbsversuchen für Mometasonfuroat eine RRA zum rekombinanten Glucocorticoidrezeptor in COS-Zellen von 1235, für Fluticasonpropionat 813 und für Budesonid 258 [81]. Daraus ergibt sich ein Verhältnis der RRA von Fluticasonpropionat zu Budesonid von 1:3. Diese Ergebnisse stehen allerdings in Widerspruch zu anderen Untersuchungen, bei denen wiederholt ein Verhältnis der RRA dieser Glucocorticoide von 1:2 ermittelt wurde [33, 55, 56, 74]. Ähnliches konnte auch für die relative Wirkpotenz dieser Substanzen gezeigt werden [82].

Basierend auf den Ergebnissen von Smith und Kreutner wurde für die RRA des Fluticasonpropionats zu Mometasonfuroat ein Verhältnis von 0,65 angenommen [81]. Dies erscheint ungewöhnlich, da die klinische Effektivität des Mometasonfuroats bei Asthma [83] und allergischer Rhinitis [84] als vergleichbar mit der des Fluticasonpropionats eingeschätzt wurde. Aus den eigenen Studien zur Bestimmung der relativen Rezeptoraffinität lässt sich ein Verhältnis der Affinitäten von Fluticasonpropionat zu Mometasonfuroat von 0,79 berechnen. Damit stimmen sowohl die in den eigenen Untersuchungen ermittelte relative Rezeptoraffinität des Mometasonfuroats als auch die bestimmte mRNA-Expression von CD163 (siehe. 2.4) besser mit den klinischen Beobachtungen überein, als die bislang publizierten Werte.

Bei den eigenen Versuchen wurde die RRA der untersuchten Glucocorticoide nach der kinetischen Methode bestimmt. Dabei wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und der Dissoziation unabhängig voneinander ermittelt. Insbesondere bei Untersuchungen von Glucocorticoiden mit sehr hoher Rezeptoraffinität sind die komplexeren Bindungskinetikstudien zur Bestimmung der RRA – im Vergleich zu den Competitionstests – weit überlegen und liefern Ergebnisse mit einer viel höheren Präzision [56]. Mit Hilfe dieser Methode wurde eine RRA für

Mometasonfuroat von 2244 und für Fluticasonpropionat von 1775 bestimmt. Dies ergibt ein Verhältnis der RRA des Mometasonfuroats zu Fluticasonpropionat von 1:1,2, welches besser mit den klinischen Beobachtungen übereinstimmt als bisher publiziert wurde. Daraus kann man eindeutig ableiten, dass die in den eigenen Versuchen verwendete Methode zur Bestimmung der RRA dieser hochaffinen Substanzen geeigneter ist als die in der Literatur oft verwendeten Kompetitionsassays.

1.2.6 Bestimmung der Rezeptorbindungsaffinität mittels Konkurrenztests

Eine weitere Methode zur Bestimmung der RRA von Glucocorticoiden ist die Durchführung von Konkurrenzversuchen. Der Hauptvorteil dieser Versuchsführung besteht darin, dass die untersuchten Substanzen, bis auf den Tracer, nicht in markierter Form vorliegen müssen. Da diese Untersuchungen vor allem für Glucocorticoide mit einer geringen bis mittleren Rezeptoraffinität geeignet sind, wurde in den eigenen Versuchen die RRA der Metabolite des Mometasonfuroats 6 β -Hydroxy-Mometasonfuroat (6 β -OH-Mometasonfuroat) und Mometason, sowie das Degradationsprodukt 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat mittels Konkurrenz bestimmt.

Humanes Lungencytosol (1.2.3) wird mit tritiummarkiertem Glucocorticoid (Tracer) in Abwesenheit oder in Gegenwart eines weiteren nichtmarkierten Glucocorticoids (Kompetitor) inkubiert. Nach Gleichgewichtseinstellung und Abtrennung von ungebundenem Corticosteroid mittels Aktivkohlesuspension kann der Anteil markierter rezeptorgebundener Liganden bestimmt werden.

Die Auswertung erfolgt über eine von Rodbard [62] aufgestellten Logit-log-Transformation. Die Logit-Werte der gebundenen [³H]-Dexamethason-Konzentration (Tracer) werden gegen den Logarithmus der eingesetzten Konkretorkonzentrationen aufgetragen. Der Schnittpunkt der resultierenden Gerade mit der x-Achse gibt die Konzentration des Konkretors an, die 50 % des Tracers vom Rezeptor verdrängt (Abb. 13).

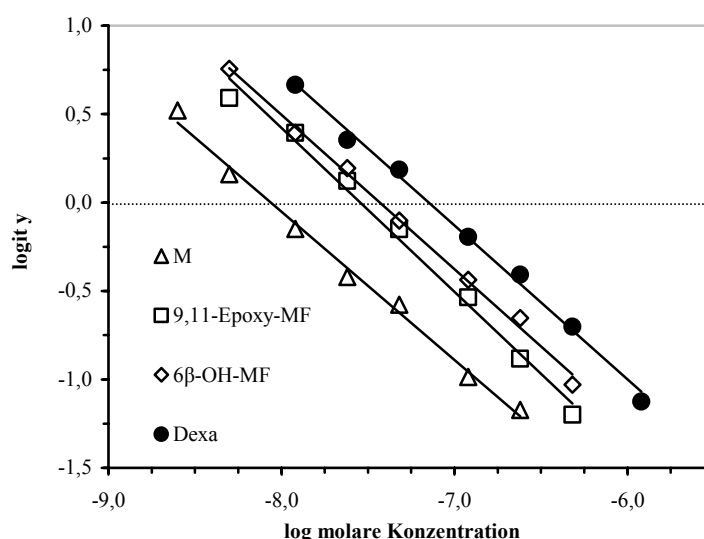


Abb. 13: Repräsentatives Logit-log-Diagramm aus Konkurrenzversuchen am Beispiel der Metabolite 6 β -Hydroxy-Mometasonfuroat (6 β -OH-MF), Mometason (M) und des Abbauproduktes 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat (9,11-Epoxy-MF) des Mometasonfuroats mit Dexamethason (Dexa) als Referenzsubstanz (●).

Die in dem Logit-log-Diagramm dargestellten Geraden zeigen die nach Rodbard et al. [62] linearisierten Konkurrenzkurven, die sich aus der Abnahme der spezifischen Bindung des radioaktiv markierten Tracers ($[^3\text{H}]$ -Dexamethason) als Funktion der eingesetzten Konkurrentkonzentration ergeben. Je niedriger die ermittelte Konzentration ist, d.h. je weiter die Gerade links im Diagramm liegt, umso höher ist die Bindungsaffinität des Glucocorticoids zum Rezeptor (Abb. 13).

Sowohl der Metabolit 6β -OH-Mometasonfuroat (RRA = 206 ± 15) als auch das Degradationsprodukt 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat (RRA = 220 ± 22) wiesen eine signifikant höhere Affinität zum humanen Glucocorticoidrezeptor auf als das zum Vergleich herangezogene Dexamethason (RRA = 100 ± 10) (Abb. 14). Mometason, das bei der Hydrolyse des Furoatesters gebildet wird, zeigt eine Rezeptoraffinität von 781 ± 27 . Zum Vergleich, die RRA des Mometasonfuroats beträgt 2200 (siehe 1.2.5.4).

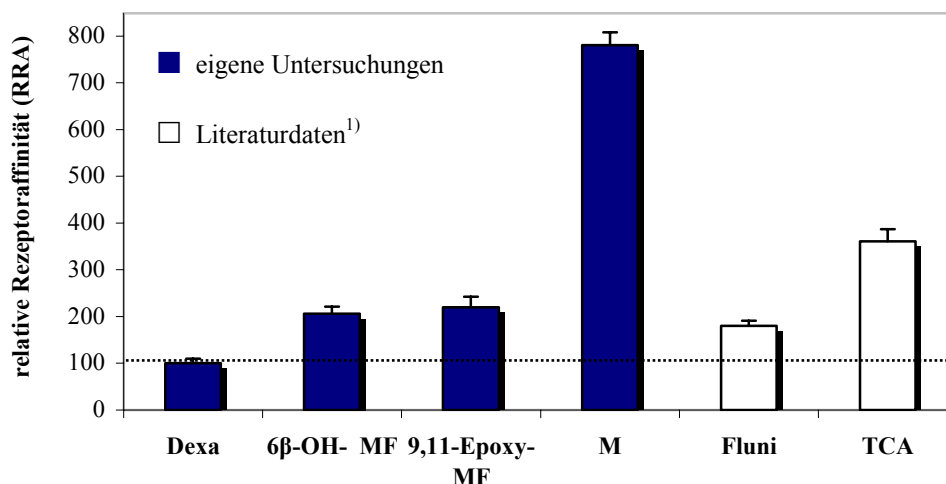


Abb. 14: Relative Rezeptoraffinitäten (RRA) zum humanen Glucocorticoidrezeptor der Mometasonfuroat-Metabolite 6β -Hydroxy-Mometasonfuroat (6β -OH-MF), Mometason (M) und seines Degradationsproduktes 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat (9,11-Epoxy-MF) im Verhältnis zu Dexamethason (Dexa) (RRA = 100), verglichen mit den RRA von Triamcinolonacetonid (TCA) und Flunisolid (Fluni). Die dargestellten RRA der eigenen Untersuchungen stellen die Mittelwerte und mittlere absolute Abweichungen (MA) vom Mittelwert aus drei Experimenten dar; ¹⁾ RRA nach [55].

Erstmalig konnte gezeigt werden, dass 6β -OH-Mometasonfuroat und 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat eine hohe Aktivität zum humanen Glucocorticoidrezeptor aufweisen. Die Bindungsaffinitäten dieser Substanzen sind vergleichbar mit denen anderer inhalativ angewendeter Corticosteroide, wie Flunisolid (180 ± 11) und Triamcinolonacetonid (361 ± 26) [55].

In einer früheren Studie wurden mögliche Metabolite bzw. Analoga des Mometasonfuroats bezüglich ihrer Bindungsaffinität mittels Wettbewerbsversuchen an Glucocorticoidrezeptoren aus Rattengewebe untersucht [79]. Als Tracer wurde [³H]-Triamcinolonacetonid eingesetzt. Dabei wurden aus den ermittelten IC₅₀ Werten die Inhibitionskonstanten (K_i) berechnet und miteinander verglichen. Mometasonfuroat wies eine hohe Bindungsaffinität zum Glucocorticoidrezeptor auf, die mit der des hochpotenten Betamethasonvalerats vergleichbar war. Erwartungsgemäß zeigten dagegen alle Metabolite des Mometasonfuroats eine niedrigere Rezeptoraffinität als Mometasonfuroat selbst. Im Vergleich zu Aclomethasondipropionat und Betamethasondipropionat war die Affinität der Metabolite jedoch höher. Somit lag die Vermutung sehr nahe, dass Mometasonfuroat aktive Metabolite bildet. In späteren Untersuchungen wurden 6β-OH-Mometasonfuroat und 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat als mögliche Metabolite beim Menschen diskutiert [85]. Parallel zu den eigenen Untersuchungen zeigten Studien von Teng et al. mit humanen Leber- und Darmmicrosomen, dass 6β-OH-Mometasonfuroat und 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat tatsächlich bei hepatischer bzw. intestinaler Metabolisierung oder einfacher Degradation entstehen können [86, 87].

Im Anschluss an die eigenen Bindungsstudien an humane Glucocorticoidrezeptoren wurde kürzlich von Sahasranaman et al. für Mometasonfuroat eine RRA von 2938 und für 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat von 433 im Cytosol aus Rattenlunge berichtet [88]. Die erhaltenen Bindungsaffinitäten wurden mittels Wettbewerbstests unter Verwendung des gleichen Tracers wie bei Isogai et al. [79] bestimmt. Die in dieser Studie ermittelte RRA von nahezu 3000 für Mometasonfuroat steht weder zu den eigenen noch zu anderen Untersuchungen im Einklang (siehe 1.2.5.4). Die für 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat ermittelte Bindungsaffinität von 433 lag etwa um den Faktor zwei höher als die der eigenen Wettbewerbstests mit humanem Lungencytosol und [³H]-Dexamethason als Tracer. Dies erscheint ungewöhnlich, da ein Tracer mit höherer Affinität zum Glucocorticoidrezeptor wie Triamcinolonacetonid zur geringeren Affinität führt. Sowohl Ponec et al. [89] mit [³H]-Triamcinolonacetonid als auch Högger und Rohdewald [56] mit dem hochaffinen [³H]-Fluticasonpropionat als Tracer ermittelten erwartungsgemäß geringere Bindungsaffinitäten für die gleichen Substanzen als mit dem weniger affinen [³H]-Dexamethason. Demnach müsste die von Sahasranaman et al. ermittelte RRA für 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat unter 200 liegen. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung dieser Ergebnisse könnte darin zu finden sein, dass die Untersuchungen mit Cytosol aus Rattengewebe durchgeführt wurden. Diese Spezies könnte Unterschiede im spezifischen

Bindungsverhalten von Glucocorticoiden im Vergleich zum humanen Cytosol aufweisen [90, 91].

Die Studien von Sahasranaman et al. und von Isogai et al. weisen weitere Unterschiede zu den eigenen Untersuchungen auf. Beide Autoren führten Konkurrenztests mit Glucocorticoidrezeptoren aus Rattengewebe bei niedriger Temperatur (0-4 °C) durch und verwendeten unterschiedliche Tracer, so dass ein direkter Vergleich der ermittelten Ergebnisse nicht möglich ist. Im Vergleich dazu wurden die eigenen Konkurrenzversuche bei 20 °C und an humanen Glucocorticoidrezeptoren durchgeführt, was eher den physiologischen Bedingungen entspricht.

Der bei Isogai et al. [79] angedeutete und durch eigene Versuche bestätigte Befund einer signifikanten RRA des 6 β -OH-Metaboliten von Mometasonfuroat erscheint ungewöhnlich. Eine Hydroxylierung in der 6 β Position am Grundgerüst eines Corticosteroids führt in der Regel zur Inaktivierung der Substanz. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 6 β -OH-Metaboliten verschiedener Glucocorticoide nahezu keine Bindungsaffinität zum Glucocorticoidrezeptor besitzen [92, 93]. Mometasonfuroat zeigt in diesem Zusammenhang andere Eigenschaften. Offensichtlich ist die durch das Substitutionsmuster des D-Rings am Grundgerüst resultierende Bindungsaffinität so hoch, dass eine Hydroxylierung alleine an der Position C6 nicht zur vollständigen Inaktivierung des Moleküls führt.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen in Übereinstimmung mit Literaturdaten [3, 79] auch, dass eine Epoxidierung des Mometasonfuroats unter Verlust der freien 11 β -OH-Gruppe zwar zu einer Verminderung der Bindungsaffinität zum Glucocorticoidrezeptor führt, jedoch nicht zur Inaktivierung des Moleküls. Dies wurde auch in einer kürzlich publizierten Studie bestätigt [88]. Wie unter 1.2.7 diskutiert ist anzunehmen, dass die Selektivität beeinflusst wird.

Obwohl sich die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung bestimmten RRA des 6 β -OH-Mometasonfuroats, 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats und Mometasons im Vergleich zu den Ergebnissen von Isogai [79] und Sahasranaman [88] unterscheiden, ist allen gemeinsam, dass sie eine hohe Affinität zum Glucocorticoidrezeptor aufweisen.

Abschließend lässt sich sagen, dass 6 β -OH-Mometasonfuroat, das bei der Metabolisierung des Mometasonfuroats in der Leber oder im Darm gebildet werden kann, noch deutlich aktiv ist. Das Degradationsprodukt 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat, welches in humanem Lungengewebe und Plasma entsteht, zeigt ebenfalls eine signifikant hohe Bindungsaffinität zum

Glucocorticoidrezeptor. Andere topisch angewendete Glucocorticoide wie Fluticasonpropionat und Budesonid sind dagegen stabil. Für Arzneistoffe wird generell eine hohe *in vivo* Stabilität und eine vollständige Biotransformation der aktiven Muttersubstanz zu inaktiven Metaboliten angestrebt. Die im Rahmen dieser Studie dargestellten Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis für eine nachteilige Eigenschaft des Mometasonfuroats. Diskutiert wurde auch eine ungewöhnlich niedrige pulmonale Verfügbarkeit des Mometasonfuroats, was durch Studien belegt wurde [85]. Dabei wurde die Konzentration des Mometasonfuroats nach Inhalation im Plasma erfasst. Das Ergebnis dieser Studien (abgesehen von methodischen/analytischen Mängeln) stand immer schon im Gegensatz zu einer beobachteten Suppression der Cortisol-Sekretion [94] und wurde auch von anderen Autoren kritisch diskutiert [80, 95, 96]. Die *in vivo* Bildung aktiver Metabolite könnte ein Beitrag zur Interpretation dieses Widerspruchs sein. Die Bildungsrate der Metaboliten bzw. des Degradationsprodukts *in vivo* und deren Beitrag zu Nebenwirkungen bedürfen jedoch noch der weiteren Aufklärung.

1.2.7 Korrelation zwischen Lipophilie und relativer Rezeptoraffinität (RRA)

Die Bindung eines Glucocorticoids an seinen cytosolischen Rezeptor beruht vorwiegend auf hydrophoben Wechselwirkungen. Die treibende Kraft dabei ist der Entropiegewinn durch die Verdrängung von Hydratwasser vom Rezeptor [76, 97].

Der Einfluss der Lipophilie verschiedener Glucocorticoide auf deren Bindungsstärke am Rezeptor wurde von Würthwein [55] durch Korrelation zur RRA gezeigt. Als Lipophilieparameter diente dabei der Kapazitätsfaktor k' , das heißt die relative Retentionszeit der untersuchten Substanz an einer reversed phase HPLC-Säule (siehe Tabellarischer Anhang unter 1.3). Diese relative Retentionszeit zeigt eine gute Korrelation mit anderen Lipophilieparametern wie z.B. dem 1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten [98, 99].

Wenn man die im humanen Lungencytosol ermittelten RRA einiger Glucocorticoide gegen die relative Retentionszeit (k') der Substanzen aufträgt, so erhält man eine lineare Beziehung (Abb. 15).

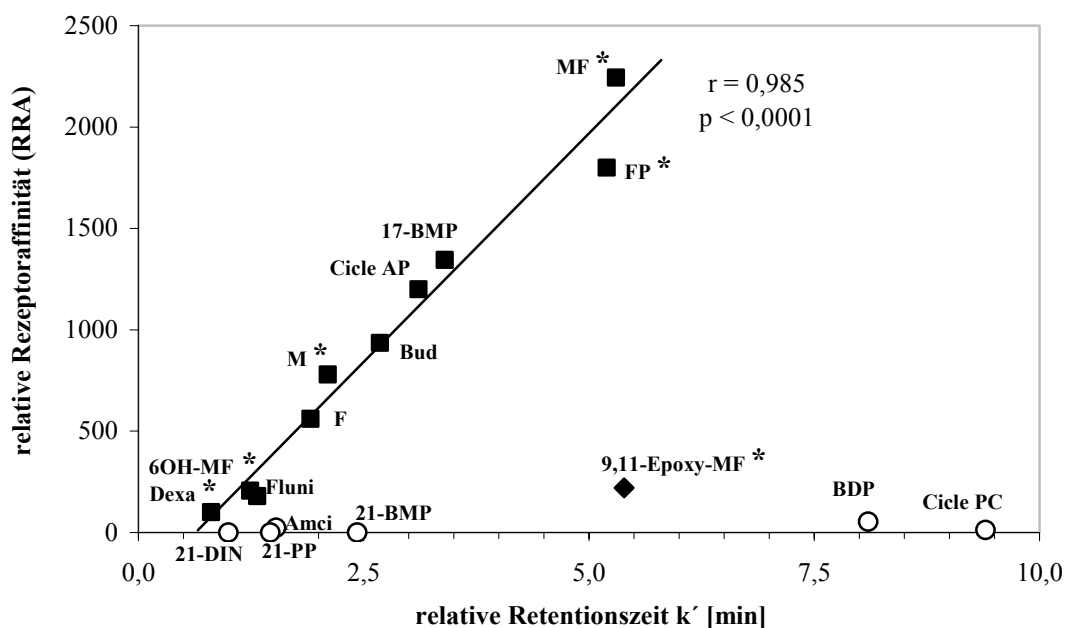


Abb. 15: Korrelation zwischen der relativen Rezeptoraffinität (RRA) (Referenzglucocorticoid Dexamethason) von Dexamethason (Dexa), Flunisolid (Fluni), 6 β -Hydroxy-Mometasonfuroat (6OH-MF), Fluticason (F), Mometason (M), Budesonid (Bud), Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP), Beclomethason-17-monopropionat (17-BMP), Fluticasonpropionat (FP), Mometasonfuroat (MF), 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat (9,11-Epoxy-MF), Dexamethason-21-isonicotinat (21-DIN), Prednisolon-21-propionat (21-PP), Amcinonid (Amci), Beclomethason-21-monopropionat (21-BMP), Beclomethason-17,21-dipropionat (BDP), Ciclesonid (Cicle PC) und ihrer relativen Retentionszeiten (k') (Referenzglucocorticoid Dexamethason-21-isonicotinat) an einer reversed phase HPLC-Säule. \circ Glucocorticoide, die am C21 verestert sind; \blacksquare Glucocorticoide ohne Esterfunktion am C21; \blacklozenge Glucocorticoid ohne C11-OH. Die RRA der mit (*) gekennzeichneten Glucocorticoide stammen aus eigenen Untersuchungen, die übrigen wurden der Literatur [55, 78] entnommen.

Würthwein unterteilte die Glucocorticoide in zwei große Gruppen [55]. Bei der ersten Gruppe der Steroide, die in Position C17 verestert sind, ist eine gute lineare Korrelation zwischen Lipophilie und RRA zu erkennen. Die in der eigenen Arbeit untersuchten 17-Ester 6 β -OH-Mometasonfuroat (6OH-MF), Fluticasonpropionat (FP) und Mometasonfuroat (MF) passen sehr gut in dieses Bild und bestätigen damit das frühere Ergebnis. Unter Einbeziehung der 16 α -17 α -Acetonide Flunisolid (Fluni), Budesonid (Bud), Desisobutyryl-Ciclesonid (aktiver Metabolit von Ciclesonid, Cicle AP) und der Alkohole Dexamethason (Dexa), Fluticason (F) und Mometason (M) findet man eine deutliche lineare Abhängigkeit zwischen der Lipophilie und der Affinität zum Glucocorticoidrezeptor ($r = 0,985$; $p < 0,0001$).

Steroide, die in Position C21 verestert sind, z.B. Beclomethason-21-monopropionat (21-BMP) und Beclomethason-17,21-dipropionat (BDP) bilden eine zweite Gruppe. Unabhängig von der Lipophilie der Moleküle besteht keine oder nur eine sehr schwache Affinität dieser Steroide zum Glucocorticoidrezeptor [55]. Auch das in diesem Zusammenhang hier untersuchte, ebenfalls in Position C21 veresterte Ciclesonid (Cicle PC) zeigt trotz eines großen Kapazitätsfaktors ($k' = 9,4$) eine sehr geringe Bindungsaffinität ($RRA = 12$ [78]) zum Glucocorticoidrezeptor.

Eine Ausnahme in den eigenen Untersuchungen stellt das Epoxid des Mometasonfuroats dar. Dieses 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat (9,11-Epoxy-MF) weist eine vergleichbar hohe Lipophilie wie Fluticasonpropionat und Mometasonfuroat auf (Abb. 15) und unterscheidet sich hinsichtlich des Substitutionsmusters am C17- bzw. C21-Atom vom Mometasonfuroat nicht. Eine Erklärung für die geringere Bindungsaffinität zum Glucocorticoidrezeptor ($RRA = 220$) im Vergleich zu Mometasonfuroat ($RRA = 2244$) selbst, könnte der Verlust der freien OH-Gruppe in Position C11 sein. Für die Glucocorticoidwirkung und damit verbundene Rezeptorselektivität ist eine freie OH-Gruppe in Position C11 essentiell [32, 100]. Dies hat zur Folge, dass bei gleichzeitigem Verlust der Hydroxygruppe am C11 und des Chloratoms am C9 des Mometasonfuroat im Sinne einer Epoxidierung zwar die Lipophilie des Moleküls wenig beeinflusst wird, andererseits aber eine nahezu 10fach geringere Bindungsaffinität zum Glucocorticoidrezeptor für das gebildete 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat resultiert. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen Steroiden gemacht [101]. Ein Molekülvergleich zwischen Eplerenon und Spironolacton, zwei Aldosteron-Rezeptorantagonisten, zeigt, dass geringe Strukturveränderungen die Selektivität des Moleküls zu seinem Rezeptor deutlich verändern können. Eplerenon ist ein 9,11-Epoxy Derivat des Spironolactons. Dieser Strukturunterschied zeigte für Eplerenon in *in vitro* Studien im Vergleich zu Spironolacton

einerseits eine hohe Selektivität zum Aldosteronrezeptor, andererseits eine 15-20fach geringere Affinität zum Mineralcorticoidrezeptor [102-104].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch mit der Untersuchung neuerer Glucocorticoide die früheren Ergebnisse [55] vollkommen bestätigt werden. Eine Veresterung in Position C17 bringt eine deutliche Affinitätssteigerung. C21-Ester sind lipophiler als ihre korrespondierenden Alkohole und stellen in der Regel inaktive Prodrugs dar. Zudem konnte in den eigenen Untersuchungen eine Besonderheit beobachtet werden. Die Epoxidierung in C9-C11-Position hat, bei sonst gleich bleibendem Substitutionsmuster, einen deutlichen Verlust der Affinität zum Glucocorticoidrezeptor zur Folge.

2 ***In-vitro*-Untersuchungen der mRNA-Expression von CD163**

Das Protein CD163 ist ein Vertreter der Scavengerrezeptor-Familie Gruppe B [105], die durch hoch konservierte cysteinreiche Proteindomänen gekennzeichnet ist. CD163 wird ausschließlich auf humanen Monocyten bzw. Macrophagen und daraus abgeleiteten Zellen (z.B. Kupffer-Zellen der Leber) exprimiert. Das membranständige Protein kann durch inflammatorische Reize von der Zelloberfläche abgespalten werden und damit auch als lösliche Variante existieren [106]. Durch frühere histologische Untersuchungen war bekannt, dass CD163 in inflammatorischen Läsionen von Patienten mit diversen akuten oder chronischen Erkrankungen gehäuft nachgewiesen wurde [107]. Darüber hinaus konnte die lösliche Variante des CD163 auch außerhalb des Gewebes im Plasma [108, 109] und in bronchioalveoläre Lavage (nichtpublizierte Daten) nachgewiesen werden.

Für die lösliche Variante des CD163 konnte eine aktive Hemmung der Phorbolster-induzierten Proliferation von T-Lymphozyten und damit eine entzündungshemmende Wirkung nachgewiesen werden [110]. Die membranständige Form des CD163 wirkt als Rezeptor für Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe [111, 112]. Glucocorticoide und Interleukin-10 induzieren sowohl *in vitro* auf frisch isolierten humanen Monocyten als auch *in vivo* die CD163-Expression [113-116]. Dabei korreliert die Induktion des CD163 mit der relativen Rezeptoraffinität des Glucocorticoids.

Bislang durchgeführte Untersuchungen zur Expression des CD163 erfolgten auf der Proteinebene. In eigenen Versuchen sollte nun der Einfluss verschiedener Glucocorticoide auf die Induktion des CD163 auf mRNA-Ebene betrachtet werden. Zunächst stellte sich die Frage, ob sich die Wirkpotenz der Glucocorticoide auch auf dieser Ebene widerspiegelt. Mometasonfuroat und Fluticasonpropionat können sich in ihrer Assoziationsgeschwindigkeit am Glucocorticoidrezeptor signifikant unterscheiden. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich aus einer unterschiedlichen Assoziationsgeschwindigkeit der Glucocorticoide an ihren spezifischen Rezeptor auch eine unterschiedliche Kinetik der mRNA-Induktion ableitet. Zur Bestimmung der mRNA wurde die quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) im *Real-time*-Modus eingesetzt.

2.1 Quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) gehört zu einer der bedeutendsten methodischen Entwicklungen in der Molekularbiologie des letzten Jahrhunderts. Mit Hilfe dieser Methode gelingt es in nur drei Schritten, durch Denaturierung der DNA, Anlagerung spezifischer Primer (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation), DNA zu vervielfältigen. So kann aus einer komplexen Matrix von Ausgangsmaterialien DNA bzw. RNA so spezifisch und schnell vermehrt werden, dass weitere Analysen problemlos durchgeführt werden können. Um die Expression eines Gens von Interesse zu untersuchen, müssen zunächst Intron-überspannende Oligonukleotidprimer konzipiert werden. Die als Primer bezeichneten Oligodesoxyribonukleotide definieren dabei den zu kopierenden Sequenzabschnitt, indem sie an Orten komplementärer Sequenz mit der Ziel-DNA hybridisieren und als Starter für die Polymerisation dienen. Kommerzielle Softwarepakete integrieren die Primer/Sondensuche und die Analyse auf mögliche Sekundärstrukturen (z.B. unter <http://www.premierbiosoft.com>).

Da sich RNA nicht direkt durch Einsatz der PCR amplifizieren lässt, muss diese zunächst in DNA umgeschrieben werden. Erreicht wird dieses durch die reverse Transkription, wobei je nach Ausgangsmatrix und Fragestellung verschiedene Reverse Transkriptasen verwendet werden können [117, 118]. Die Anwendung der reversen Transkription (RT) mit nachfolgender Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis einer spezifischen mRNA ist heute ein Routinewerkzeug in der Molekularbiologie. Die Bestimmung kann qualitativ in klassischen RT-PCR Blockcyclern oder quantitativ mittels Echtzeit RT-PCR (*Real-time-RT-PCR*) durchgeführt werden. Voraussetzung für eine zuverlässige Quantifizierung ist eine mRNA Analytik, die exakte Ergebnisse bei ausreichender Genauigkeit und hoher Wiederholbarkeit liefert [119].

2.1.1 *Real-time-PCR*

Die Quantifizierung eines bestimmten Gentranskripts innerhalb einer Zelle unter verschiedenen Einflüssen ist für viele Fragestellungen von großem Interesse. Mit den bisherigen molekularbiologischen Methoden (z.B. *northern blotting*) ist eine annähernde Quantifizierung spezifischer Genprodukte möglich. Diese Applikationen sind aber sehr zeitaufwendig. Durch die Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) werden Sensitivität und Geschwindigkeit der PCR ausgenutzt, damit ein bestimmtes Genexpressionsmuster, ausgehend von der exprimierten mRNA, detektiert und analysiert werden kann [120]. Allerdings spielt die Sensitivität der PCR

auch eine negative Rolle, da durch die PCR-Zyklen letztendlich ein sehr hohes Amplifikationsplateau erreicht wird. Die Höhe des Plateaus ist häufig unabhängig von der Menge an Target und wird meist durch Absinken der Konzentration einer Reaktionskomponente (z.B. Polymerase) in den geschwindigkeitsbestimmenden Abschnitt der Amplifikation beeinflusst. Deshalb kann nur wenig über die Menge zu Beginn vorhandenen mRNA ausgesagt werden.

Zur Quantifizierung des zu untersuchenden Amplifikats, haben sich verschiedene optische PCR-Systeme zur Online-Beobachtung des Amplifikationsstatus etabliert. Diese Art der PCR wird daher auch als *Real-time-PCR* bezeichnet, da die Quantität der amplifizierten Matrizen direkt („in Echtzeit“) abgelesen werden kann. Die Messung der Produktzunahme geschieht für den Amplifikationsprozess mit Hilfe von Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit der Produktmenge generiert wird [121, 122].

Die Visualisierung eines Amplifikats ist grundsätzlich mit zwei verschiedenen Fluoreszenzdetektionssystemen möglich: einem nichtspezifischen Detektionssystem, welches auf der Markierung des Amplifikats durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe basiert, oder einem spezifischen Detektionssystem, das fluoreszenzmarkierte Sonden (sequenzspezifische Primer) verwendet. Beide Detektionsmethoden beruhen auf der Tatsache, dass der Anstieg der Fluoreszenz proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes ist. Aufgrund einer Proportionalität der Fluoreszenz zu der entstehenden Amplifikate ist zudem eine Quantifizierung der Ausgangs-DNA bzw. -RNA möglich. Die während des Amplifikationsprozesses emittierte Fluoreszenz wird während jedes PCR-Zyklus gemessen und ermöglicht so eine graphische Darstellung der Amplifikation, die es dem Anwender erlaubt, die Reaktion in Echtzeit zu beobachten. Da sich die Kinetik der PCR-Reaktion beobachten lässt, wird manchmal auch der Begriff „kinetische PCR“ verwendet [123].

In der *Real-time-PCR* werden heute nicht mehr primär DNA-Produktmengen oder -Konzentrationen ermittelt, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die sog. Ct- (*cycle threshold*) oder CP- (*crossing point*) Werte herangezogen (Vgl. Experimenteller Teil 2.7.2). Sie entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen, die notwendig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Der Ct-Wert verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure [121]. Ist der Ct-Wert niedrig, so ist die eingesetzte DNA- bzw. unmittelbar RNA-Menge groß. Am Ct befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge neu synthetisierter DNA. Im Falle einer 100 %igen Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu

das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer Ct entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA (respektive mRNA Startmenge).

Eine Möglichkeit zur Generierung produktabhängiger Fluoreszenz bieten DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe. Zwischen doppelsträngigen Nukleinsäuren können kleine Moleküle eingelagert (interkaliert) werden, die unter Anregung von kurzwelligem UV-Licht (254–366 nm) längerwelligeres Licht (> 500 nm) emittieren. Diese Substanzen nennt man Interkalatoren, wobei der bekannteste Vertreter das mutagene Ethidiumbromid ist [124]. Dieses Molekül bindet allerdings auch einzelsträngige Nukleinsäuren, so dass es zum Nachweis von PCR-Amplifikaten nicht geeignet ist.

Neben Ethidiumbromid wurden auch andere fluoreszierende Interkalatoren verwendet, wie z. B. TO-PRO-1 (Abb. 16) [125, 126]. Der heute für die *Real-time-PCR* üblicherweise verwendete DNA-sensitive Farbstoff ist SYBR[®]Green I. Bei dieser Verbindung handelt es sich um einen unsymmetrischen Cyaninfarbstoff, der strukturell eng mit den dimeren DNA-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen Pico[®]Green [127], YOYO-1 [128] und TOTO-1 [129] verwandt ist. Die genaue Struktur von SYBR[®]Green I wurde erst vor kurzem durch Bindungsstudien (NMR-Messungen) dieser Verbindung an doppelsträngiger DNA bekannt (Abb. 16) [130].

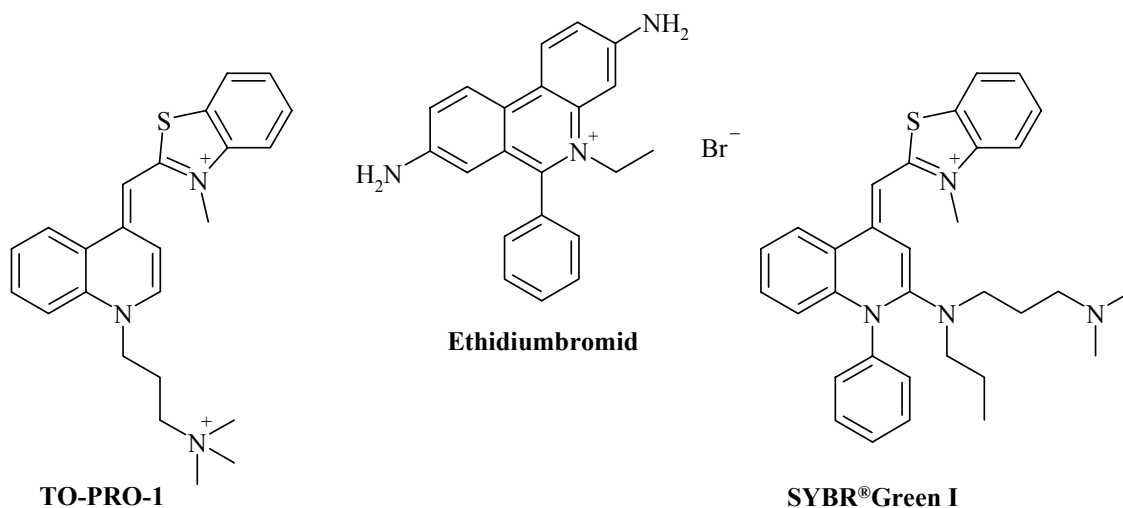


Abb. 16: Strukturen von PCR-Fluoreszenzfarbstoffen

SYBR[®]Green I interkaliert nicht, sondern bindet weitgehend sequenzspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA, mit einer etwa 100mal höheren Affinität als Ethidiumbromid. Das in der kleinen Furche gebundene SYBR[®]Green I fluoresziert nach Anregung etwa 1000mal stärker als der freie Farbstoff, weshalb SYBR[®]Green I sehr gut

geeignet ist, die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte in der *Real-time*-PCR sichtbar zu machen [131, 132]. SYBR[®]Green I lässt sich in Gegenwart von doppelsträngiger DNA mit Blaulicht (480 nm) anregen und zeigt ein dem Fluorescein vergleichbares Emissionsspektrum mit einem Maximum bei 520 nm bei einer Quantenausbeute von etwa 0.8 [133]. Das Prinzip der SYBR[®]Green I Detektion ist in Abb. 17 schematisch dargestellt.

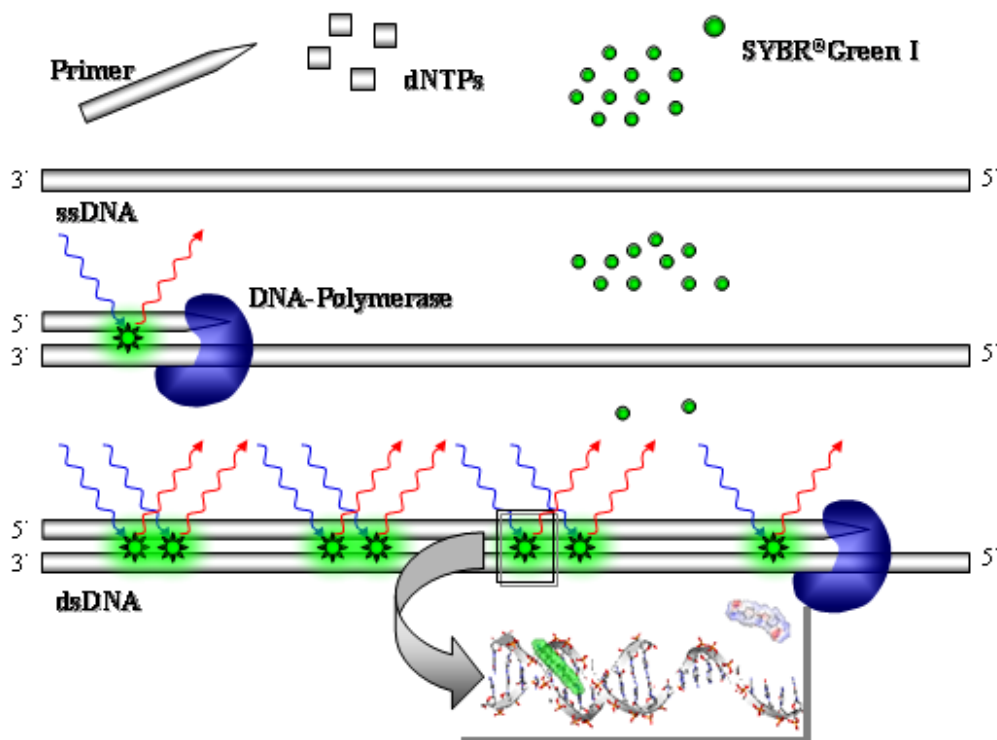


Abb. 17: Prinzip der SYBR[®]Green-Detektion von PCR-Produkten im *Real-time*-Modus am Beispiel der Amplifikation eines einzelnen DNA-Stranges (ssDNA). Frei in der Lösung vorkommendes SYBR[®]Green I (●) zeigt nach Anregung eine vernachlässigbare Hintergrundfluoreszenz. Nur in den kleinen Furchen der doppelsträngigen DNA (dsDNA) unspezifisch gebundener Farbstoff kann nach Anregung fluoreszieren. dNTP: 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat

Da SYBR[®]Green I sequenzunspezifisch an jedes doppelsträngige DNA-Produkt bindet, wird im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzkurve erstellt. Auf diese Weise kann nachgewiesen werden, dass nur ein Fragment mit einer bestimmten Schmelztemperatur entstanden ist (siehe Experimenteller Teil unter 2.7.2).

Durch die Verwendung fluorophormarkierter Oligonukleotide als Sonden, die mit der Zielsequenz hybridisieren, lassen sich PCR-Produkte auch sequenzspezifisch detektieren [134]. Hierbei wird entweder die produktabhängige Abnahme der Löschung (Quench) einer Reporter-Fluoreszenz oder die Zunahme des Resonanzenergietransfers von einem Donor- auf einen Akzeptorfluorophor gemessen [135]. Der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) ist ein

spektroskopischer Prozess, bei dem Energie strahlungsfrei durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Molekülen mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren über einen Bereich von 10-100 Å übertragen wird [136].

2.1.2 mRNA-Quantifizierung

Generell stehen zwei Quantifizierungsstrategien in der *Real-time*-PCR zur Verfügung: die absolute und die relative Quantifizierung.

Die absolute Quantifizierung wird anhand einer generierten Kalibrierkurve [137], basierend auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten, Plasmid DNA, *in vivo* transkribierter RNA, synthetischer DNA oder RNA Oligomeren durchgeführt.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens, in diesem Fall CD163, auf ein weiteres konstant exprimiertes sog. *housekeeping gene* (Referenzgen, z.B. β -Actin) bezogen, wodurch die Expressionsergebnisse normalisiert werden [138]. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche Extraktionseffizienzen, sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer Probe gleichermaßen Zielgen und Referenzgen betreffen. Die am häufigsten zur Normalisierung herangezogenen Referenzgene sind β -Actin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, ribosomale Untereinheiten und Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase [139]. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten Proben (z.B. Stimulation von Monocyten durch Glucocorticoide) wurde auf ein Kontrollprobenmaterial (unstimulierte Monocyten) bezogen. Die Berechnung des Expressionsverhältnisses zwischen behandelten und unbehandelten Proben kann über die sog. $\Delta\Delta Ct$ Methode oder über genauere effizienzkorrigierte Modelle erfolgen [140].

Bei der $\Delta\Delta Ct$ Methode wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

Nach dieser Normierung wird vom ΔCt -Wert der behandelten Proben der ΔCt -Wert der Kontrollproben abgezogen:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandlung}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen, ergibt sich aus folgender arithmetischen Formel [141]:

$$\text{rel. Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Das Berechnungsschema der $\Delta\Delta Ct$ Methode setzt eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem Zyklus voraus. Man geht von einer optimalen *Real-time*-PCR Effizienz in allen Proben aus, was in der Praxis jedoch nicht immer der Fall ist. Die wahre Effizienz dürfte sich unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,6 bis 1,9 bewegen und weist Schwankungsbreiten von 1,5 bis über 2,0 auf [142]. Geringste Schwankungen in den Effizienzen von Ziel- zu Referenzgen führen jedoch zu starken Abweichungen der berechneten Expressionsunterschiede [140, 142, 143].

Die relative Quantifizierung lässt sich weiter optimieren, indem man die unterschiedlichen *Real-time*-PCR-Effizienzen (E) der untersuchten Genabschnitte mitberücksichtigt. Ausgehend von der bereits erwähnten $\Delta\Delta Ct$ Methode wurde von Pfaffl und Mitarbeitern ein effizienzkorrigiertes relatives Quantifizierungsmodell entwickelt [140]. Dieses Berechnungsmodell setzt sich aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung und Kontrolle im Zielgen (ΔCt_{CD163}) im Zähler und aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes des Referenzgens ($\Delta Ct_{\beta\text{-Actin}}$) im Nenner nach folgender Gleichung zusammen:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{CD163})^{\Delta Ct_{CD163}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E_{\beta\text{-Actin}})^{\Delta Ct_{\beta\text{-Actin}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}$$

Die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung mittels *Real-time*-PCR stellt bis dato die genaueste Methode der mRNA Bestimmung dar [140]. Im Vergleich zu anderen effizienzkorrigierten Berechnungsmodellen weist das oben vorgestellte Quantifizierungsmodell

die geringste Varianz und höchste Genauigkeit auf [144] und wurde deshalb zur Auswertung der eigenen Untersuchungen herangezogen.

2.2 Prinzip der Untersuchung

Zur Bestimmung der Induktion der CD163-mRNA wurden humane Monocyten aus Blutzell-Suspensionen isoliert und eine bis sieben Stunden mit verschiedenen Glucocorticoiden bei 37 °C stimuliert. Nachfolgend wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Der Gehalt und die Reinheit der so gewonnenen RNA wurden spektralphotometrisch bestimmt. Im nächsten Schritt wurden gleiche Ausgangskonzentrationen an Gesamt-RNA mittels reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente dann als Amplifikationsmatrix für die Durchführung der *Real-time*-PCR. Zur Überprüfung der Regulation des hier gewählten Genabschnitts für CD163 durch die eingesetzten Glucocorticoide, wurden unstimulierte Monocyten (Kontrolle) herangezogen. Die Quantifizierung der Genexpression des CD163 erfolgte relativ zu einem nicht durch Glucocorticoide regulierten Referenzgen, dem β -Actin, nach dem effizienzkorrigierten Quantifizierungsmodell. Genaue Versuchsbedingungen sind im Experimentellen Teil unter 2.7 beschrieben.

2.3 Induktion der CD163-mRNA durch Glucocorticoide

Zur Induktion der mRNA wurden für Fluticasonpropionat und Mometasonfuroat Konzentrationen von jeweils 10^{-8} M eingesetzt. Ähnliche Konzentrationen wurden bereits bei den Studien zur Bindungskinetik der Glucocorticoiden an ihrem Rezeptor verwendet (siehe Experimenteller Teil unter 1.8). Auf Grund der geringen Rezeptoraffinität des Dexamethasons im Vergleich zu den beiden anderen Glucocorticoiden wurde eine höhere Konzentration gewählt. Diese Konzentration war vergleichbar mit Literaturangaben zu Stimulationsversuche mit Dexamethason und betrug 10^{-6} M [114, 115].

Högger et al. beobachteten ein Expressionsmaximum der CD163-mRNA nach Stimulation mit Fluticasonpropionat bei etwa acht Stunden [114]. Für die eigenen Versuche wurde die Stimulationszeit auf sieben Stunden begrenzt.

Das Ausmaß der relativen mRNA-Expression von CD163 in humanen Monocyten durch die hier untersuchten Glucocorticoide ist exemplarisch in Abb. 18 dargestellt.

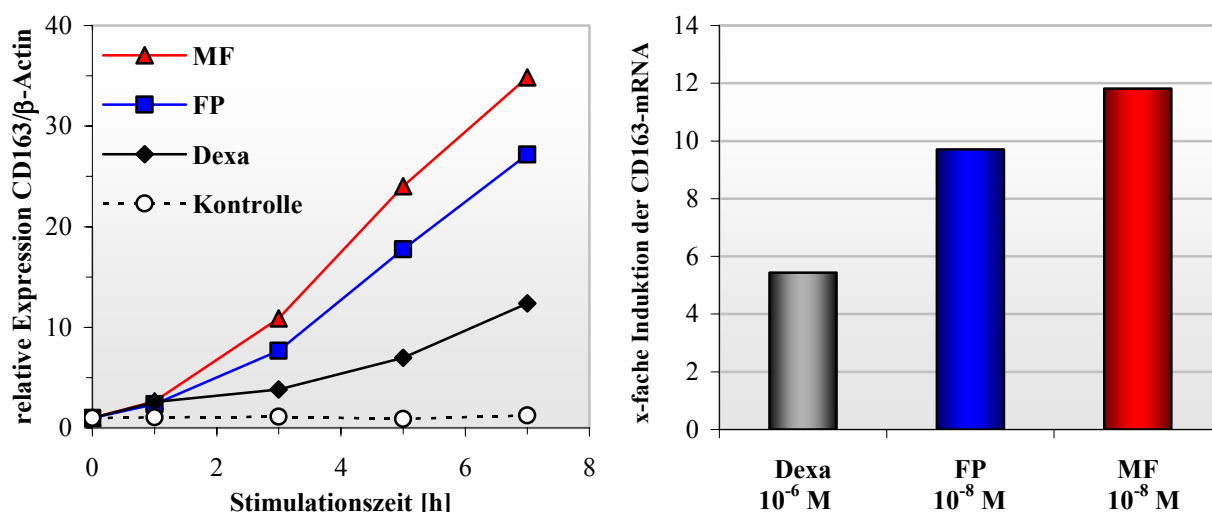


Abb. 18: Induktion der CD163-mRNA in humanen Monocyten durch 10^{-8} M Mometasonfuroat (MF), 10^{-8} M Fluticasonpropionat (FP) und 10^{-6} M Dexamethason (Dexa). Links: Zeitlicher Verlauf der mRNA-Zunahme im Vergleich zu unstimulierten Monocyten (Kontrolle) während einer siebenstündigen Stimulation bei 37 °C. Rechts: Berechneter Faktor der Induktion des CD163-Genabschnitts über die Stimulationsdauer von sieben Stunden mittels der Berechnungssoftware Rest[®] [143]. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei repräsentativen Inkubationsreihen.

Die mRNA-Expression durch Mometasonfuroat (MF), Fluticasonpropionat (FP) und Dexamethason (Dexa) erfolgte in der ersten Stunde im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben relativ langsam und war bei allen vergleichbar. Erst nach dieser Initialphase waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Ähnliche Verläufe der Expressionskinetik wurden auch bei anderen glucocorticoidinduzierten Gentranskriptionen beschrieben [145, 146]. Eine Erklärung für diese Verzögerung könnte darin liegen, dass zunächst mehrere intrazelluläre Prozesse ablaufen müssen bis es zu einer Beeinflussung der Transkription kommen kann. Die Assoziation der hier untersuchten Glucocorticoide mit ihrem Rezeptor erreicht beispielsweise nach etwa 30 Minuten ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und frei vorkommendem Corticosteroid (siehe 1.2.5.1). Nachfolgend muss der so aktivierte Rezeptor dimerisieren und in den Nukleus gelangen. Der Komplex aus Ligand und Glucocorticoidrezeptor kann dann im Zellkern an seinen spezifischen Promoter binden und dadurch die Gentranskription beeinflussen. Nichtgenomische Prozesse, wie die Membranpenetration oder Rezeptorbindung eines Glucocorticoids, laufen in wenigen Sekunden bis einigen Minuten ab [22, 147]. Genomische Wirkungen dagegen werden frühestens nach einer Stunde vermittelt. Dies konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 18 links).

Für Mometasonfuroat wurde entsprechend seiner relativen Rezeptoraffinität über die Stimulationsdauer von sieben Stunden die größte relative mRNA-Expression für CD163

ermittelt. Der hieraus errechneter Faktor betrug 11,8 (Abb. 18 rechts). Der Verlauf der CD163-mRNA-Induktion durch Fluticasonpropionat war vergleichbar mit der des Mometasonfuroats und deutlich höher als im Falle des Dexamethasons (Abb. 18 links). Die daraus berechneten Faktoren der Expression lagen durchschnittlich bei 9,7 für Fluticasonpropionat und 5,4 für Dexamethason (Abb. 18 rechts). Obwohl die eingesetzte Konzentration des Dexamethasons (10^{-6} M) um den Faktor 100 höher lag als bei Fluticasonpropionat und Mometasonfuroat (jeweils 10^{-8} M), konnte über die hier gewählte Stimulationszeit kein vergleichbares Expressionsniveau erreicht werden. Dies könnte an der signifikant unterschiedlichen Bindungskinetik des Dexamethasons am Glucocorticoidrezeptor im Vergleich zu Fluticasonpropionat und Mometasonfuroat liegen.

In früheren Untersuchungen wurde zur Induktion der CD163-Expression durch Fluticasonpropionat meistens eine Konzentration von 10^{-8} M eingesetzt [114, 115]. Ausgehend von dieser Konzentration und unter Berücksichtigung der relativen Rezeptoraffinität (RRA) des Fluticasonpropionats (RRA = 1800) wurden entsprechend ihrer RRA (siehe 1.2.5.4) für Mometasonfuroat (RRA = 2244) und Dexamethason (RRA = 100) equipotente Konzentrationen von $7,8 \cdot 10^{-9}$ M und $1,8 \cdot 10^{-7}$ M berechnet. So wurden in einer zweiten Inkubationsreihe Glucocorticoidkonzentrationen zur Stimulation humaner Monocyten eingesetzt, bei denen gleiche Wirkungen/Effekte auf die mRNA-Induktion zu erwarten waren (Abb. 19). Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Assoziationskinetik der einzelnen Glucocorticoide an ihrem Rezeptor auch Unterschiede in der Induktionskinetik der CD163-mRNA darstellen.

Tatsächlich waren sowohl die Expressionsverläufe als auch die errechnete x-fachen Induktion für Fluticasonpropionat und Mometasonfuroat nahezu identisch (Abb. 19). Diese Ergebnisse zeigen erstmalig eine direkte Abhängigkeit des Ausmaßes der mRNA-Induktion hochaffiner Glucocorticoide von ihrer Konzentration und relativen Rezeptoraffinität. So führte eine Konzentrationserniedrigung für Mometasonfuroat (MF) von $1,0 \cdot 10^{-8}$ M auf $7,8 \cdot 10^{-9}$ M zu einer 20 %igen Abnahme der CD163-mRNA-Induktion. Diese lag für Dexamethason (Dexa) bei einer Konzentration von $1,8 \cdot 10^{-7}$ M etwa um 37 % niedriger als bei den Stimulationsversuchen mit $1,0 \cdot 10^{-6}$ M. Obwohl equipotente Konzentrationen eingesetzt wurden, lag die Induktion der CD163-mRNA für Dexamethason im Vergleich zu den anderen deutlich niedriger (Abb. 19 rechts). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Überlagerung von Assoziations- mit Dissoziationsvorgängen des Dexamethasons am Glucocorticoidrezeptor (Halbwertszeit des Dexamethason-Rezeptor-Komplexes: etwa eine Stunde) während des Versuchszeitraumes sein.

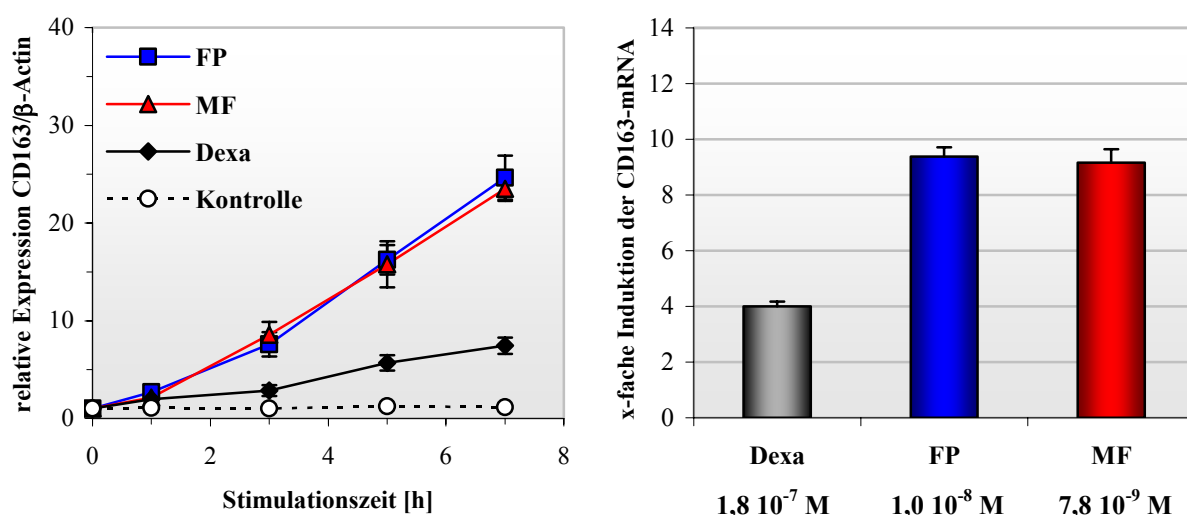


Abb. 19: Induktion der CD163-mRNA in humanen Monocyten durch equipotente Glucocorticoidkonzentrationen an Mometasonfuroat (MF), Fluticasonpropionat (FP) und Dexamethason (Dexa). Links: Zeitlicher Verlauf der mRNA-Zunahme im Vergleich zu unstimulierten Monocyten (Kontrolle) während einer siebenstündigen Stimulation bei 37 °C. Rechts: Berechneter Faktor der Induktion des CD163-Genabschnitts über die gesamte Stimulationsdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte ± mittlere Abweichungen vom Mittelwert aus drei Versuchen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die durch Mometasonfuroat induzierte mRNA-Expression des CD163 *in vitro* unter gleichen Bedingungen entsprechend der RRA des Mometasonfuroats tatsächlich höher lag als die, die durch Fluticasonpropionat und Dexamethason erzielt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass die in der Literatur beschriebene Korrelation zwischen der relativen Rezeptoraffinität verschiedener Glucocorticoide mit der daraus resultierenden Proteininduktion des CD163 auf der Zelloberfläche humaner Monocyten sich auch auf mRNA-Ebene wiederfinden lässt. Dabei wurde eine schnelle, quantitative Methode entwickelt, die eine Abschätzung der Wirkstärke neuerer Glucocorticoide am Modell CD163 ermöglicht. Die schnellere Assoziationskinetik des Mometasonfuroats am Glucocorticoidrezeptor im Vergleich zu Fluticasonpropionat spiegelte sich beim Einsatz equipotenter Konzentrationen jedoch nicht in einer unterschiedlichen Kinetik der CD163-mRNA Induktion wider.

2.4 Korrelation der Rezeptoraffinität mit zellulären Effekten *in vitro*

Die antiinflammatorischen Effekte der Glucocorticoide *in vitro* korrelieren in hohem Maße mit den relativen Rezeptoraffinitäten (RRA) der Substanzen. Das zeigte eine Reihe von Untersuchungen, die mit entzündungsrelevanten Zellen durchgeführt wurden. Humane Lungenepithelzellen exprimieren nach Stimulation mit Glucocorticoiden SLPI (*secretory leucocyte protease inhibitor*), einen Proteaseinhibitor mit antientzündlicher Wirkung [148]. Die Konzentrationen verschiedener Glucocorticoide (Fluticasonpropionat, Triamcinolonacetonid, Dexamethason, Methylprednisolon und Hydrocortison), die erforderlich waren um eine 50 %ige Expression des SLPI zu erzielen, korrelierte in hohem Maße mit der RRA dieser Corticosteroide. Ähnliches konnte sowohl für die Hemmung der anti-CD3 induzierten Proliferation humaner T-Lymphocyten [149], als auch für die glucocorticoidinduzierte Apoptose von T-Zellen gezeigt werden [150]. In aktivierten Mastzellen konnte eine Vorbehandlung mit Dexamethason oder Fluticasonpropionat die Freisetzung von Cytokinen dosisabhängig hemmen [151]. Aus den erforderlichen Dosen zur Erzielung eines gleichen Effektes ließ sich ein Verhältnis Fluticasonpropionat zu Dexamethason von etwa 1:18 errechnen. Dies spiegelt das Verhältnis der RRA dieser Substanzen zueinander wieder.

Neben den oben genannten Zellen spielen insbesondere Monocyten und Macrophagen eine Schlüsselrolle im Entzündungsgeschehen. Monocyten/Macrophagen exprimieren nach Stimulation mit Glucocorticoiden das Oberflächenprotein CD163, für das antiinflammatorische Eigenschaften postuliert wurden [3, 113, 115]. Im Rahmen einer Studie mit humanen Monocyten konnte gezeigt werden, dass die Induktion der CD163-Expression außerordentlich gut mit der RRA der eingesetzten Glucocorticoide korrelierte [115]. Dabei wurde mittels Durchflusscytometrie die Dichte des CD163-Antigens auf der Zelloberfläche nach Glucocorticoidstimulation bestimmt. Analog zur Berechnung der RRA (Vgl. 1.2.2) ist dabei die relative Proteinexpression ermittelt worden. Die Korrelation zwischen der Proteinexpression und der RRA war sehr hoch. Der ermittelte Korrelationskoeffizient betrug im Durchschnitt 0,99.

In einer früheren Studie wurde die ligandeninduzierte Aktivierung der von einem Glucocorticoid-Response-Element regulierten Transkription in transfizierten CV-1 Zellen durch verschiedene Glucocorticoide untersucht [81]. Dabei wurden in einem Reporter-gen-Assay EC_{50} -Werte von 0,07 nM für Mometasonfuroat, 0,32 nM für Fluticasonpropionat und 4,8 nM für Dexamethason berechnet. Entsprechend diesen EC_{50} -Werten stimulierte Mometasonfuroat die Glucocorticoidrezeptor-vermittelte Transaktivierung der Genexpression am stärksten. Daraus

lässt sich ein Verhältnis der Transaktivierung durch Fluticasonpropionat zu Mometasonfuroat von 4,6 berechnen. Im Gegensatz dazu berichteten Roumestan et al. über eine äquivalente Aktivierung der Transkription eines Glucocorticoid-induzierten Luciferasegens in HeLa-MMTV-Luc Zellen durch Mometasonfuroat und Fluticasonpropionat [152]. In der eigenen Untersuchung zur mRNA-Expression des CD163 wurden unter equimolaren Konzentrationen Expressionsfaktoren von durchschnittlich 11,8 für Mometasonfuroat und 9,7 für Fluticasonpropionat ermittelt. Dies ergab ein Verhältnis der mRNA-Expression durch Fluticasonpropionat zu der durch Mometasonfuroat von 0,82, das deutlich näher an der beobachteten äquivalenten Aktivierung der Transkription lag.

Diese *In-vitro*-Studien zur Abschätzung der Wirkstärke von Glucocorticoiden in humanen Monocyten bestätigen die Eignung des Modellsystems der Induktion des CD163 auch auf mRNA-Ebene und lassen somit eine Einordnung der Wirkpotenz neuerer Glucocorticoide zu.

Interessanterweise konnte auch eine gute Übereinstimmung der Relationen der klinischen Effektivität mit den Verhältnissen der relativen Rezeptoraffinität inhalativ angewandter Glucocorticoide mittels Metaanalyse gezeigt werden [47].

3 *In-vitro*-Untersuchungen zur Gewebefindung inhalativ angewendeter Glucocorticoide

Für die topische Wirkung inhalativer Glucocorticoide in der Lunge ist neben der spezifischen Bindung am Rezeptor auch die Bindung an das Gewebe der Atemwege von großer therapeutischer Bedeutung. Glucocorticoide mit hoher Gewebefindung bilden ein Wirkstoffdepot im Gewebe, wodurch ein Abtransport in die systemische Zirkulation verlangsamt wird. Dies hat zur Folge, dass hohe Plasmakonzentrationen vermieden werden und gleichzeitig die Gefahr unerwünschter Wirkungen reduziert wird [35].

Wird eine Substanz in hoher Konzentration und über längere Zeit im Gewebe angereichert, so kann sie ihre Zielzellen innerhalb des Gewebes auch dann noch erreichen, wenn die Plasmakonzentration bereits auf Werte abgefallen ist, die keinen pharmakologischen Effekt mehr zeigen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sich bei Patienten, die sich einer Lungenteilresektion unterziehen mussten, nach Inhalation verschiedener Glucocorticoide noch nach mehreren Stunden weit höhere Konzentrationen des inhalierten Glucocorticoids im Gewebe nachweisen ließen als im Plasma [153-155]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass zwischen den einzelnen Substanzen deutliche Unterschiede hinsichtlich der gebundenen Konzentrationen bestehen [43, 156].

Die Gewebefindung von Glucocorticoiden kann *in vitro* mittels Bindungsstudien untersucht werden. Dabei wird sowohl die Adsorption am Gewebe als auch die Desorption vom Gewebe in das Plasma über einen bestimmten Zeitraum verfolgt.

In der inhalativen Therapie des Asthma bronchiale eingesetzte Glucocorticoide zeichnen sich im Vergleich zu den systemisch applizierten Corticosteroiden durch stärkere lipophile Eigenschaften aus. Während ältere Substanzen wie Flunisolid und Triamcinolonacetonid eine geringe Gewebefindung zeigen, ist diese bei Budesonid höher [154]. Im Vergleich dazu findet man für die lipophileren Substanzen Fluticasonpropionat und Beclomethasondipropionat eine schnellere und ausgeprägte Bindung an das Gewebe sowie eine sehr langsame Umverteilung in das Plasma [156, 157]. Diese Beobachtungen kommen durch die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen, wie Lipophilie und Wasserlöslichkeit zustande. Eine Beziehung zwischen der Lipophilie einer Substanz und ihrer Bindungsaffinität zum Gewebe wurde bereits in früheren Publikationen gezeigt [158-161]. Diskutiert wird auch eine reversible

intrazelluläre Veresterung einiger Glucocorticoide, wie z.B. Budesonid, mit Fettsäuren, die zu einer verlängerten Verweildauer der Wirksubstanz im Gewebe beiträgt [45].

Vergleicht man die Daten zur Gewebefindung aus klinischen Studien (*in vivo*) [153-155] mit den Bindungsverhältnissen der Substanzen *in vitro* [156] so stellt man fest, dass die *in vitro* ermittelten Verhältnisse der Bindungsaffinitäten verschiedener Glucocorticoide zueinander sich auch *in vivo* widerspiegeln. Damit kann man die *In-vitro*-Studien zur Gewebefindung verschiedener Glucocorticoide für die Vorhersage von *In-vivo*-Verhältnissen als geeignet ansehen.

Zu den topisch angewandten Glucocorticoiden der neueren Generation zählen unter anderem Mometasonfuroat und seit kurzem Ciclesonid. Bislang lagen kaum Daten zur Gewebefindung beider Corticosteroide vor. Lediglich das dermale/epidermale Bindungsverhältnis von Mometasonfuroat wurde in Rattengewebe im Vergleich zu Aclomethasondipropionat, Beclomethasondipropionat und Bethamethason-17-valerat untersucht [79]. Da Mometasonfuroat neben der dermalen und intranasalen Applikation auch inhalative Anwendung findet und Ciclesonid ein neues inhalativ angewandtes Glucocorticoid darstellt, ist ein Vergleich der Bindung dieser Glucocorticoide an humanes Lungengewebe von Interesse.

In der vorliegenden Untersuchung sollten daher die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Bindung des in der Asthmatherapie eingesetzten Mometasonfuroats und Ciclesonids im Vergleich zu Fluticasonpropionat an humanes Lungengewebe sowie deren Umverteilung in Humanplasma *in vitro* untersucht werden.

3.1 Prinzip der Bestimmung

Um die Adsorption inhalativ angewandeter Glucocorticoide an Lungengewebe *in vitro* zu ermitteln, wurde fein geschnittenes peripheres Lungengewebe in glucocorticoidhaltigem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer bei 37 °C inkubiert. Zu festgelegten Zeiten wurden dem Puffer Proben entnommen und das entsprechende Volumen durch frischen Puffer ergänzt. Nach 60 min wurde zur Messung der Desorption der Glucocorticoide vom Gewebe und Verteilung in das Plasma das glucocorticoidgesättigte Gewebe vom Puffer abgetrennt, in Humanplasma suspendiert und bei 37 °C weitere 60 min geschüttelt. Durch das Plasma sollte die Umverteilung der Glucocorticoide aus dem Gewebe in die systemische Zirkulation simuliert werden. Wiederum wurden dem Plasma zu festgelegten Zeiten Proben entnommen und das entsprechende Volumen durch frisches Plasma ergänzt.

Im Falle des Prodrugs Ciclesonid (*Ciclesonide parent compound*, Cicle PC) wurden sowohl der verwendete Puffer als auch das Plasma mit Dichlorvos (DCV) versetzt, um eine Aktivierung der Muttersubstanz durch Hydrolyse des Esters am C21-Atom durch unspezifische Esterasen während der Inkubation zu unterbinden. In Kontrollexperimenten wurde jedes untersuchte Glucocorticoid unter gleichen Bedingungen parallel in gewebefreien Puffer inkubiert, um nichtspezifische Bindungen an die verwendeten Materialien zu untersuchen. Die Puffer- und Plasmaproben wurden wie im Experimentellen Teil unter 3.3 beschrieben aufgearbeitet und analysiert.

3.2 Bindung inhalativer Glucocorticoide an humanes Lungengewebe

Die Bindung der hier untersuchten Glucocorticoide an humanes Lungengewebe erfolgte sehr rasch. Bereits nach 5 Minuten waren mehr als 60 % der eingesetzten Glucocorticoidmenge am Gewebe gebunden. Nach etwa 20-30 Minuten war das Gleichgewicht zwischen gebundenem und frei im Medium vorliegendem Glucocorticoid erreicht und die gemessenen Glucocorticoidkonzentrationen blieben bis zur Probenentnahme nach 60 min weitgehend stabil.

Das Bindungsverhalten des Mometasonfuroats (MF) zum humanen Lungengewebe *in vitro* war mit dem des Fluticasonpropionats (FP) unter den hier gewählten Bedingungen vergleichbar (Abb. 20).

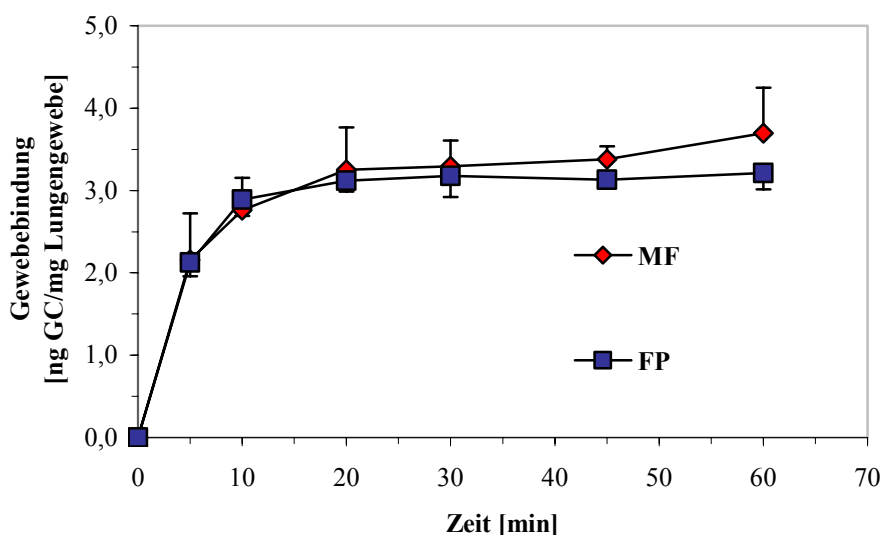


Abb. 20: Verlauf der *In-vitro*-Bindung von Mometasonfuroat (MF) an peripheres humanes Lungengewebe bei 37 °C im Vergleich zu Fluticasonpropionat (FP). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und mittlere Abweichungen vom Mittelwert aus vier Versuchen.

Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da beide Glucocorticoide eine vergleichbar hohe Lipophilie aufweisen (siehe 1.2.7). Diese physikochemische Eigenschaft ist ein bestimmender Faktor für die unspezifische Bindung eines inhalativen Glucocorticoids an das Lungengewebe [156, 162].

Bei der Bestimmung der nichtspezifischen Bindung der untersuchten Glucocorticoide fiel auf, dass obwohl Glasmaterialien verwendet wurden, beim Prodrug Ciclesonid sehr hohe Adsorptionseffekte auftraten, die zuvor in diesem Ausmaß bei anderen Glucocorticoiden noch nicht beobachtet worden waren.

Die nichtspezifische Bindung für Fluticasonpropionat (FP), Mometasonfuroat (MF) und des aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP) während der einstündigen Inkubation bei 37 °C lag im Bereich von 2 bis 4 %. Dieser liegt innerhalb der Fehlergrenzen der verwendeten Methode (siehe Experimenteller Teil unter 5.3). Ciclesonid dagegen wies mit etwa 35 % nichtspezifischer Bindung einen signifikant höheren Wert auf (Abb. 21). Daher wurden für die folgenden Versuche die ermittelten Daten zur Gewebefindung des Ciclesonids an das humane Lungengewebe entsprechend korrigiert.

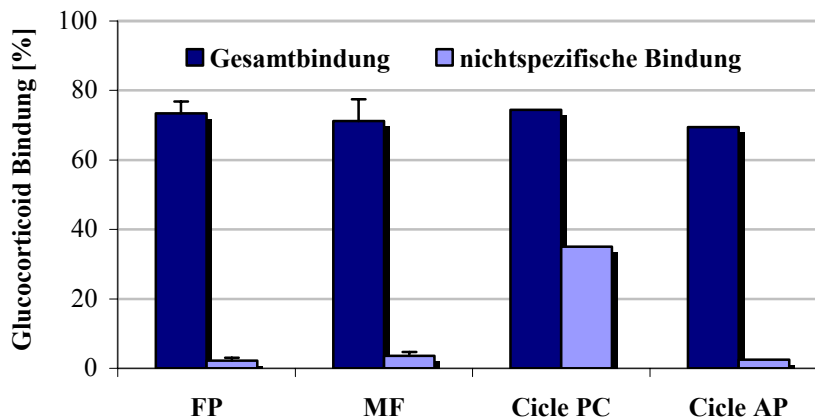


Abb. 21: Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Glucocorticoiden an die verwendeten Glasmaterialien während der einstündigen Inkubation bei 37 °C mit (Gesamtbindung) bzw. ohne (nichtspezifische Bindung) Lungengewebe am Beispiel von Fluticasonpropionat (FP), Mometasonfuroat (MF), Ciclesonid (*Ciclesonide parent compound*, Cicle PC) und dessen aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid (*Ciclesonide active principle*, Cicle AP). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für FP und MF aus vier bzw. Mittelwerte für Cicle PC und Cicle AP aus zwei Inkubationsreihen.

Zwischen dem Prodrug Ciclesonid (Cicle PC) und seinem aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP) waren nach einer Stunde Inkubation deutlich unterschiedliche Mengen an das Lungengewebe gebunden (Abb. 22).

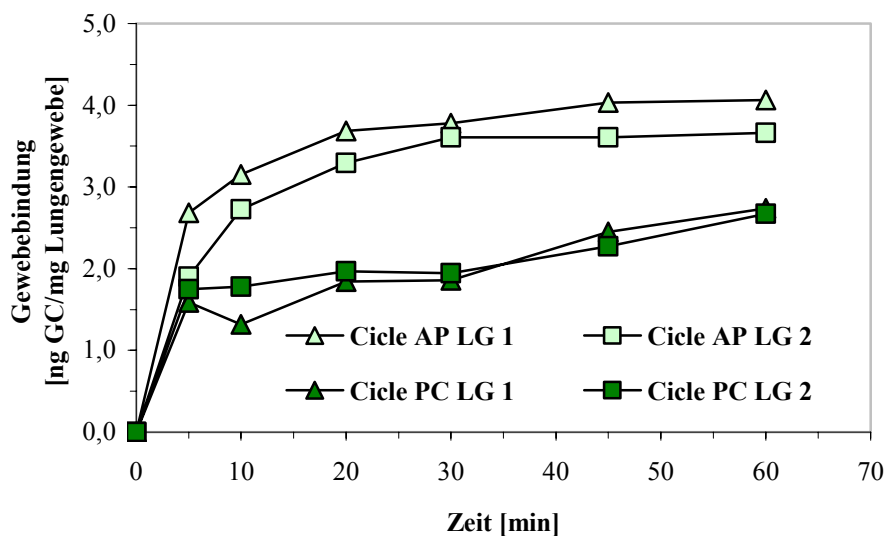


Abb. 22: Verlauf der *In-vitro*-Bindung an peripheres humanes Lungengewebe (LG) bei 37 °C dargestellt am Beispiel des Ciclesonids (Cicle PC) und dessen aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP). Die Werte für Cicle PC stellen die korrigierten Daten dar. Dargestellt sind Einzelwerte aus Inkubationsversuchen mit Lungengewebe zwei verschiedener Spender.

Die Adsorption des Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid lag mit 4,25 ng/mg Lungengewebe deutlich höher – etwa um den Faktor 1,7 – als die der Muttersubstanz Ciclesonid mit 2,57 ng/mg Gewebe.

Die eigenen Versuche bestätigen damit die früheren Beobachtungen einer schnell stattfindenden Adsorption von Glucocorticoiden an Lungengewebe [157, 163, 164]. Alle drei hier untersuchten Glucocorticoide zeigen eine vergleichbar hohe, ausgeprägte Adsorption, so wie es vom lipophilen Charakter der Substanzen zu erwarten war.

3.3 Freisetzung der Glucocorticoide in Humanplasma

Wird das glucocorticoidgesättigte Lungengewebe mit Humanplasma inkubiert, steigt die Konzentration der Substanzen im Plasma schnell an. Die höchsten Konzentrationen im Plasma wurden für das Mometasonfuroat (MF) erreicht. Im Vergleich dazu lagen die Werte des Fluticasonpropionats (FP) um ca. 50 % niedriger (Abb. 23).

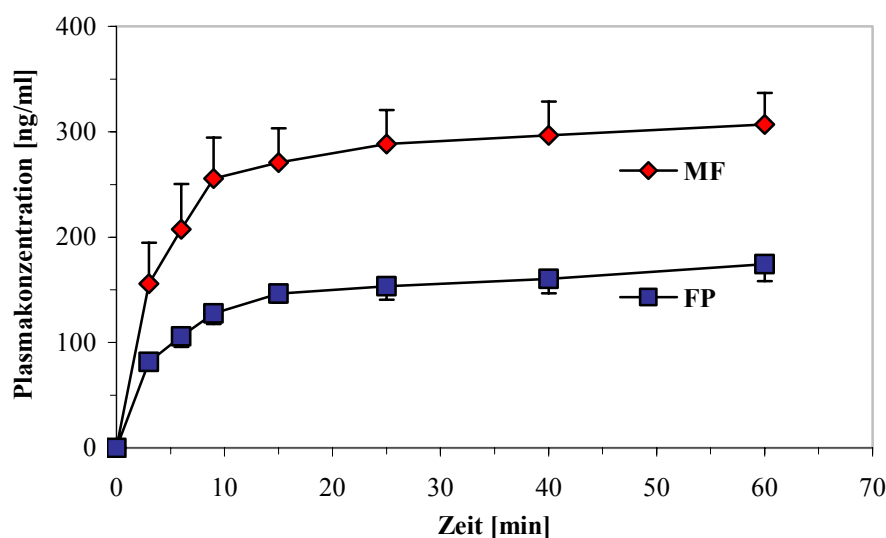


Abb. 23: Freisetzung von Glucocorticoiden aus der Gewebefindung im Kontakt mit Humanplasma bei 37 °C am Beispiel des Mometasonfuroats (MF) und Fluticasonpropionats (FP). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und mittlere Abweichungen vom Mittelwert aus vier Versuchen.

Wie bei den Bindungsversuchen an das Lungengewebe konnte auch bei der Freisetzung der Glucocorticoide aus dem Gewebe eine rasche Gleichgewichtseinstellung (15-20 Minuten) zwischen der am Gewebe gebundenen und frei im Plasma vorliegenden Konzentration beobachtet werden. Nach etwa 20 Minuten blieben die ermittelten Glucocorticoidkonzentrationen im Plasma bis zur Probenentnahme nach 60 min weitgehend stabil. Obwohl nach etwa 10 Minuten für beide Glucocorticoide im Hinblick auf die Freisetzungsgeschwindigkeit ein Plateau erreicht wurde, war das Ausmaß der Freisetzung des Mometasonfuroats aus der Gewebefindung um den Faktor 2 deutlich höher als bei Fluticasonpropionat.

Anhand der Differenz zwischen der am Gewebe gebundenen Menge an Glucocorticoid und der im Plasma ermittelten Konzentration der Substanz konnte die im Gewebe verbliebene Konzentration berechnet werden (Abb. 24).

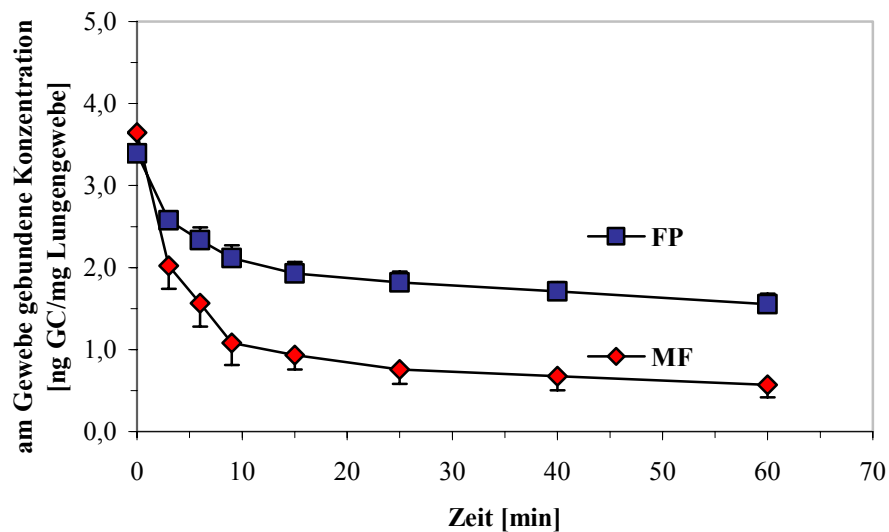


Abb. 24: Im Lungengewebe verbleibende Menge nach Inkubation mit Humanplasma bei 37 °C am Beispiel von Mometasonfuroat (MF) und Fluticasonpropionat (FP). Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte und mittlere Abweichungen vom Mittelwert aus vier Versuchen dar.

Hierbei waren Unterschiede der im Gewebe verbliebenen Glucocorticoidkonzentrationen deutlicher zu erkennen. Bereits nach 10 Minuten waren für Mometasonfuroat nur noch etwa 30 % der maximal am Gewebe gebundenen Konzentration vorhanden. Im Vergleich dazu lag der am Gewebe gebundene Fluticasonpropionatanteil mit etwa 60 % doppelt so hoch.

Die Umverteilung des aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP) vom humanen Lungengewebe in das Plasma verlief im Vergleich zur Muttersubstanz Ciclesonid (Cicle PC) in höherem Ausmaß, etwa um den Faktor 1,5, (Abb. 25). Die erreichten Plasmakonzentrationen des Desisobutyryl-Ciclesonid waren mit denen des Mometasonfuroats vergleichbar. Auch hier stellte sich das Gleichgewicht zwischen der am Gewebe gebundenen und im Plasma frei vorliegenden Glucocorticoidkonzentrationen sehr schnell, nach etwa 20 Minuten, ein.

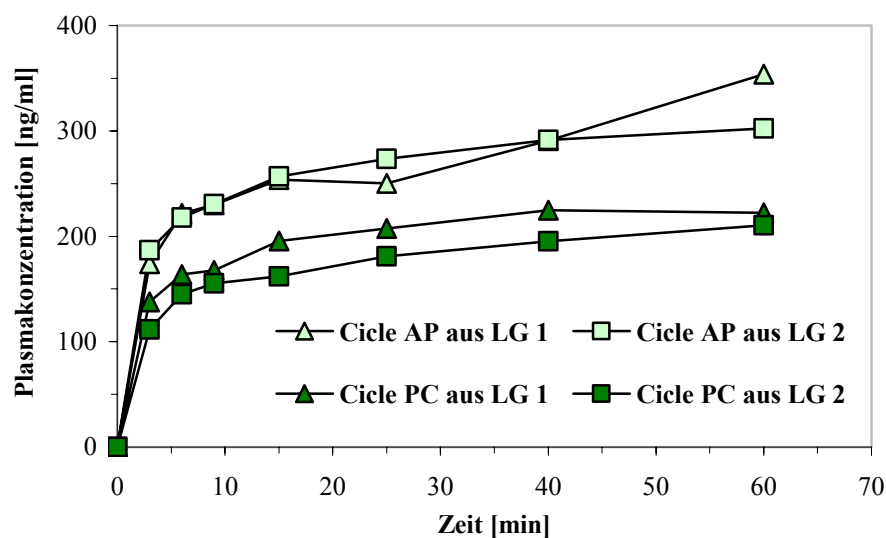


Abb. 25: Freisetzung von Glucocorticoiden aus der Gewebefindung bei Kontakt mit Humanplasma bei 37 °C am Beispiel von Ciclesonid (Cicle PC) und des aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP). Dargestellt sind Einzelwerte aus zwei repräsentativen Versuchen.

Obwohl das Ausmaß der Gewebefindung des Desisobutyryl-Ciclesonids um den Faktor 1,7 höher lag als bei Ciclesonid, waren die im Gewebe verbleibenden Mengen nach einstündiger Inkubation in Plasma vergleichbar (Abb. 26).

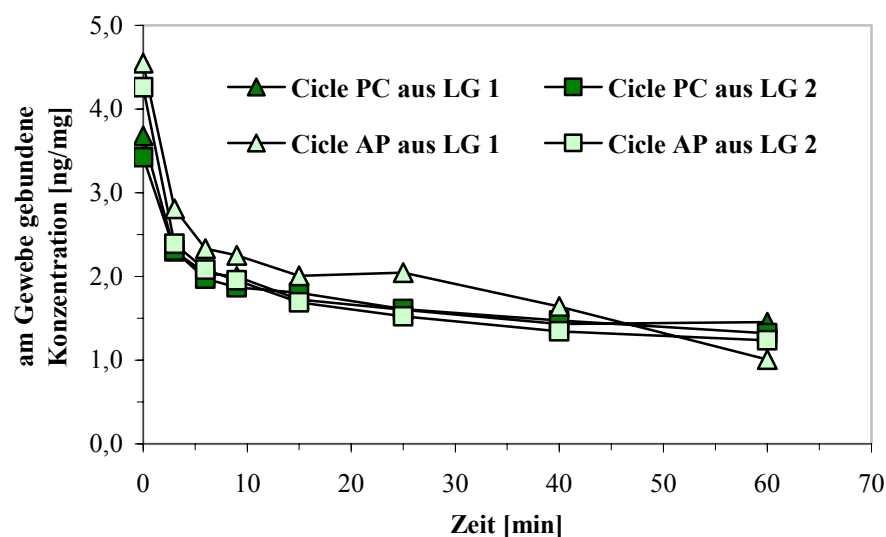


Abb. 26: Im Lungengewebe (LG) verbleibende Menge an Ciclesonid (Cicle PC) und dessen aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP) nach Inkubation mit Humanplasma bei 37 °C. Dargestellt sind Einzelwerte aus zwei repräsentativen Versuchen.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Fluticasonpropionat, Mometasonfuroat, Ciclesonid und sein aktiver Metabolit Desisobutyryl-Ciclesonid verschieden hohe Affinitäten zum humanen Lungengewebe aufweisen (Abb. 27).

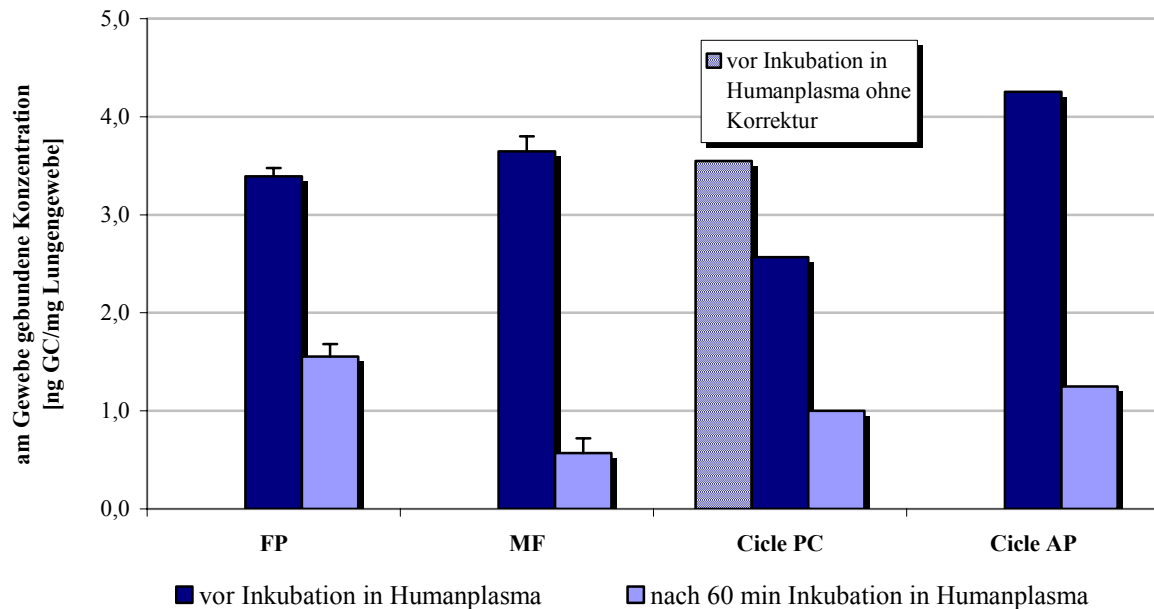


Abb. 27: An peripherem Lungengewebe gebundene Menge an Fluticasonpropionat (FP), Mometasonfuroat (MF), Ciclesonid (Cicle PC) und dessen aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP) vor und nach Inkubation mit Humanplasma bei 37 °C. Dargestellt sind Mittelwerte und mittlere Abweichungen vom Mittelwert aus vier (für FP und MF) bzw. Mittelwerte aus zwei (Cicle PC und Cicle AP) Untersuchungen.

Die Abbildung verdeutlicht, dass die wesentlichen Unterschiede zwischen den Glucocorticoiden auf den nach Equilibrierung mit Plasma im Gewebe verbleibenden Konzentrationen beruhen. Eine schnelle und ausgeprägte Adsorption an das Gewebe reicht für eine hohe Gewebeeaffinität nicht aus, wenn die Substanz auch wieder schnell aus dem Gewebe freigesetzt wird. In Gegenwart von Humanplasma stellt sich rasch ein Gleichgewicht zwischen der Gewebebindung und der Bindung an Plasmaproteine ein. Für die Wirkung am Zielorgan ist nicht die an das Plasma abgegebene Konzentration wesentlich, sondern die im Gewebe verbleibende Wirkstoffmenge. Hohe ins Plasma umverteilte Konzentrationen dagegen erhöhen das Risiko unerwünschter Wirkungen. Hier zeigen sich klare Unterschiede zwischen den untersuchten Glucocorticoiden. Die höchsten im Gewebe verbleibenden Konzentrationen wurden für Fluticasonpropionat (FP) (1,55 ng/mg), gefolgt von Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP) (1,25 ng/mg) und dem Prodrug Ciclesonid (Cicle PC) (1,01 ng/mg) bestimmt. Bei

Mometasonfuroat dagegen lag die im Lungengewebe verbliebene Konzentration (0,57 ng/mg) um den Faktor 2 bis 3 deutlich niedriger (Abb. 27).

3.4 Vergleich der Ergebnisse der Gewebefreisetzung

Das Ausmaß der Freisetzung der im Rahmen dieser *In-vitro*-Gewebefreisetzungstudien untersuchten Glucocorticoide kann aus den jeweils ermittelten Konzentrationen am Gewebe vor und nach Inkubation in Humanplasma errechnet werden (Tab. 6).

Tab. 6: Prozentualer Anteil an freigesetztem Fluticasonpropionat, Mometasonfuroat, Ciclesonid und aktivem Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid in Humanplasma nach einstündiger Inkubation mit glucocorticoidgesättigtem humanem Lungengewebe bei 37 °C.

Glucocorticoid	Freisetzung (%)
Fluticasonpropionat (FP)	53,92 ± 6,32 ^a
Mometasonfuroat (MF)	85,25 ± 8,47 ^a
Ciclesonid (Cicle PC)	58,2 – 62,3 ^b
Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP)	66,5 – 74,6 ^b

^a Mittelwerte ± mittlere Abweichungen vom Mittelwert (n = 4); ^b Bereich ermittelt aus zwei Versuchen.

Mit Ausnahme von Mometasonfuroat zeigten alle hier untersuchten Glucocorticoide innerhalb einer Stunde einen freigesetzten Anteil von etwa 50 bis 70 %. Aus früheren Untersuchungen zur Gewebefreisetzung des Fluticasonpropionats *in vitro*, die unter gleichen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden, konnten Desorptionsraten von etwa 55 % aus Lungengewebe [157] und etwa 50 % aus Nasengewebe [163] berechnet werden. Der in den eigenen Untersuchungen errechnete Wert von durchschnittlich 54 % steht somit im Einklang mit den Literaturdaten. Dies zeigt wiederum, dass die hier eingesetzte Methode reproduzierbar ist. Das in diesem Zusammenhang erstmalig untersuchte Mometasonfuroat zeigte mit durchschnittlich 85 % eine ungewöhnlich hohe Freisetzung aus humanem Lungengewebe. Dies hatte zur Folge, dass die am Gewebe verbleibende Konzentration, die für die Wirkung am Zielorgan verantwortlich ist, unter den hier ausgewählten Bedingungen im Vergleich zu Fluticasonpropionat signifikant geringer war. Andererseits war der Anteil der im Plasma vorliegenden Konzentration höher.

Wie bereits unter 1.2.6 erwähnt, wurde für Mometasonfuroat eine betont niedrige pulmonale Verfügbarkeit postuliert [85], die im Gegensatz zu einer beobachteten Suppression der Cortisol-Sekretion [94] stand. Diese Studie weist methodische und analytische Mängel auf, worauf von zahlreichen anderen Autoren hingewiesen wurde [80, 95, 96, 165]. Die im Rahmen der eigenen Untersuchungen *in vitro* beobachtete rasche Umverteilung des Mometasonfuroats in das Plasma spricht gegen eine niedrige pulmonale Bioverfügbarkeit. Dies könnte neben der bereits besprochenen Bildung aktiver Nebenprodukte (siehe unter Kapitel B 1.2.6), eine mögliche Erklärung der im Rahmen einer klinischen Studie [94] gemessenen Suppression der Cortisol-Sekretion sein.

Das Prodrug Ciclesonid wird unter physiologischen Bedingungen sehr schnell (Halbwertszeit $t_{1/2} = 0,7$ h) im Organismus zum aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid umgesetzt [166, 167]. Diese Aktivierung erfolgt durch unspezifische Gewebe-Esterasen über hydrolytische Abspaltung des Esters in C21-Position [168]. Daher wurde dem Versuchsansatz zur Gewebefindung des Ciclesonids der Esteraseinhibitor Dichlorvos (DCV) zugesetzt, um eine mögliche enzymatische Veränderung der Muttersubstanz zu unterbinden (siehe Experimenteller Teil unter 3.1.2). Auf diese Weise wurde bei den hier durchgeführten *in vitro* Versuchen ein nicht-physiologisches Verhalten des Ciclesonids simuliert. Es ist davon auszugehen, dass die Aktivierung des Ciclesonids nach Inhalation *in vivo* rasch und vollständig, ähnlich wie beim Beclomethasondipropionat [169] abläuft, so dass wahrscheinlich keine Freisetzung dieser Substanz in den systemischen Kreislauf erfolgt. Somit stellt die in Tab. 6 aufgeführte prozentuale Freisetzung einen rein fiktiven Wert dar. Die Versuche haben auch gezeigt, dass Ciclesonid ein sehr hohes nichtspezifisches Adsorptionsverhalten an nicht biologischen Materialien zeigte. Der hohe Verlust der Substanz durch eine nichtspezifische Adsorption an die verwendeten Glasmaterialien führte dazu, dass die Beurteilung dieses Glucocorticoids bezüglich der Bindung an humanes Lungengewebe korrigiert werden musste. Dies muss auch bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden.

In einer kürzlich publizierten Studie wurde die Lungenselektivität des Ciclesonids im Vergleich zu einem weiteren Prodrug, dem Rofleponidpalmitat (Abb. 28), das sich in der klinischen Prüfung befindet, untersucht [170].

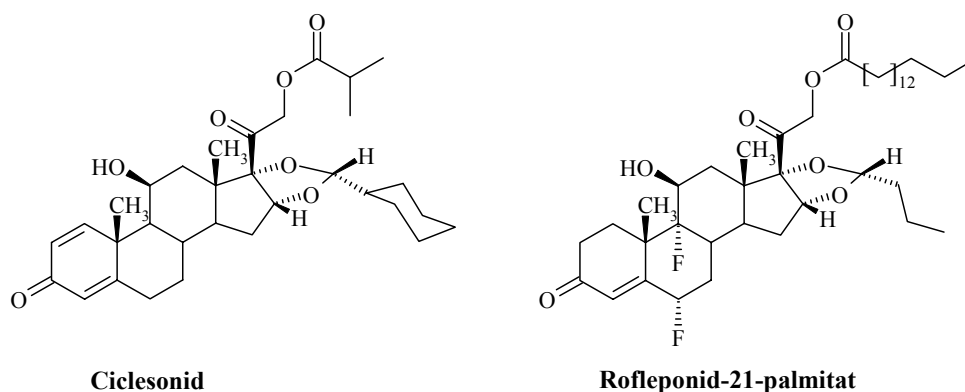


Abb. 28: Glucocorticoid-Prodrugs der neueren Generation.

Dabei wurde aus bereits vorhandenen Studiendaten durch Korrelation von intravenöser und inhalativer Gabe die Selektivität beider Glucocorticoide zum humanen Lungengewebe in einem pharmakokinetischen Fünfkompartment-Modell simuliert. Es wurde eine nahezu zweifach geringe Selektivität des Ciclesonids im Vergleich zum Rofleponidpalmitat vorhergesagt. Nach Edsbäcker et al. [170] resultierte die geringe Selektivität des Ciclesonids aus einer geringen Adsorption an die Lunge und einer gleichzeitigen raschen Hydrolyse zum aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid. Diese Annahme steht in Übereinstimmung mit der in eigenen Untersuchungen ermittelten, eher niedrigen Gewebefindung (vgl. Abb. 27).

Parallel zu den eigenen Untersuchungen wurden Versuche zur Affinität des Desisobutyryl-Ciclesonids an Trachea [171] und Lungengewebe aus der Ratte [172, 173] im Vergleich zu Fluticasonpropionat, Mometasonfuroat und Budesonid durchgeführt. Diese ergaben eine relativ hohe Affinität dieser Substanz an die untersuchten Gewebe. In Übereinstimmung der Resultate dieser Studien mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse (siehe Tab. 6) dürfte die Gewebefindung des Desisobutyryl-Ciclesonids im Bereich zwischen Budesonid [163] und Fluticasonpropionat liegen.

3.5 Korrelation der Gewebebindung mit ausgewählten pharmakokinetischen Parametern

Die Gewebeaffinität eines Arzneistoffs spielt für die Pharmakokinetik eine wichtige Rolle und spiegelt sich in verschiedenen pharmakokinetischen Parametern wider. Diese sind in Tab. 7 dargestellt und sollen im Zusammenhang mit den Ergebnissen zur Gewebebindung diskutiert werden.

Tab. 7: Vergleich der Gewebebindung von Fluticasonpropionat (FP), Mometasonfuroat (MF), Ciclesonid (Cicle PC) und des aktiven Metaboliten Desisobutyryl-Ciclesonid (Cicle AP) mit ausgewählten pharmakokinetischen Parametern.

Parameter	FP	MF	Cicle PC	Cicle AP
Gewebebindung (%) *				
Restanteil an GC nach Equilibrierung in Plasma	46	16	39	29
Proteinbindung (%)				
gebundener Anteil	90-99 [174]	98-99 [174, 175]	99 [176]	99 [176]
Verteilungsvolumen (l/kg)	4,5 ^a [34] 8,6 ^b [177]	–	–	8,3 ^b [167]
Elimination t_{1/2} (h)				
nach i.v. Applikation	7,8 [46]	4,4 [85]	0,7 [49]	3,5 [167]
nach Inhalation	12 [178]	5,8 ^c [179]	–	6,7 [42]

^a Ermittelt im steady state; ^b Ermittelt in der Eliminationsphase; Daten aus eigenen Untersuchungen sind mit (*) gekennzeichnet. ^c Ermittelt nach intranasalen Applikation.

Die Unterschiede in der Gewebebindung der hier untersuchten Glucocorticoide spiegeln sich in der Größenordnung insbesondere in ihrer Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) und in ihrem Verteilungsvolumen (V_d) wider. Die Plasmaproteinbindung ist demgegenüber bei allen vier Substanzen vergleichbar (Tab. 7).

Nach inhalativer Applikation und pulmonaler Resorption kommen Glucocorticoide in Kontakt mit Blutplasma und können dort unterschiedlich stark an verschiedene Plasmaproteine gebunden werden. Als Bindungspartner fungieren hier vor allem Serumalbumin und zu einem geringen Anteil α_1 -Glycoprotein [180]. Da nur der freie Anteil eines Corticosteroids pharmakologisch aktiv ist, stellt die Proteinbindung einen wichtigen pharmakokinetischen

Parameter dar. Die Proteinbindung aller hier untersuchten Glucocorticoide beträgt etwa 99 %. Abweichungen sind nur bei Fluticasonpropionat zu verzeichnen (90-99 %). So können unterschiedliche Werte der Proteinbindung für eine Substanz durch Verwendung von Albuminen verschiedener Herkunft (speziesspezifische Unterschiede) erhalten werden [181, 182]. Einen weiteren Einfluß auf das Bindungsverhalten kann der Zusatz von Stabilisatoren hervorrufen [183, 184]. Dies sowie die Verwendung unterschiedlicher Bestimmungsmethoden könnten eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Angaben zur Plasmaproteinbindung des Fluticasonpropionats in der Literatur sein. Die hier untersuchten Glucocorticoide weisen eine nahezu gleiche Proteinbindung auf. Dagegen zeigt ihre Bindung an Lungengewebe deutliche Unterschiede (Tab. 7). Während die Bestimmung der Plasmaproteinbindung einzig das Gleichgewicht zwischen Albumin und Puffer berücksichtigt, wurde bei den eigenen Untersuchungen zur Gewebefindung das Gleichgewicht zwischen Lungengewebe, Plasmaproteinen und dem Wasseranteil des Plasmas erfasst. Dies zeigt, dass eine Vorhersage der Gewebefindung aus der Plasmaproteinbindung eines Glucocorticoids nicht möglich ist.

Das Verteilungsvolumen (V_d) beschreibt den Quotienten zwischen der absolut verabreichten Dosis und der im Blut bestimmten Wirkstoffkonzentration. Dies kann als Hinweis für das Ausmaß der unspezifischen Gewebefindung herangezogen werden. Je größer die Tendenz eines Glucocorticoids zur Bindung an periphere Gewebestrukturen ist, desto höher ist sein V_d . So zeigen das hoch lipophile Fluticasonpropionat und der aktive Metabolit des Ciclesonids, Desisobutyryl-Ciclesonid, im Vergleich zum Budesonid ($V_d = 2,6 \text{ l/kg}$) [185] hohe Verteilungsvolumina. Für die Beurteilung des Verteilungsvolumens muss berücksichtigt werden, ob die Bestimmung im *steady state* oder in der Eliminationsphase erfolgte. Die Ermittlung des V_d einer Substanz während ihrer Elimination kann oft zu deutlich höheren Ergebnissen führen als die Bestimmung im *steady state*. Das für Desisobutyryl-Ciclesonid postulierte V_d von etwa 15 l/kg [166] wurde im Rahmen einer Studie unter der Annahme berechnet, dass 50 % pulmonal verfügbar sind. Dabei ist zu beachten, dass nach einer zehnminütigen Infusion der Muttersubstanz Ciclesonid nicht im *steady state* sondern in der Eliminationsphase gemessen wurde. Die Berechnung des V_d nach i.v. Applikation aus einer kürzlich publizierten Studie [167] ergibt jedoch einen Wert von $8,3 \text{ l/kg}$ (Tab. 7), der damit deutlich niedriger liegt und realistischer erscheint.

Die Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ einer Substanz ist eine Funktion aus systemischer *Clearance* (Cl) und dem Verteilungsvolumen (V_d). Sie ist direkt proportional zum V_d und umgekehrt proportional zur Cl . Unter der Voraussetzung, dass die Elimination nach erster

Ordnung verläuft, stellt sie eine dosisunabhängige Größe dar und kann somit als Vergleich herangezogen werden. Beim Vergleich der Halbwertszeiten inhalativer Glucocorticoide ist zwischen intravenöser und inhalativer Applikation zu unterscheiden. So zeigt Fluticasonpropionat nach i.v. Applikation eine $t_{1/2}$ von 7,5 Stunden. Im Vergleich dazu beträgt die $t_{1/2}$ des Desisobutyryl-Ciclesonids – bei gleicher Applikation – 3,5 Stunden. Somit erfolgt die Elimination etwa um den Faktor 2 schneller als bei Fluticasonpropionat (Tab. 7). Diese Verhältnisse lassen sich in der Größenordnung auch nach inhalativer Applikation wiederfinden. Nach Inhalation zeigen beide Glucocorticoide eine deutlich höhere Halbwertszeit (Tab. 7). Große Unterschiede zwischen den $t_{1/2}$ nach i.v. Applikation bzw. Inhalation zeigen, dass inhalative Glucocorticoide stärker an der Lunge adsorbieren und dadurch die Verweildauer im Zielgewebe verlängert wird. In Untersuchungen von Brindley et al. konnte gezeigt werden, dass 2 Stunden nach Applikation von Fluticasonpropionat ca. 50 % von dem in der Lunge verfügbaren Anteil noch an Gewebe gebunden war [186]. Eine verlängerte bzw. verlangsamte Abgabe von Fluticasonpropionat in den systemischen Kreislauf ist auf eine längere Verweildauer der Substanz am Lungengewebe zurückzuführen. Aus den Halbwertszeiten nach Inhalation (siehe Tab. 7) ergibt sich ein Verhältnis der Eliminationshalbwertszeit von Fluticasonpropionat zu Desisobutyryl-Ciclesonid von etwa 1,65. Dies wiederum steht in guter Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen zur Gewebefixierung dieser Glucocorticoide. Dies bedeutet, dass dieser pharmakokinetische Parameter in guter Korrelation zur Gewebefixierung steht. Dadurch können solche *in vitro* Gewebefixierungsstudien zur Vorhersage der Verweildauer eines inhalativen Glucocorticoids an Lungengewebe herangezogen werden.

Da für Mometasonfuroat keine Daten zur Eliminationshalbwertszeit nach Inhalation verfügbar sind, ist der Vergleich dieser Substanz in diesem Zusammenhang nicht möglich. Nach i.v. Applikation wird Mometasonfuroat im Vergleich zu Fluticasonpropionat deutlich schneller eliminiert ($t_{1/2} = 4,4$ Stunden). Nach intranasaler Applikation wurde eine Halbwertszeit von 5,8 Stunden ermittelt [179]. Diese liegt deutlich niedriger als bei Fluticasonpropionat (etwa 12 Stunden) und Desisobutyryl-Ciclesonid (6,7 Stunden) nach Inhalation. Anhand dieser Daten und der im Rahmen der eigenen Untersuchungen ermittelten Gewebefixierung, liegt die Vermutung nahe, dass Mometasonfuroat eine geringere pulmonale Halbwertszeit als Fluticasonpropionat und Desisobutyryl-Ciclesonid aufweist.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Gewebepbindungsdaten aus der eigenen Untersuchung erwartungsgemäß gut mit dem V_d und $t_{1/2}$ der Substanzen korrelieren. Die Plasmaproteinbindung dagegen ist nicht geeignet für die Vorhersage der Gewebeaffinität einer Substanz.

4 *In-vitro*-Untersuchungen zur Stabilität des Mometasonfuroats in humanen Spezimen

Bei topisch angewandten Glucocorticoiden ist neben einer lokal hohen Wirksamkeit eine niedrige systemische Verfügbarkeit von Vorteil. Deshalb sollten eine hohe Rezeptoraffinität und eine lange Verweildauer einer Substanz im Zielgewebe mit einer raschen und vollständigen hepatischen Metabolisierung zu inaktiven Produkten verbunden sein. Je stabiler die aktive Substanz in der Lunge ist und je langsamer sie über die Lunge in die systemische Zirkulation absorbiert wird, desto länger besteht eine lokal erwünschte Wirkung. Keines der zurzeit inhalativ angewendeten Glucocorticoide wird im Lungengewebe inaktiviert. Der durch Inhalation in die Bronchialwege deponierte Anteil wird komplett über den Kreislauf absorbiert und ist dadurch systemisch verfügbar. Deshalb kann die metabolische Stabilität eines inhalativen Glucocorticoids in der Lunge auch zu der weiteren pulmonalen Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs beitragen. Für das Auftreten unerwünschter systemischer Wirkungen ist die Geschwindigkeit und das Ausmaß der hepatischen Metabolisierung („First-Pass“) nach Absorption der aktiven Glucocorticoide in die systemische Zirkulation von großer Bedeutung. Zudem ist es entscheidend, ob die entstehenden Metabolite eine biologische Aktivität aufweisen oder inaktiv sind. Die hepatische Metabolisierung bestimmt demnach ebenso den therapeutischen Index des eingesetzten Glucocorticoids mit.

Weiterhin können inhalative Glucocorticoide eine klinisch relevante extrahepatische Metabolisierung aufweisen. Diese Reaktionen werden durch unspezifische Gewebeersterasen katalysiert und betreffen Esterbindungen in C17- und C21-Position. Bei einigen inhalativ angewendeten Corticosteroiden findet im therapeutischen Zielgewebe, der Lunge, durch hydrolytische Spaltung des C21-Esters eine Aktivierung des applizierten Wirkstoffmoleküls statt (Prodrug-Prinzip). Beispiele für solche Glucocorticoid-Prodrugs sind Beclomethasondipropionat [187] und Ciclesonid [167], die jeweils durch unspezifische Esterasen zum aktiven C21-Alkohol hydrolysiert werden. Aus einer früheren Untersuchung ist bekannt, dass Mometasonfuroat eine Vielzahl von Metaboliten bilden kann [79]. Es war jedoch nicht klar, ob und gegebenenfalls welche dieser Mometasonfuroatanaloga lokal in humanem Lungengewebe sowie im Plasma entstehen können und in welchem Ausmaß dies geschieht. So wäre theoretisch auch die Hydrolyse des Furoatesters in C17-Position zum Alkohol denkbar.

Ziel der vorliegenden Versuche war daher die Stabilität des Mometasonfuroats in humanem Lungengewebe und Plasma *in vitro* erstmalig zu untersuchen.

4.1 Prinzip der Bestimmung

Die Stabilität des Mometasonfuroats wurde in frischem humanen Lungengewebe und Plasma *in vitro* über 24 Stunden verfolgt. Zur Untersuchung wurde peripheres Lungengewebe unmittelbar nach Resektion fein geschnitten, homogenisiert und mit glucocorticoidhaltigem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer bei 37 °C inkubiert. Zu festgelegten Zeiten wurden dem Puffer gewebefreie Proben entnommen und das entsprechende Volumen durch frischen Puffer ergänzt. Des Weiteren wurde Mometasonfuroat in gepooltem Plasma unter gleichen Bedingungen inkubiert. Es wurden dem Plasma wiederum zu bestimmten Zeiten Proben entnommen und das entsprechende Volumen durch frisches Plasma ergänzt. Um eine Metabolisierung durch unspezifische Esterasen verifizieren zu können, wurden die Stabilitätsuntersuchungen für beide Medien sowohl in An- als auch Abwesenheit eines Esteraseinhibitors (Dichlorvos, DCV) durchgeführt. Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität und Integrität des eingesetzten Gewebes bzw. Plasmas wurde parallel die Hydrolyse des Beclomethasondipropionats (BDP) (Positivkontrolle) verfolgt. Voraussetzung für die schnelle Umwandlung des Beclomethasondipropionats in das Beclomethason-17-monopropionat ist eine ausreichende Aktivität von Esterasen in der Lunge.

Über die relativ lange Inkubationsdauer von 24 Stunden könnte ein mögliches Bakterienwachstum einerseits zur Inaktivierung unspezifischer Esterasen der Lunge führen, andererseits wäre eine Biotransformation des untersuchten Glucocorticoids durch mikrobielle Enzyme denkbar. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde daher zur Hemmung des Keimwachstums sowohl dem verwendeten Puffer als auch Plasma eine Mischung aus Penicillin K und Streptomycin zugesetzt (siehe Experimenteller Teil unter 4.1). Zur Unterscheidung einer enzymatischen Biotransformation von einer nicht enzymatischen Zersetzung wurden parallel Kontroll-Inkubationen in reinem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (pH 7,4) bei 37 °C durchgeführt. Die Puffer- und Plasmaproben wurden wie im Experimentellen Teil unter 3.3 beschrieben aufgearbeitet und analysiert.

4.2 Stabilität des Mometasonfuroats in humanem Lungenhomogenat und Plasma *in vitro*

Der Konzentrationsverlauf des Mometasonfuroats während der 24-stündigen Inkubationsdauer mit humanem Lungengewebe bei 37 °C ist exemplarisch in Abb. 29 wiedergegeben. Neben der Bestimmung der Mometasonfuroatkonzentration wurden die Proben auf mögliche Degradationsprodukte hin untersucht.

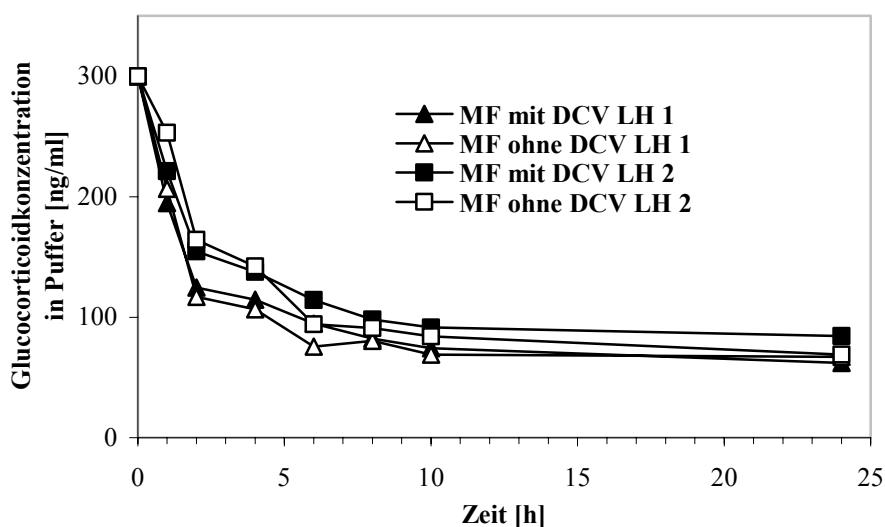


Abb. 29: *In-vitro*-Stabilität des Mometasonfuroats (MF) in frischem humanem Lungenhomogenat (LH) bei 37 °C über 24 h mit (■▲) bzw. ohne (□△) Esteraseinhibitor (Dichlorvos; DCV). Dargestellt sind die Einzelergebnisse aus zwei repräsentativen Inkubationsversuchen.

Der anfangs beobachtete rasche Abfall der Mometasonfuroatkonzentration dürfte auf die unspezifische Bindung des Glucocorticoids an das Lungengewebe zurückzuführen sein. Wie bereits gezeigt wurde (siehe unter 3.2) müsste die Bindung des Mometasonfuroats an Gewebestrukturen nach etwa ein bis zwei Stunden vollständig abgeschlossen sein. Dennoch wurde weiterhin eine ständige Abnahme der Mometasonfuroatkonzentration im Überstand verzeichnet, die etwa noch 8 bis 10 Stunden andauerte. Während dieser Inkubationsdauer wurden in den aufgenommenen Chromatogrammen neben dem Hauptpeak des Mometasonfuroats nur wenige neue Peaks, die wahrscheinlich auf einen Metaboliten oder ein Zersetzungsprodukt hindeuten könnten, beobachtet. Keiner dieser aufgezeichneten Peaks lag jedoch oberhalb der Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenzen. Somit war eine eindeutige Zuordnung der Peaks nicht möglich. Der Zusatz des Esteraseninhibitors Dichlorvos hatte dabei

keinen Einfluß auf die ermittelten Konzentrationen (Abb. 29). Dies deutet darauf hin, dass ein möglicher Abbau des Mometasonfuroats in Anwesenheit des humanen Lungengewebes auf einer nicht durch unspezifische Esterasen induzierten Zersetzung beruht. Tatsächlich konnten nach Abschluss der Inkubationsdauer von 24 Stunden mittels Extraktion der verwendeten Gewebe durchschnittlich 2,5 µg Mometasonfuroat pro Gramm Lungengewebe und etwa 0,5 µg/g einer zusätzlichen, noch unbekanntes Substanz nachgewiesen werden (Abb. 30). Diese konnte im Anschluss (siehe 4.3.1) eindeutig als 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat identifiziert werden.

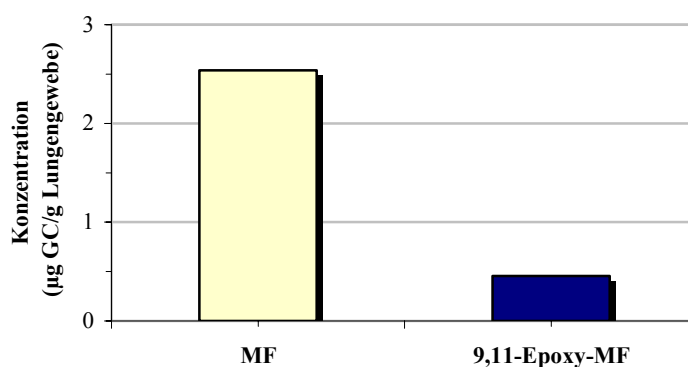


Abb. 30: Gesamter extrahierbarer Anteil an Mometasonfuroat (MF) und 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat aus den verwendeten Lungengeweben nach Beendigung der Inkubationsdauer von 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei repräsentativen Versuchen.

Die enzymatische Integrität der verwendeten humanen Lungengewebe wurde in parallel verlaufenden Kontrollexperimenten mit Beclomethasondipropionat (BDP) (Positivkontrolle) gezeigt. Dabei wurde der hydrolytische Abbau des Beclomethasondipropionats durch unspezifische Gewebeesterasen mit und ohne Zusatz des Esteraseninhibitors Dichlorvos (DCV) zum hochaktiven Beclomethason-17-monopropionat (17-BMP) bei 37 °C über 24 Stunden verfolgt. Die Konzentrationsabnahme des Beclomethasondipropionats im Puffer nach Inkubation mit Lungengewebe in Gegenwart des Esteraseninhibitors in den ersten ein bis zwei Stunden ist das Ergebnis der Bindung des Glucocorticoids an das Lungengewebe. Dichlorvos inhibiert einen großen Teil der im Lungengewebe vorhandenen Esterasen und verzögert somit die Bildung des Beclomethason-17-monopropionats (17-BMP) um etwa 8 Stunden (Abb. 31).

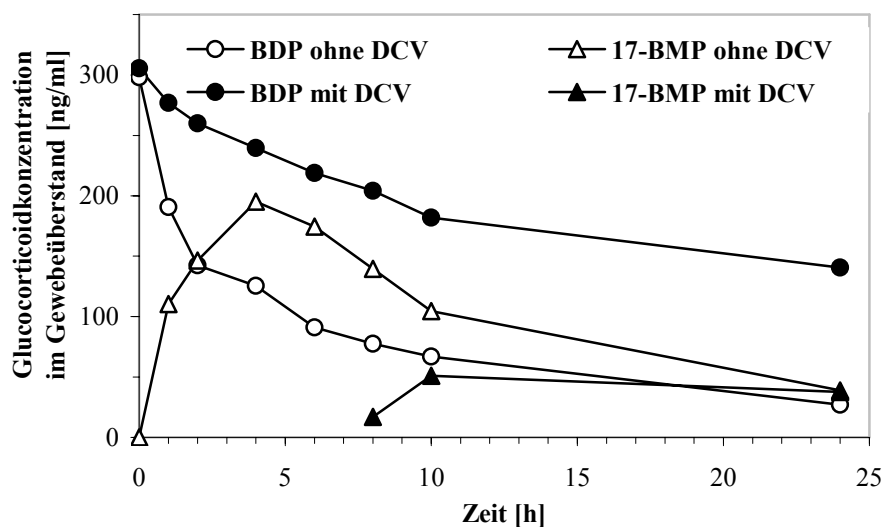


Abb. 31: *In-vitro*-Stabilität des Beclomethasondipropionats (BDP) in frischem humanem Lungengewebe bei 37 °C über 24 h mit (●) und ohne (○) Esteraseinhibitor (Dichlorvos; DCV) sowie die gleichzeitig gemessenen Beclomethason-17-monopropionat (17-BMP) Konzentrationen in An- (▲) bzw. Abwesenheit (△) des Inhibitors. Hier sind exemplarisch die Mittelwerte aus zwei Versuchen dargestellt.

Betrachtet man den gleichen Versuch ohne Esteraseinhibitor, so ist eine deutlich schnellere Abnahme der Beclomethasondipropionatkonzentration im Gewebeüberstand zu verzeichnen. Diese erfolgt sehr rasch und beruht auf der bereits angesprochenen hydrolytischen Aktivierung des Glucocorticoids zum Beclometason-17-monopropionat durch unspezifische Gewebeesterasen. Bereits nach zwei Stunden wurden äquivalente Konzentrationen beider Substanzen im Puffer bestimmt und erreichten für Beclomethason-17-monopropionat nach etwa vier Stunden ein Maximum. Mittels dieser Kontrollversuche wurde bestätigt, dass die Gewebeesterasen über den Versuchszeitraum aktiv blieben.

Analog zu den Inkubationsversuchen im Lungenhomogenat wurde die Stabilität des Mometasonfuroats in frischem humanem Plasma untersucht. Die dabei verzeichnete Konzentrationsabnahme des Mometasonfuroats in diesem Medium verlief im Vergleich zu den Inkubationsversuchen im Lungenhomogenat deutlich langsamer und in kleinerem Ausmaß. Nach einer zweistündigen Inkubationsdauer wurde neben dem Mometasonfuroat ein weiteres Degradationsprodukt detektiert (Abb. 32). Dies erwies sich in späteren Untersuchungen (siehe 4.3.1) und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Stabilitätsversuche im Lungengewebe als 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat.

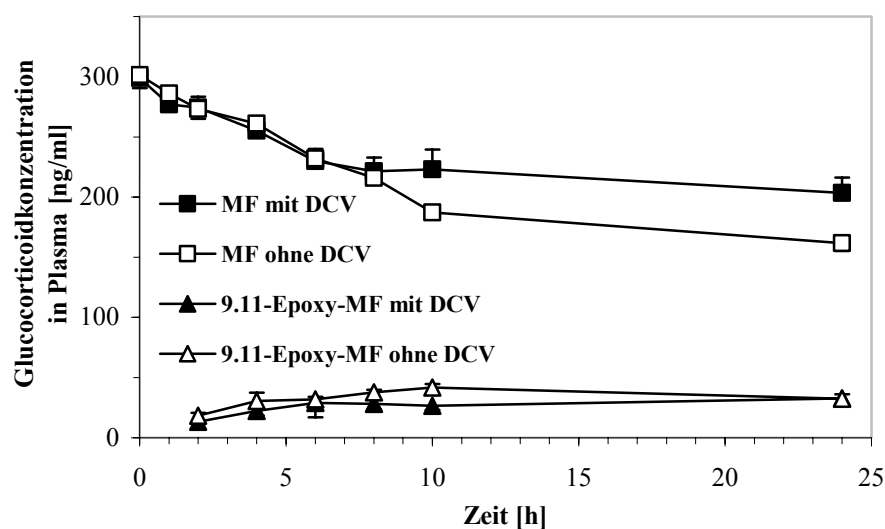


Abb. 32: *In-vitro*-Stabilität des Mometasonfuroats (MF) in frischem humanem Plasma bei 37 °C über 24 h mit (■) bzw. ohne (□) Esteraseinhibitor (Dichlorvos; DCV), sowie die gleichzeitig gemessenen Konzentrationen des Epoxids des Mometasonfuroats (9,11-Epoxy-MF) (▲) (△). Dargestellt sind die Mittelwerte und mittlere Abweichungen vom Mittelwert aus drei repräsentativen Versuchen.

Da sich die ermittelten Konzentrationen sowohl in An- als auch Abwesenheit des Esteraseinhibitors kaum voneinander unterscheiden, liegt nahe, dass die Bildung dieser Substanz auf einem nichtenzymatischen Weg beruht. Im Vergleich zu den Untersuchungen mit Lungenhomogenat zeigten die Inkubationen mit Plasma eine mögliche esteraseabhängige Degradation nach etwa neun Stunden. Bei der hier eingesetzten HPLC-Methode konnten dennoch keine weiteren neuen Peaks detektiert werden. Die enzymatische Integrität des verwendeten Plasmas wurde analog den Stabilitätsuntersuchungen im Lungenhomogenat in parallel verlaufenden Kontrollversuchen mit Beclomethasondipropionat bestätigt. Ohne den Zusatz des Esteraseninhibitors wurde eine rasche Degradation des Beclomethasondipropionats in Plasma aufgezeichnet, die vergleichbar mit der im Lungenhomogenat war (Vgl. Abb. 31).

4.3 Charakterisierung der unbekannt Substanz mittels HPLC-MS/MS, ¹³C- und ¹H-NMR

Die Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS) hat sich innerhalb der letzten Jahre zu einer wertvollen analytischen Einheit für den Nachweis schwer flüchtiger oder thermisch labiler Verbindungen entwickelt. Aufgrund ihrer Selektivität und Sensitivität erreicht diese Technik niedrige Nachweisgrenzen und erlaubt darüber hinaus die strukturelle Charakterisierung der Analyten anhand ihrer

massenspektrometrischen Daten. Entscheidend für den routinemäßigen Einsatz der HPLC-MS-Kopplung war die Entwicklung von Interfacetechniken bei Atmosphärendruck wie der Elektrosprayionisierung (ESI) oder der chemischen Ionisierung (*Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionisation*, APCI) [188]. Bei der APCI handelt es sich um eine aktive Ionisierung. Das Eluat wird nach der Verdampfung über eine nadelförmige Elektrode mit einer Spannung von wenigen Kilovolt, über der eine Coronarentladung aufrechterhalten wird, geleitet. Dadurch kommt es überwiegend zur Ionisation von Eluentmolekülen (z.B. H_3O^+), die die Analyten chemisch ionisieren. Daher ist mit dem APCI-Interface auch eine Bestimmung relativ unpolarer, nicht ionischer niedermolekularer Analyten möglich [189]. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der ESI um eine passive Ionisierung, wobei die Probe durch elektrostatische Zerstäubung in ein Aerosol überführt wird. Mit dieser Methode können Substanzen nachgewiesen werden, die im Eluenten bereits als Ionen vorliegen. Die Kombination von Elektrospray-Ionisierung und Massenspektrometrie wurde Anfang der achtziger Jahre von Fenn und Mitarbeiter zur Charakterisierung von Proteinen zum ersten Mal eingesetzt [190]. Hierfür und für die weitere Entwicklung der ESI-MS wurde John Fenn 2002 mit dem Nobelpreis der Chemie geehrt [191].

Bei der durchgeführten Untersuchung wurde die Elektrosprayionisierung im positiven Modus in Kombination mit einem Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (siehe Experimenteller Teil unter 4.5.1) eingesetzt. Die Trennung und Charakterisierung der gebildeten Ionen hinsichtlich ihrer Molekulargewichte erfolgte bei diesem Spektrometertyp mit Hilfe von drei linear angeordneten Quadrupolen (Massenanalysatoren). Im ersten und dritten Quadrupol wird in Abhängigkeit von Wechsel- und Gleichspannung ein Potential erzeugt, das nur Ionen mit einem definierten Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) auf einer stabilen Flugbahn hält, und deren Detektion ein Sekundärelektronenvervielfacher ermöglicht. Der zweite Quadrupol hingegen wird als stark fokussierende Stoßkammer eingesetzt [192]. Zunächst erfolgte eine Trennung der in der untersuchten Probe enthaltenen Substanzen mit Hilfe der HPLC. Als Detektor wurde bei dieser Methode zusätzlich zum UV-Detektor ein Massenspektrometer verwendet. Genaue Bedingungen sind im Experimentellen Teil unter 4.5.1 beschrieben.

4.3.1 Identifizierung und Strukturaufklärung der unbekannten Substanz

Durch eine vierstündige Inkubation des Mometasonfuroats in Plasma bei 37°C wurde ein noch unbekannter Nebenpeak erzeugt ($t_{RU} = 20,15$ min, unmittelbar nach dem Mometasonfuroatpeak mit $t_{RMF} = 19,68$ min). Untersuchungen mit der HPLC/MS-Kopplung erzeugten bei schonender Ionisation Molpeaks ($[M+H^+]$ -Peaks) bei 521 für Mometasonfuroat und 485 für die unbekannte Verbindung (Abb. 33).

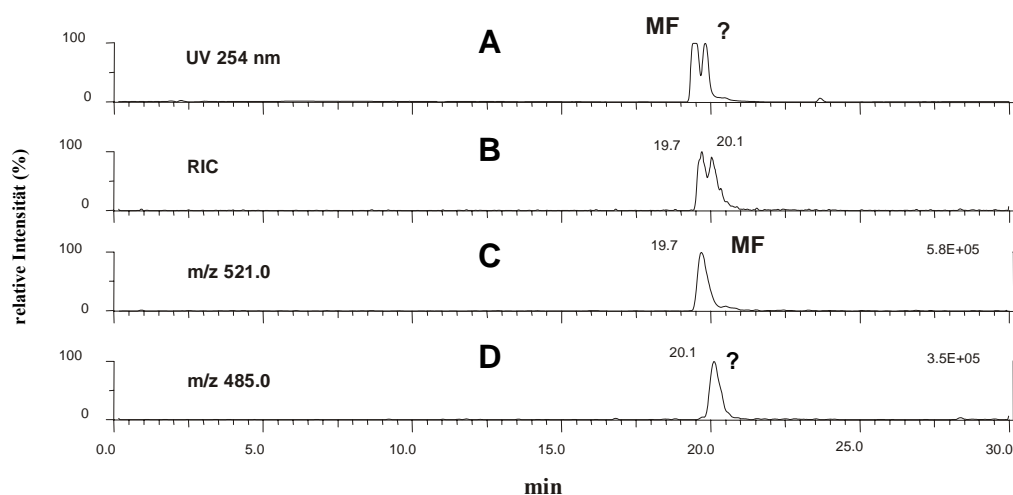


Abb. 33: HPLC-UV-MS-Chromatogramme der durch Inkubation des Mometasonfuroats (MF) in Plasma (37 °C, 4 h) entstandenen Reaktionsmischung (A, B) sowie die Massenspuren m/z 521 des Mometasonfuroats (C) und 485 der unbekannten Substanz (D); (RIC: *reconstructed ion chromatogramm*).

Die Fragmentierungsmuster des Mometasonfuroats und der unbekannten Substanz nach Stoßaktivierung sind in Abb. 34 wiedergegeben.

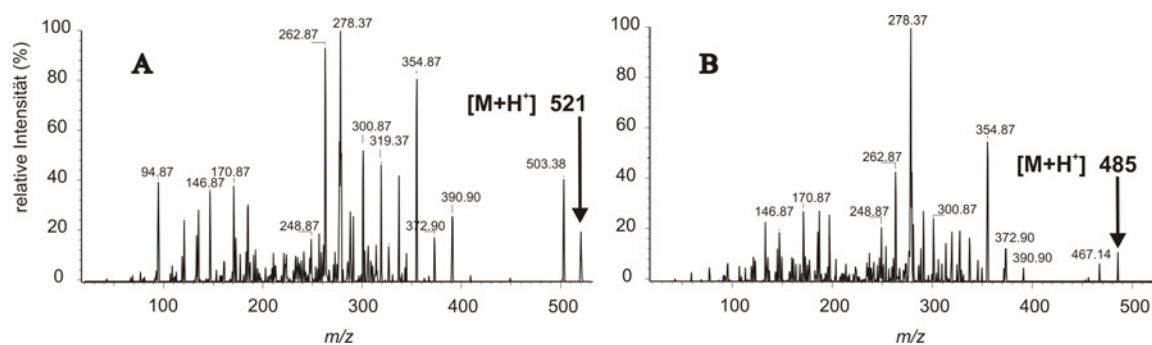


Abb. 34: Produktionenspektren des Mometasonfuroats (A) und der unbekannten Verbindung (B) mit m/z 485 nach Stoßaktivierung des protonierten Molekülions $[M+H^+]$ mit Argon im positiven Modus.

Vergleicht man die relative Molmasse des Mometasonfuroats mit der des unbekanntes Degradationsproduktes, so ergibt sich eine Differenz ΔMr von 36. Die unbekannte Verbindung war also um 36 Masseneinheiten leichter. Dies könnte der bei einer möglichen Epoxidierung in Position 9 und 11 erfolgenden Abgabe von einem Chlor- und einem Wasserstoffatom entsprechen. Anhand des Fragmentierungsmusters konnte vermutet werden, dass es sich um das (21-Chloro-17 α -hydroxy-9 β ,11 β -oxido-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion-17-(2-furoat)) 9,11-Epoxid des Mometasonfuroats handelt. Zum Vergleich wurde eine Lösung der Reinsubstanzen in Methanol hergestellt und analog untersucht. Sowohl die Retentionszeiten, als auch die einzelnen Fragmente des Mometasonfuroats und des bei der Inkubation entstandenen Degradationproduktes stimmten mit denen der Reinsubstanzen überein.

Zur eindeutigen Aufklärung der Annahme, dass es sich bei der unbekanntes Verbindung um das 9,11-Epoxid des Mometasonfuroats handelte, wurde das entstandene Degradationsprodukt zunächst mittels HPLC vom Mometasonfuroat getrennt und in ausreichenden Mengen isoliert. Anschließend wurde die unbekanntes Verbindung mittels ^{13}C - und 1H -NMR auf ihre Struktur hin untersucht. Genaue Angaben zur Durchführung der Untersuchungen sind im Experimentellen Teil unter 4.5.2 aufgeführt. Die erhaltenen 1H -NMR-Spektren sind in Abb. 35 dargestellt.

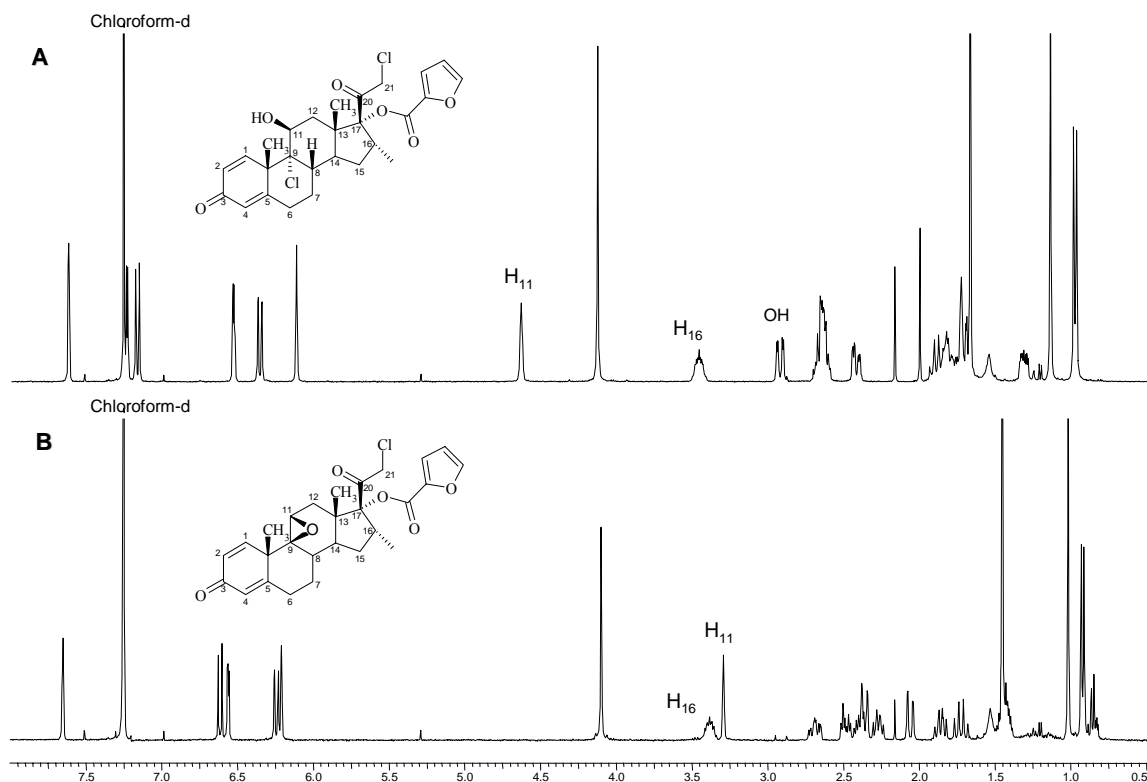


Abb. 35: 1H -NMR-Daten des Mometasonfuroats (A) und des Degradationsproduktes 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat (B) nach chromatographischer Auftrennung.

Die ermittelten NMR-Daten beider Moleküle waren mit den zum Vergleich aufgenommenen ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektren der Reinsubstanzen identisch und standen mit verfügbaren Literaturdaten im Einklang [193-195]. Bei der Synthese halogenerter Glucocorticoide wird Halogenwasserstoff erst im letzten Syntheseschritt an ein 9,11-Epoxid addiert. Diese Tatsache legt umgekehrt die Bildung eines Epoxids als mögliches Degradationsprodukt nahe. Die Zersetzung des Mometasonfuroats kann durch die benachbarte Hydroxygruppe am C-11 Atom erleichtert werden. Hinzu kommt die axiale Stellung des Chloratoms, die diesen Vorgang zusätzlich unterstützt. Das Resultat dieser Einflüsse wäre die Bildung eines Epoxids. Die Epoxidierung der Alkohol-Funktion mit der damit einhergehenden Konformationsänderung des Moleküls führt zu einer signifikanten Hochfeld-Verschiebung des Wasserstoffatoms H-11 (Abb. 35, Spektrum B). Deutlich zu erkennen ist auch der Verlust der Hydroxyl-Gruppe in Position C11. Eine mögliche räumliche Anordnung des Mometasonfuroats im Vergleich zum identifizierten 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat ist in Abb. 36 dargestellt.

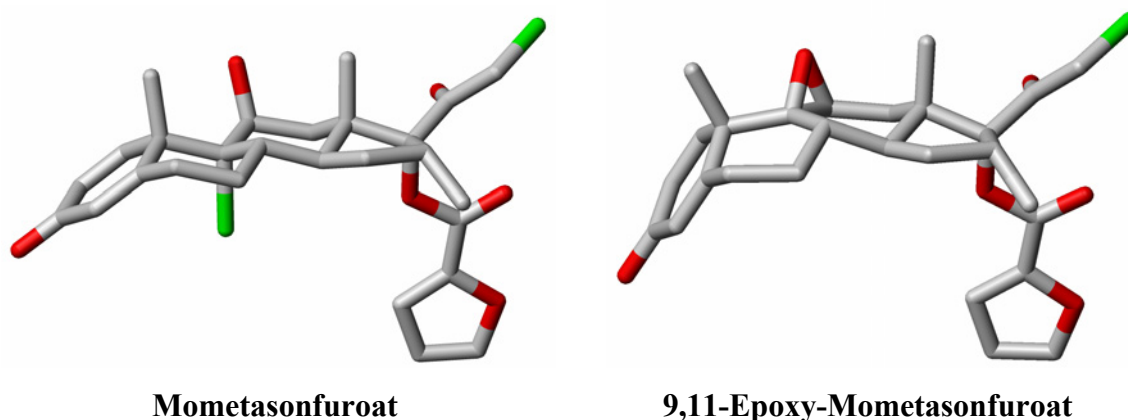


Abb. 36: 3D-Struktur des Mometasonfuroats und seines Degradationsproduktes 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat. Die Abbildungen wurden mittels der Software MolMol[®] [196] generiert; Kohlenstoff (grau); Sauerstoff (rot); Chlor (grün).

Die dargestellten Moleküle wurden mit dem Molecular Modeling Programm MOPAC/AM1 [197] berechnet und quantenmechanisch optimiert. Besonders deutlich ist die Konformationsänderung der Ringe B und C des Mometasonfuroatmoleküls nach Bildung des 9,11-Epoxids erkennbar.

4.4 Degradation des Mometasonfuroats in Puffer

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass auch Beclomethasondipropionat instabil ist. Nach langen Inkubationszeiten in Plasma und Puffer (pH 7,4) konnte eine Enthaloogenierung im Sinne einer Epoxidierung des gebildeten Beclomethasons sowie Monopropionatester der Muttersubstanz nachgewiesen werden (Abb. 37) [187, 198-200].

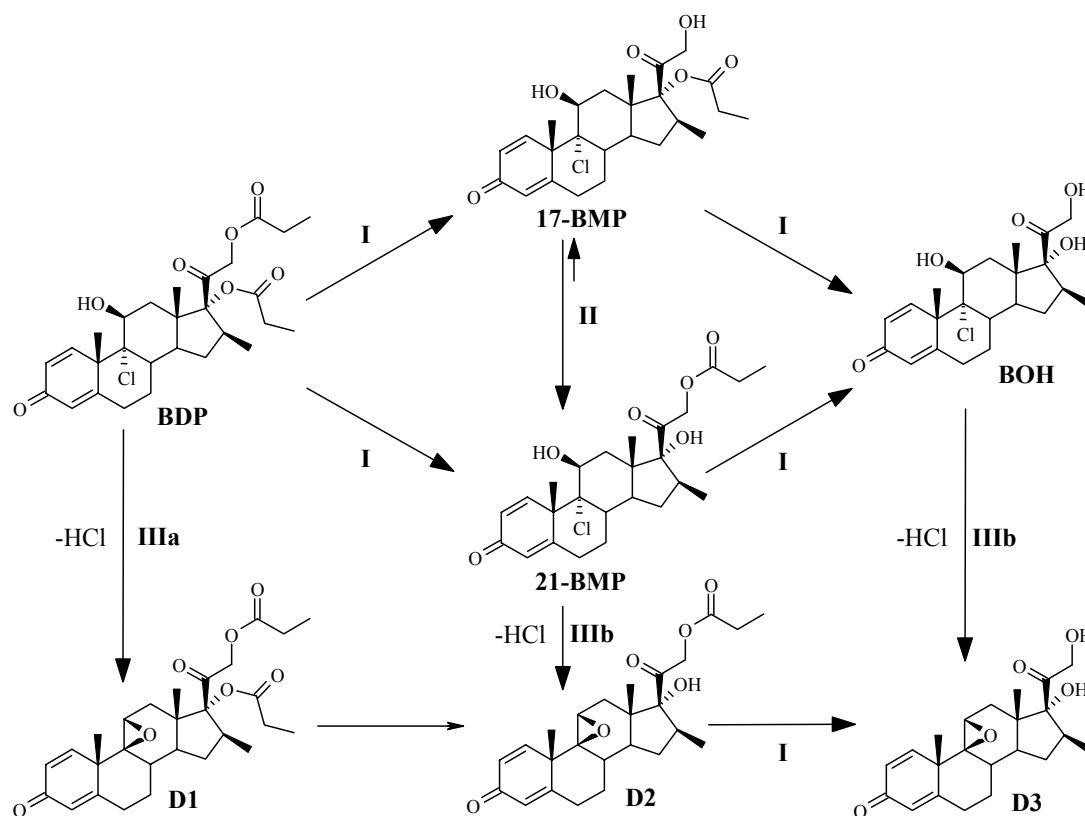


Abb. 37: *In-vitro*-Metabolisierung bzw. -Degradation des Beclomethasondipropionats in humanem Lungengewebe und Plasma bei 37 °C zum aktiven Metaboliten Beclomethason-17-monopropionat (17-BMP) sowie zu weiteren inaktiven Produkten Beclomethason-21-monopropionat (21-BMP) und Beclomethason (BOH) nach [187, 201]. D1-3 stellen die jeweiligen 9,11-Epoxide dar; I: Hydrolyse durch unspezifische Gewebeeresterasen; II: Umesterung; III: Epoxidierung bei pH 7,4 (a) Puffer, (b) Lungenhomogenat und Plasma.

Da eine Epoxidierung pH-abhängig ablaufen sollte, wurde dies in eigenen Versuchen systematisch verfolgt. Deshalb wurden zur weiteren Charakterisierung der Bildung des Degradationsproduktes 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat Inkubationen des Mometasonfuroats in Puffer bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Beclomethasondipropionat weist vor allem durch seine 9 α - 11 β -Substitution strukturelle Ähnlichkeit mit dem untersuchten Mometason-

furoat auf. Zudem bildet Beclomethasondipropionat, ebenso wie Mometasonfuroat, 9,11-Epoxyde. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten wurde das Beclomethasondipropionat als Positivkontrolle verwendet. Die pH-abhängige Degradation des Mometasonfuroats und des analog untersuchten Beclomethasondipropionats bei 37 °C über 24 Stunden ist in Abb. 38 dargestellt.

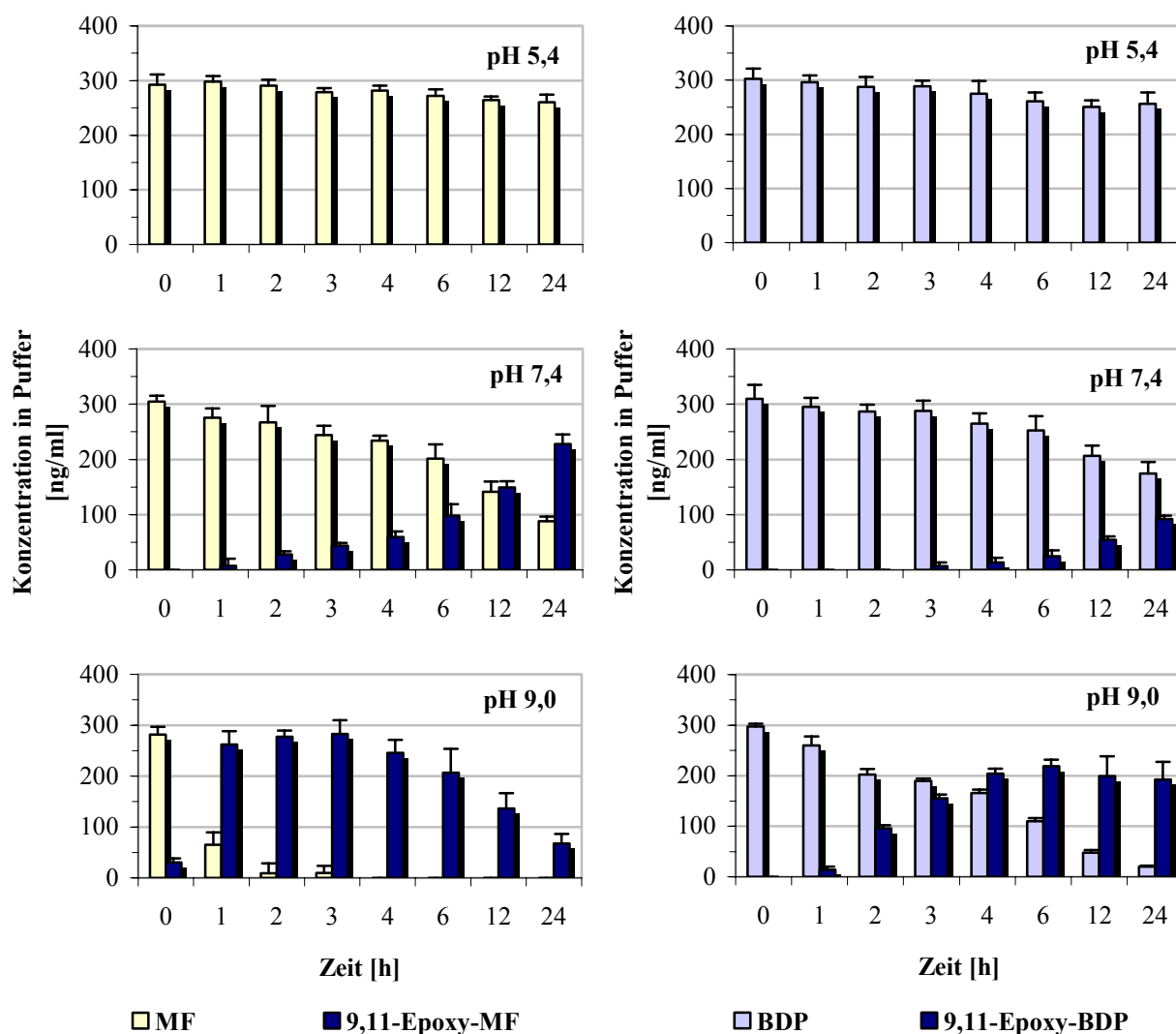


Abb. 38: pH-abhängiger Abbau des Mometasonfuroats (MF) im Vergleich zu Beclomethasondipropionat (BDP) (Positivkontrolle) in 20 mM Phosphatpuffer bei 37 °C über 24 Stunden. Beide Glucocorticoide bilden das 9,11-Epoxy-Degradationsprodukt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus sechs Inkubationsansätzen.

Im leicht sauren Bereich (pH 5,4) waren beide Glucocorticoide bei den hier gewählten Bedingungen über die Inkubationsdauer von 24 Stunden weitgehend stabil. Im Vergleich dazu wurde bei physiologischem pH-Wert von 7,4 bereits nach einstündiger Inkubation das 9,11-

Epoxy-Mometasonfuroat gebildet. Nach etwa 12 Stunden lagen Mometasonfuroat und sein Degradationsprodukt in äquivalenten Mengen vor. Die Zersetzung des Beclomethason-dipropionats dagegen verlief deutlich langsamer und in geringerem Ausmaß. Erst nach dreistündiger Inkubation wurde das 9,11-Epoxy-Beclomethasondipropionat detektiert. Die in Puffer beobachtete Degradation verlief erwartungsgemäß für beide Glucocorticoide bei höheren pH-Werten (pH 9,0) deutlich schneller. Hier konnte eine rasche Bildung des 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats bereits unmittelbar nach Einbringen der Substanz in den Puffer detektiert werden. Unter diesen Bedingungen wurde Mometasonfuroat innerhalb drei Stunden vollständig degradiert und konnte anschließend nicht mehr nachgewiesen werden. Auch bei diesem pH-Wert zeigte Beclomethasondipropionat im Vergleich zu Mometasonfuroat eine deutlich langsamere Degradation zum 9,11-Epoxy-Beclomethasonfuroat.

Offensichtlich hängt die hier aufgezeichnete Instabilität beider Moleküle stark vom Substitutionsmuster an der 9α -Position ab. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde ein weiteres Glucocorticoid, in diesem Fall Dexamethason das in dieser Position anstelle des Chlor- ein Fluoratom aufweist, unter gleichen Bedingungen untersucht (Negativkontrolle). Erwartungsgemäß blieb Dexamethason bei allen drei pH-Werten über die Inkubationsdauer von 24 Stunden weitgehend stabil (Abb. 39).

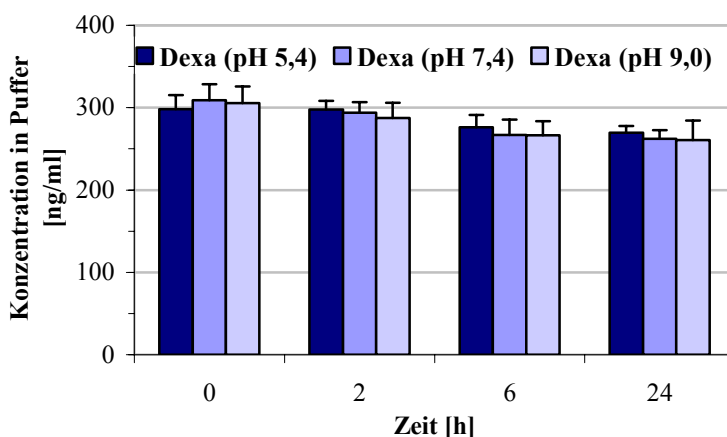


Abb. 39: pH-abhängige Stabilitätsuntersuchung des Dexamethasons (Dexa) (Negativkontrolle) in 20 mM Phosphatpuffer bei 37 °C über 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus sechs Versuchen.

Generell nimmt die Qualität der Abgangsgruppe mit zunehmender Basizität des Anions ab. Somit ist das Fluoridion des Dexamethasons durch seine höhere Basizität eine deutlich schlechtere Abgangsgruppe als Chlorid. Dies konnte auch für die hier untersuchten

Glucocorticoide bestätigt werden. Obwohl Mometasonfuroat und Beclomethasondipropionat sich im Hinblick auf das Substitutionsmuster des Pregnangrundgerüsts nicht unterscheiden, weisen sie dennoch signifikant verschiedene Epoxidierungsraten auf. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in dem unterschiedlichen Substitutionsmuster des Mometasonfuroats im Vergleich zu Beclomethasondipropionat in Position C17 zu finden sein.

4.5 Vergleich der Ergebnisse zur Stabilität

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Stabilität des Mometasonfuroats erstmalig in humanem Lungengewebe und frischem Plasma über 24 Stunden *in vitro* verfolgt. Dabei zeigte sich, dass Mometasonfuroat zu einem hohen Anteil degradiert wurde. Das gebildete Degradationsprodukt konnte nach umfangreicher Analyse eindeutig als das 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat identifiziert werden. Zudem konnte in Kontrollexperimenten gezeigt werden, dass die Bildung des 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats nicht auf enzymatischem Wege verläuft, sondern pH-abhängig ist. Ausmaß und Geschwindigkeit der Degradation des Mometasonfuroats sind signifikant höher und nicht vergleichbar mit der bereits bekannten Zersetzung anderer inhalativ angewendeter Glucocorticoide, wie Beclomethasondipropionat [198]. Triamcinolonacetonid zeigt ebenfalls eine pH-abhängige Degradation die jedoch mit der cyclischen Ketalstruktur dieses Steroids zusammenhängt [202].

Die bei den eigenen Untersuchungen verwendete analytische Methode war selektiv, sensitiv und reproduzierbar. Mit einer Bestimmungsgrenze von 10 ng/ml war die entwickelte Methode um den Faktor 15 [88] bzw. 20 [203] empfindlicher als bisher in der Literatur beschriebene Methoden. Weitere Biotransformations- oder Zersetzungsprodukte wurden nicht detektiert.

Zeitgleich stattgefundene Untersuchungen von Teng et al. haben auf eine mögliche Degradation des Mometasonfuroats in künstlicher Lungenflüssigkeit und Plasma hingewiesen [203]. Später wurde die Epoxidbildung, Hydrolyse und Esterumlagerung des Mometasonfuroats in wässrigen Pufferlösungen [204] und in subzellulären Fraktionen aus Rattengewebe [86] nachgewiesen. In diesen Studien konnte übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen die Bildung des 9,11-Epoxids als Hauptdegradationsprodukt des Mometasonfuroats festgestellt werden. Im Anschluss an die eigenen Untersuchungen wurde von Teng et al. aus *In-vitro*-Versuchen die metabolische Degradationskinetik in ausgewählten humanen Lungenfraktionen, in humanem Plasma, in Urin und in Leber- und Intestinalmicrosomen publiziert [87]. Dabei wurde gezeigt, dass 6 β -OH-Mometasonfuroat bei hepatischer oder intestinaler Biotransformation des

Mometasonfuroats als Hauptmetabolit entstehen kann. Die möglichen Metabolisierungs- und Degradationsprodukte sind in Abb. 40 schematisch dargestellt.

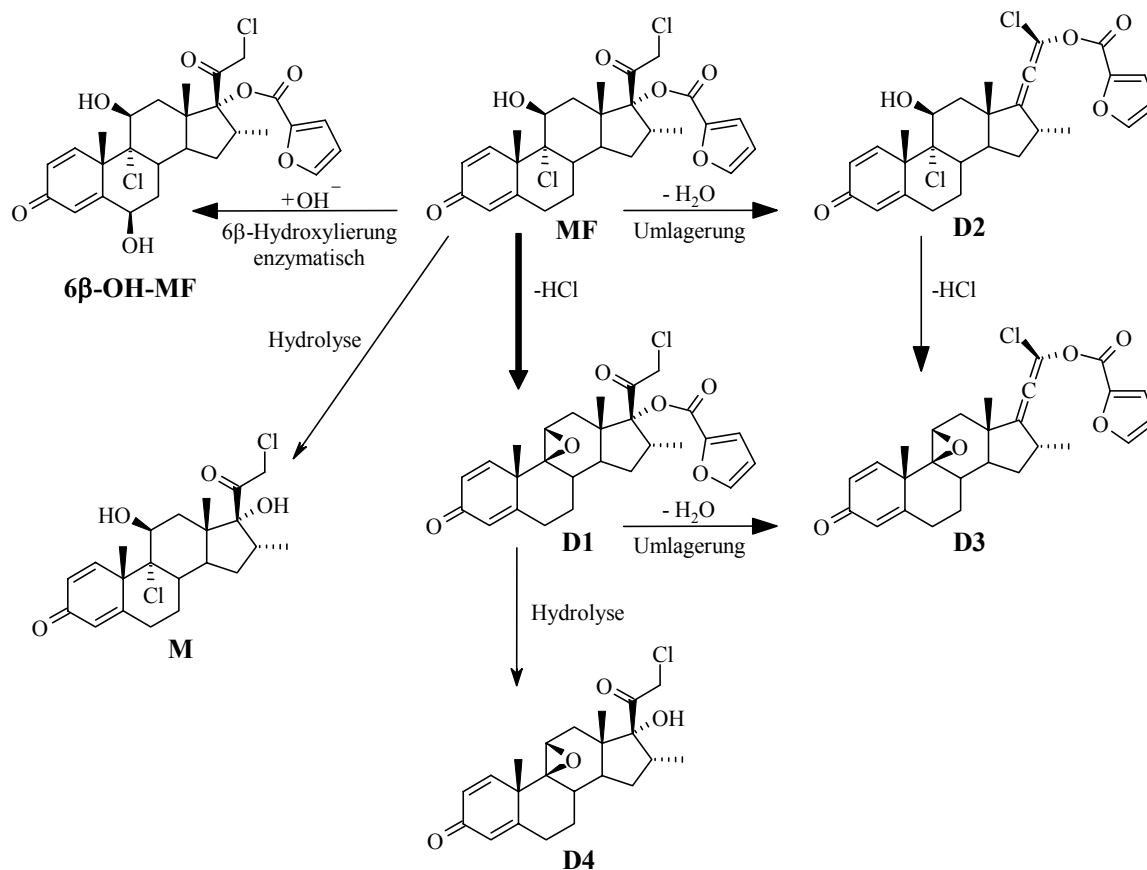


Abb. 40: Schematische Darstellung der möglichen Metabolisierungs- und Degradationswege des Mometasonfuroats (MF) zum 6 β -Hydroxy-Mometasonfuroat (6 β -OH-MF), zum Mometason (M), dem Hauptdegradationsprodukt 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat (D1) (ermittelt in den eigenen Untersuchungen) und zu weiteren Zersetzungsprodukten (D2, D3 und D4) *in vitro* (nach [86, 87, 204]).

In extrahepatischen Fraktionen aus Rattengewebe zeigte Mometasonfuroat im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen nur eine langsame Degradation zu den Produkten D1-4 (siehe Abb. 40). Bei der von Teng et al. verwendeten künstlichen Lungenflüssigkeit handelte es sich um eine Lösung mehrerer anorganischer Salze [205]. Die eigenen Versuche wurden dagegen in frischem humanem Lungenhomogenat durchgeführt, wodurch die Versuchsbedingungen den physiologischen Bedingungen angenähert wurden.

Die Ergebnisse von Teng et al. wurden nach Inkubationen des Mometasonfuroats über 72 bis 120 Stunden ermittelt. Für *in vivo* Verhältnisse ist nur die Betrachtung eines Zeitraums von 24 Stunden relevant. Weitere *in vivo* ablaufende pharmakokinetische Prozesse, beispielsweise die Elimination, werden unter den statischen Bedingungen *in vitro* nicht berücksichtigt und

limitieren damit die Aussagekraft von Ergebnissen einer längeren Inkubationsdauer. Eine mögliche Erklärung dafür, dass in den eigenen Versuchen die Produkte D2, D3 und D4 nicht nachgewiesen wurden, könnte darin begründet sein, dass ihre Bildung sehr viel längere Inkubationszeiten voraussetzt. Zudem wurden bei Teng et al. Konzentrationen von 10 µg/ml eingesetzt. In einer *In-vivo*-Studie mit tritiummarkiertem Mometasonfuroat wurden C_{\max} -Werte in Plasma von etwa 10 ng/ml nach einer einmaligen Dosis von 400 µg i.v. gemessen [85]. In den eigenen Versuchen wurde eine Ausgangskonzentration von 300 ng/ml gewählt, die etwa um den Faktor 35 niedriger war, als die von Teng et al. eingesetzte und dazu näher an den *in vivo* gemessenen Plasmakonzentrationen lag.

Erst vor kurzem wurde von einem weiteren möglichen Degradationsprodukt berichtet [88]. Auch hier wurden die Inkubationsversuche in künstlicher Lungenflüssigkeit über einen langen Zeitraum (72 Stunden) durchgeführt. Unter den hier gewählten Bedingungen war das Hauptdegradationsprodukt eine dem 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat ähnlichen Verbindung (D2) (Abb. 41).

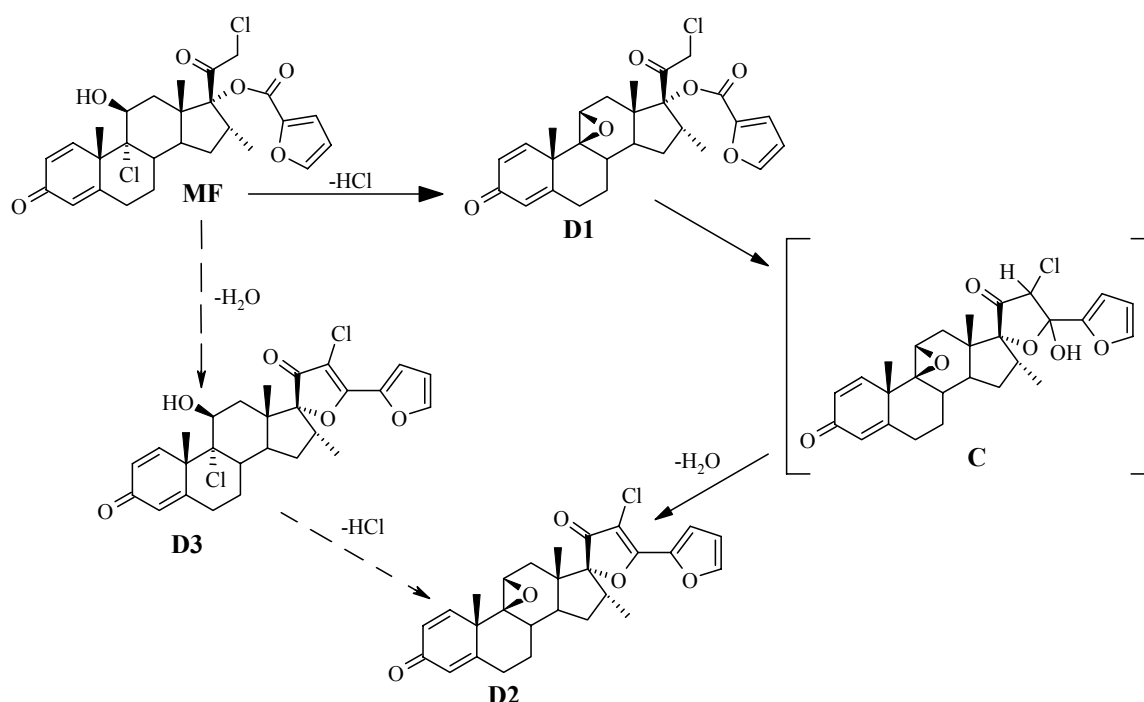


Abb. 41: Schematische Darstellung des Abbaus von Mometasonfuroat (MF) zu den Degradationsprodukten D1 und D2 nach Inkubation in künstlicher Lungenflüssigkeit bei 37 °C über 72 Stunden nach [88]. Die unterbrochenen Pfeile zeigen die mögliche Bildung eines weiteren Degradationsproduktes (D3), das weiter zu D2 abgebaut wird. Molekül C stellt ein wahrscheinliches Zwischenprodukt für die Umsetzung des D1 zu D2 dar.

Allen hier besprochenen Studien ist in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen der Nachweis einer hohen Instabilität des Mometasonfuroats *in vitro* gemein. Das Degradationsprodukt 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat, welches in humanem Lungengewebe und Plasma *in vitro* entsteht, kann als das Hauptzersetzungsprodukt angesehen werden.

Über eine umfangreiche Biotransformation des Mometasonfuroats in der Leber durch Cytochrom CYP3A4 zu polaren Verbindungen wurde wiederholt berichtet [96, 206, 207]. *In vivo* liegen dennoch bislang keine Ergebnisse vor.

4.6 Relevanz der Mometasonfuroatstabilität in biologischen Proben

Mometasonfuroat stellt ein hoch potentes topisch angewandtes Glucocorticoid der neueren Generation dar. Es ist bei der Therapie verschiedener Hauterkrankungen [208], allergischer Rhinitis [209] und Asthma bronchiale [207] etabliert. Im Rahmen einer Studie wurde für Mometasonfuroat von einer sehr geringen systemischen Bioverfügbarkeit von weniger als 1 % berichtet [85]. Die Ergebnisse dieser Studie wurden jedoch auf ihre Gültigkeit hin kritisch diskutiert [80, 95, 96].

In den eigenen Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass Mometasonfuroat in humanem Lungengewebe und frischem Plasma *in vitro* teilweise zum 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat degradiert wird. Weitere Zersetzungsprodukte wurden dabei nicht detektiert. Das Ausmaß der 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat-Bildung wies in den verwendeten Inkubationsmedien Lungengewebe, Plasma und Puffer deutliche Unterschiede auf. Inkubationen in Puffer (pH 7,4) zeigten eine signifikante Zersetzung des Mometasonfuroats zum 9,11-Epoxid, dessen Konzentration über die gesamte Inkubationsdauer konstant anstieg. Im Plasma dagegen erfolgte die Degradation um etwa eine Stunde verzögert und erreichte nach drei Stunden eine Plateauphase. Diese konstant gefundenen Konzentrationen spiegeln wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen Neubildung dieser Verbindung und ihren Folgereaktionen wider.

Während der Versuche mit Lungengewebe wurde über 24 Stunden im Überstand kein 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat detektiert, was ungewöhnlich erschien. Auch diese Tatsache könnte darauf beruhen, dass das Epoxid Nachfolgereaktionen eingegangen ist. Anscheinend lag dies daran, dass eine hohe nichtspezifische jedoch größtenteils reversible Gewebefixierung eingegangen wurde, da sowohl Mometasonfuroat als auch sein Degradationsprodukt 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat anschließend aus dem Gewebe extrahiert werden konnten. So wurde am Ende der Stabilitätsuntersuchung im Lungengewebe ein durchschnittliches

Konzentrationsverhältnis zwischen 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat und Mometasonfuroat von 1:5 gefunden (siehe Abb. 30 unter 4.2).

Es ist bekannt, dass Epoxide sehr reaktive Verbindungen sind, die zu irreversiblen Bindungen mit zellulären Makromolekülen tendieren [210, 211]. Sollte 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat kovalente Bindungen, z.B. mit Aminogruppen von Proteinen eingehen, dürfte die Substanz nicht mehr extrahierbar sein. Um das zu überprüfen wurde die Wiederfindung eines authentischen 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats in den Medien Plasma, Lungenhomogenat und reinem Puffer (pH 7,4) durch Flüssig-Flüssig-Extraktion (siehe Experimenteller Teil 3.3) bestimmt. Die Inkubationsdauer wurde auf drei Stunden limitiert, da ab dieser Zeit zusätzlich mit einer signifikanten Degradation des zum Vergleich herangezogenen Mometasonfuroats zu rechnen ist. (Abb. 42).

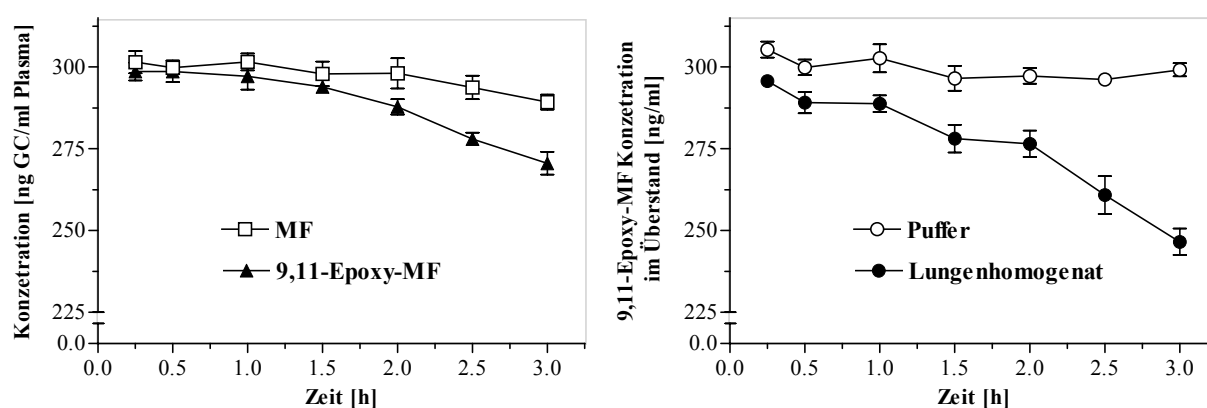


Abb. 42: Wiederfindung des Mometasonfuroats (MF) und seines Degradationsproduktes 9,11-Epoxy-MF aus humanem Plasma während einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C (links). Konzentrationsverlauf des 9,11-Epoxy-MF (rechts) im gewebefreien Überstand aus humanem Lungenhomogenat im Vergleich zu Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (pH 7,4) (Kontrollexperiment) über drei Stunden bei 37 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf (Plasma) bzw. drei (Lungenhomogenat und Puffer) Versuchen.

Das Konzentrationsniveau des Mometasonfuroats und 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats im Plasma war im Vergleich zu der jeweiligen Ausgangskonzentration während der ersten Stunde nahezu unverändert (Abb. 42, links). Im weiteren Verlauf der Inkubation wurden bezogen auf den extrahierbaren Anteil für 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat jedoch größere Konzentrationsabnahmen im Vergleich zu der Muttersubstanz verzeichnet. Diese betragen am Ende der dreistündigen Inkubation bei 37 °C etwa 10 % ($9,14 \pm 2,3$ %). Wurde an Stelle des Plasmas Lungengewebe verwendet, lag der ermittelte Anteil nicht mehr extrahierbarer Substanz

etwa um den Faktor 1,8 ($16,61 \pm 0,6$) höher. In parallel verlaufenden Kontrollversuchen mit Puffer wurde keine Abnahme der 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat-Konzentration beobachtet.

Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis dafür sein, dass 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat aufgrund seiner Reaktivität kovalente Bindungen mit verschiedenen Aminosäuren der im Plasma bzw. Gewebe vorkommenden Proteine eingeht. Dies könnte in weiteren Untersuchungen genauer analysiert werden. Eine Möglichkeit zur Charakterisierung solcher Proteinprodukte bietet die Tandem-Massenspektrometrie vor und nach enzymatischem Proteinverdau. Insbesondere die Elektrosprayionisierung mit anschließender kollisionsinduzierte Dissoziation in Kombination mit einem Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (ESI-CID-MS/MS) eignet sich zur Fragmentierung von Makromolekülen [211, 212].

Eine mögliche kovalente Bindung des Epoxids an Proteinstrukturen erhöht zugleich die Wahrscheinlichkeit, dass das dabei gebildete Produkt (Hapten) ein Allergen darstellt. So zeigten Gräfvort et al. in einer Studie mit verschiedenen Steroiden, dass deren Epoxide eine kovalente Bindung mit Hautproteinen eingehen können und dadurch Kontaktallergene darstellen [213]. Allergien gegen synthetische Glucocorticoide sind selten, wurden aber schon beschrieben [214].

In der bereits besprochenen Studie von Affrime et al. [85] wurde von einer geringen Bioverfügbarkeit des Mometasonfuroats berichtet. Dabei wurde die Konzentration des Mometasonfuroats in Serum erfasst. Das Resultat dieser Studie steht jedoch im Widerspruch zu einer wiederholt beobachteten Suppression der Cortisolsekretion [94, 165]. Eine irreversible Bildung und Bindung des 9,11-Epoxids an verschiedene Proteinstrukturen verbirgt dessen Detektion und könnte somit eine geringe pulmonale Bioverfügbarkeit des Mometasonfuroats vortäuschen. Die Tatsache, dass nach Inhalation einer einmaligen Dosis tritiummarkiertem Mometasonfuroats innerhalb einer Woche durchschnittlich nur etwa 82 % (Stuhl 74 %, Urin 8 %) der eingesetzten Gesamtradioaktivität (unter Berücksichtigung des exhalierten Anteils) wieder gefunden wurde, unterstützt diese Annahme. Bei anderen inhalativen Glucocorticoiden lag die kumulative Wiederfindung mit 92 % (Ciclesonid) [167] bzw. 94 % (Triamcinolonacetonid, Flunisolid) [215, 216] bedeutend höher.

Eine weitere Erklärung für die geringe pulmonale Bioverfügbarkeit könnte die Bildung weiterer und, wie bereits gezeigt, aktiver Metabolite 6 β -OH-Mometasonfuroat oder Mometason sein [96, 217]. Diese wurden jedoch bei den Untersuchungen von Affrime et al. [94] nicht erfasst. Somit könnten mögliche aktive Biotransformations- und Zersetzungsprodukte des Mometasonfuroats im Hinblick auf die beobachteten systemischen Effekte einen erheblichen Beitrag leisten.

Abschließend lässt sich sagen, dass Mometasonfuroat in humanem Lungengewebe und Plasma instabil ist. Die Degradation erfolgt auf einen nichtenzymatischen Weg und ist pH-abhängig. Das Zersetzungsprodukt 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat, welches eine signifikant hohe Bindungsaffinität zum Glucocorticoidrezeptor aufweist, kann als das Hauptdegradationsprodukt angesehen werden. Zudem sind die hier gezeigten Ergebnisse ein deutlicher Hinweis auf eine mögliche kovalente Bindung des 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats an Makromoleküle. Eine mögliche irreversible Bindung dieser Verbindung mit Makromolekülen sollte weiter untersucht werden. Die *In-vivo*-Bildung des 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats sowie dessen klinische Relevanz bedarf daher der weiteren Aufklärung.

5 **Auflösungsverhalten von Glucocorticoidkristallen in humanem Bronchialsekret**

Inhalativ applizierte Glucocorticoide sollen eine lokale Wirkung in ihrem therapeutischen Zielgewebe, der Lunge entfalten. Generell ist eine lange Verweildauer am Wirkort und eine langsame Umverteilung in die systemische Zirkulation erwünscht. Die Wirkstoffmenge, die den systemischen Kreislauf erreicht, kann zu unerwünschten Effekten führen [80]. Da bei jeder Inhalation ein nicht unerheblicher Dosisanteil verschluckt wird, ist für diese Glucocorticoide eine möglichst geringe orale Bioverfügbarkeit vorteilhaft. Inhalative Glucocorticoide der neuen Generation, wie Fluticasonpropionat, Mometasonfuroat und Ciclesonid, weisen eine orale Bioverfügbarkeit von weniger als 1 % auf [80, 167].

Aerosole zur inhalativen Anwendung sollten ein Teilchen- oder Tröpfchengrößenspektrum von 0,5 bis 5 μm , im Idealfall von 2 bis 3 μm , aufweisen. Kleinere Tröpfchen und Partikel werden wieder ausgeatmet, während größere nicht bis in die Alveolen der Lunge, dem Hauptwirk- bzw. Absorptionsort, gelangen können. Nach Inhalation werden die festen Partikel zunächst in der Lunge deponiert. Bevor eine Diffusion des Arzneistoffs in das Gewebe erfolgen kann, müssen die Glucocorticoidkristalle in Bronchial- bzw. Lungensekret gelöst werden. Glucocorticoide unterscheiden sich in ihrer Löslichkeit deutlich voneinander. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Wasserlöslichkeiten des Budesonids (16,5 $\mu\text{g/ml}$) und des Flunisolids (140 $\mu\text{g/ml}$) bei 37 °C um den Faktor 100 bis 1000 höher lagen als die Löslichkeiten des Beclomethasonpropionats (0,13 $\mu\text{g/ml}$) und Fluticasonpropionats (0,14 $\mu\text{g/ml}$) [218]. Weiterhin wurde in *In-vitro*-Versuchen mit dem hoch lipophilen Beclomethasonpropionat eine sehr langsame Auflösung (> 5 h) dieses Glucocorticoids in Bronchialsekret beobachtet [162, 219]. Flunisolid (< 2 min) und Budesonid (6 min) waren dagegen bereits nach wenigen Minuten vollständig aufgelöst [218]. Diese Studien beinhalteten eine lichtmikroskopische Betrachtung der untersuchten Glucocorticoidpartikel. Somit war nur eine ungefähre Aussage über deren Größe nicht jedoch Morphologie möglich.

Ziel der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen war es, eine empfindliche Methode zu entwickeln, die eine Beurteilung des Auflösungsverhaltens inhalativ angewandter Glucocorticoide in Bronchialsekret erlaubt. Dazu wurden Glucocorticoidkristalle handelsüblicher Dosieraerosole im humanen Bronchialsekret bei 37 °C inkubiert und zu festgelegten Zeiten die Kristallgröße und deren Morphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie betrachtet.

5.1 Auflösungsverhalten des Beclomethasondipropionats am Beispiel von Ventolair[®] und Sanasthmax[®]

Zur Charakterisierung des Auflösungsverhaltens inhalativ angewandter Glucocorticoide wurde Beclomethasondipropionat als Modellsubstanz herangezogen. Dieses Corticosteroid eignet sich besonders für die hier gezeigten Versuche, da es in unterschiedlichen Formulierungen kommerziell erhältlich ist. Zudem sind aus klinischen Studien viele pharmakokinetische Daten verfügbar. Diese sollten im Einklang mit den erzielten Beobachtungen stehen. Die Auflösung von Beclomethasondipropionatkristallen wurde aus den Hydrofluoralkan (HFA) - Dosieraerosolen Sanasthmax[®] (Becloforte[™]) und Ventolair[®] (Qvar[™]) in humanem Bronchialsekret untersucht.

Nach Aufsprühen des jeweiligen Dosieraerosols auf einen geeigneten Objektträger wurde zunächst die Morphologie der Kristalle, so wie sie von der Arzneiform abgegeben werden, untersucht. Die Anzahl und die Verteilung der vom Dosieraerosol abgegebenen Kristalle wurden mikroskopisch bei einer 1000fachen Vergrößerung überprüft. Anschließend wurde Bronchialsekret auf die Kristalle gegeben, der Objektträger abgedichtet und bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben getrocknet, mit einer elektrischen Leitschicht überzogen und mittels eines Raster-Elektronen-Mikroskops (REM) bezüglich ihrer Morphologie und Größe untersucht. Genaue Angaben zum Versuchsaufbau und der Durchführung sind im Experimentellen Teil unter 6.2 beschrieben.

Repräsentative REM-Aufnahmen der Beclomethasondipropionatkristalle von Sanasthmax[®] und Ventolair[®] vor bzw. nach einstündiger Inkubation in Bronchialsekret sind in Abb. 43 dargestellt. Die Partikelgröße der Beclomethasondipropionatkristalle betrug vor Inkubation in Bronchialsekret durchschnittlich 2 µm für Sanasthmax[®] und 1 µm bei Ventolair[®] (Abb. 43, Ia, IIa). Die ermittelten Größen waren damit vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen mittleren aerodynamischen Partikeldurchmessern von 2,6 µm (Sanasthmax[®]) [38] bzw. 1,1 µm (Ventolair[®]) [220, 221]. Nach der einstündigen Inkubation dieser Partikel im humanen Bronchialsekret wurden signifikante Veränderungen festgestellt (Abb. 43, Ib, IIb).

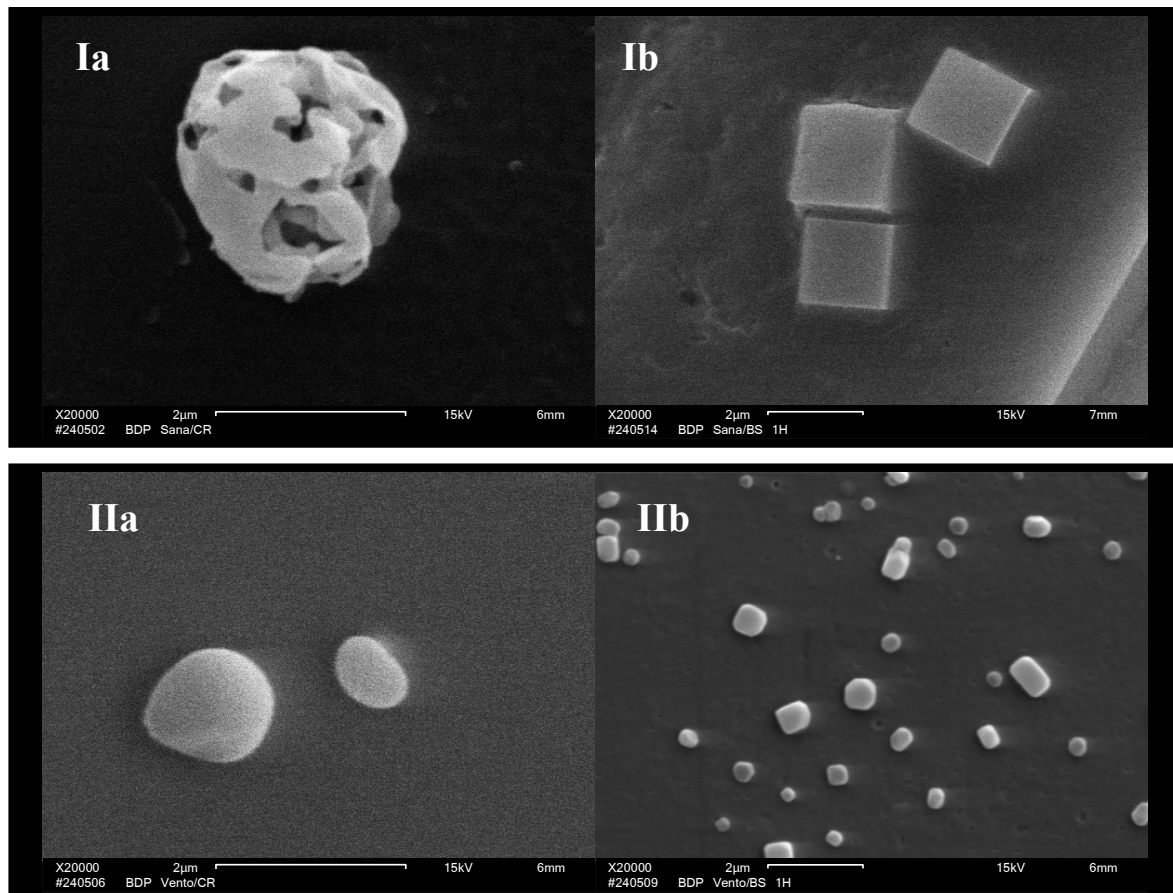


Abb. 43: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Beclomethasondipropionatkristallen der handelsüblichen HFA-Dosieraerosole Sanasthmax[®] (I) und Ventolair[®] (II) vor (Ia, IIa) und nach (Ib, IIb) einstündiger Inkubation in humanem Bronchialsekret bei 37 °C.

Beclomethasondipropionatpartikel aus Sanasthmax[®] wiesen eine einheitliche Struktur auf. Die Kristalle waren rund, amorph und sehr porös. Vermutlich kommt es durch eine rasche Verdampfung des im Dosieraerosol enthaltenen Lösungsmittels zur Ausbildung dieser amorphen und gleichzeitig porösen Strukturen (Abb. 43, Ia). Dadurch besitzen diese Kristalle eine sehr große Oberfläche. Amorphe Strukturen sind generell thermodynamisch sehr instabil. Sanasthmax[®] enthält neben Norfluran (Treibmittel) und Ethanol (Co-Solvent) auch Glycerol. Der Zusatz des Glycerols könnte als schwerflüchtige, flüssige Komponente zur Stabilisierung dieser recht labilen, schwammähnlichen Struktur beitragen. Eine deutliche Änderung der Morphologie dieser Partikel konnte nach Inkubation in Bronchialflüssigkeit beobachtet werden. Ihre Größe von 2 µm blieb dabei erhalten. Offensichtlich erfuhren die instabilen, porösen Beclomethasondipropionatpartikel nach Kontakt mit Bronchialflüssigkeit eine Umkristallisation in thermodynamisch stabilere kubische Kristalle mit kleinerer Oberfläche (Abb. 43, Ib).

Beclomethasonpropionatpartikel aus Ventolair[®] zeigten im Vergleich zu Sanasthmax[®] mit durchschnittlich 1 μm einen deutlich kleineren Partikeldurchmesser. Zudem waren die Kristalle sehr kompakt, rund bis tröpfchenförmig (Abb. 43, IIa). Im Vergleich zu den Partikeln aus Sanasthmax[®] zeigte keine der hier untersuchten Ventolair[®]-Proben ähnliche schwammartige Strukturen auf. Ein Grund dafür könnte die zwar geringfügig, jedoch signifikant unterschiedliche Zusammensetzung dieser Formulierung sein. Ventolair[®] enthält neben dem Treibmittel Norfluran nur noch Ethanol, das der Löslichkeitsverbesserung des Beclomethasonpropionats dient. Das Fehlen des Glycerols als stabilisierende schwerflüchtige Komponente bei dieser Formulierung könnte eine mögliche Erklärung für die abweichende Morphologie der Beclomethasonpropionatkristalle im Vergleich zu Sanasthmax[®] sein. Das unterschiedliche Düsendesign (unterschiedlicher Bohrungsdurchmesser des Sprühkopfes) könnte ein weiterer Grund für die unterschiedliche Partikelgröße sein. Nach der einstündigen Inkubation dieser Kristalle in Bronchialsekret konnte ebenfalls eine deutliche Änderung bezüglich ihrer Morphologie beobachtet werden. Auch hier wurden wahrscheinlich durch eine Umkristallisation kubische Kristalle gebildet. Mehrere dieser Beclomethasonpropionatpartikel waren deutlich kleiner als 1 μm und wiesen abgerundete Kanten auf, was auf eine weiter fortgeschrittene Auflösung im Vergleich zu Beclomethasonpropionatkristallen des Sanasthmax[®] hinwies (Abb. 43, IB, IIb).

Zum Vergleich der Ausgangsmorphologie der untersuchten Beclomethasonpropionat-kristalle wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des nicht mehr im Handel befindlichen Fluorchlorkohlenwasserstoff (CFC) -haltigen Sanasthmax[®] Dosieraerosols durchgeführt (Abb. 44).

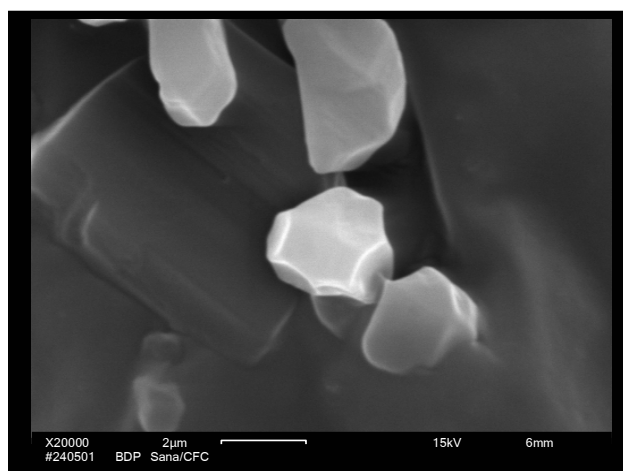


Abb. 44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Beclomethasonpropionatkristallen eines CFC-haltigen Sanasthmax[®] Dosieraerosols.

Diese Beclomethasondipropionatpartikel zeigten typischerweise kristallähnliche Strukturen auf, die deutlich größer und weniger homogen im Vergleich zu Partikeln aus HFA-Dosieraerosolen waren. Die Größe der hier repräsentativ gezeigten Kristalle stand in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen mittleren aerodynamischen Partikeldurchmessern von 3,5 bis 4,0 μm [220, 221]. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Formulierungen liegt in ihrer Galenik. Die hier gewählte CFC-Formulierung enthielt eine Suspension der inhalierten Substanz im Treibmittel. Bei den untersuchten HFA-Dosieraerosolen dagegen ist das Beclomethasondipropionat in einer Mischung von HFA und Ethanol gelöst.

Aus klinischen Studien war bekannt, dass es im Hinblick auf die pulmonale Absorption des Beclomethasondipropionats deutliche Unterschiede zwischen den CFC- und HFA-Formulierungen gibt. Nach Inhalation dieses Glucocorticoids aus HFA-Applikationen lagen sowohl der in der Lunge deponierte Anteil an Beclomethasondipropionat, als auch die gemessenen Beclomethason-17-monopropionat-Konzentrationen im Plasma deutlich höher als bei den CFC-Dosieraerosolen. Diese Unterschiede wurden bei Erwachsenen [222, 223] und bei Kindern mit Asthma bronchiale beobachtet [224]. Diese Ergebnisse konnten durch Untersuchungen mit Technetium-markiertem Beclomethasondipropionat unterstützt werden. HFA-Formulierungen zeigten dabei nahezu 4fach höhere (53 %) Lungendepositionen und Verteilungen des inhalierten Glucocorticoids als die CFC-Dosieraerosole (13 %) [36, 225]. Die Erklärung hierfür liegt in dem kleineren, für die Inhalation aerodynamisch günstigeren, Partikeldurchmesser im Gegensatz zu CFC-Formulierungen [225].

Basierend auf der wechselseitigen Beziehung zwischen Partikelgröße und pulmonal absorbierbaren Anteil, kann angenommen werden, dass das Ausmaß der Umverteilung in die extrapulmonalen Kompartimente auf die unterschiedliche Kristallgröße sowie –morphologie zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass die Löslichkeit eines Partikels mit abnehmendem Teilchendurchmesser zunimmt [226]. Eine Verbesserung der Auflösungs geschwindigkeit lässt sich neben einer Erhöhung der Sättigungslöslichkeit durch eine Vergrößerung der Oberfläche erzielen. Die Sättigungslöslichkeit ist dabei das Ergebnis des Gleichgewichts zwischen in Lösung gehenden Moleküle und an Partikeln rekristallisierenden Molekülen [227]. Die hier gezeigten Auflösungsversuche des Beclomethasondipropionats in Bronchialflüssigkeit bestätigen diese Annahme. Ventolair[®] weist Partikel auf, die signifikant kleiner sind und die sich schneller im humanen Bronchialsekret auflösen als die Partikel des Sanasthmax[®]. Diese Untersuchungen zeigten erstmalig auch, dass Beclomethasondipropionatpartikel aus HFA-Dosieraerosolen

unmittelbar nach Kontakt mit Bronchialsekret umkristallisiert werden. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der schlechten Wasserlöslichkeit des Beclomethasondipropionats.

Bei einer lokal übersättigten Lösung neigen die sich in Lösung befindlichen Partikeln zur Kristallisation. Dabei bilden sich Kristalle mit einer höheren thermodynamischen Stabilität aus, die gleichzeitig eine kleinere Oberfläche aufweisen. Da die humane Lunge ein sehr geringes Volumen an Bronchialsekret aufweist [228], liegt die Vermutung sehr nahe, dass auch *in vivo* mit einer ähnlichen Umkristallisation zu rechnen ist. Eine derartige Veränderung inhalativer Glucocorticoidpartikel zu Kristallen mit kleinerer Oberfläche würde zu einer verzögerten Auflösung des Glucocorticoids führen. Eine langsame Auflösung der Corticoidkristalle in Bronchialsekret und eine hohe Gewebeaffinität würden in einer längeren Verweildauer eines inhalierten Glucocorticoids in der Lunge resultieren, die sehr erwünscht ist.

Erst vor kurzem zeigten Freiwald et al., dass auch innerhalb der HFA-Formulierungen Unterschiede auf die pulmonale Absorption eines inhalierten Glucocorticoids geben kann [229]. Dabei wurden wie in den eigenen Versuchen zwei verschiedene HFA-Dosieraerosole (Sanasthmax[®], Ventolair[®]) in einem Dialyseversuch und an einem Perfusionsmodell mit humaner Lunge untersucht. Versuche am einfachen Dialysemodell zeigten, dass das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Umverteilung sowohl des Prodrugs Beclomethasondipropionat als auch seiner Metaboliten bei Ventolair[®] verglichen mit Sanasthmax[®] höher lag. Diese Ergebnisse ließen sich in dem humanen Lungenperfusionsmodell, das noch besser *In-vivo*-Bedingungen simuliert, bestätigen. Die Tatsache, dass Beclomethasondipropionat schon bereits wenige Minuten nach Applikation (2-3 Minuten) in der Perfusionsflüssigkeit detektiert werden konnte, unterstützt die Annahme einer sehr raschen initialen Auflösung der Kristalle. Anschließend folgte eine langsame Umverteilung. Dies kann in der schnellen Rekrystallisation der kleineren Partikel des Ventolair[®] bzw. poröse Partikel des Sanasthmax[®], begründet sein. Für die pulmonale Absorption des Beclomethasondipropionats aus Sanasthmax[®]/Ventolair[®] ist damit das Auflösungsverhalten der Partikel im Bronchialsekret der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die dabei ermittelten Verhältnisse der wieder gefundenen Muttersubstanz und weiteren Metaboliten aus Sanasthmax[®]/Ventolair[®] standen in guter Übereinstimmung zu Literaturdaten aus *In-vivo*-Studien nach Inhalation mit Beclomethasondipropionat [38, 169]. Dies zeigt auch die Eignung des von Freiwald et al. gewählten Perfusionsmodells zur Betrachtung der Verteilungskinetik inhalativer Glucocorticoide von der Lunge in extrapulmonale Kompartimente. Eine entscheidende Rolle für deren weitere Verteilungskinetik spielt dabei die Morphologie und Größe der applizierten Glucocorticoide.

In den eigenen Untersuchungen konnte erstmalig eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, das Auflösungsverhalten inhalativ applizierter Glucocorticoide basierend auf ihrer Morphologie und Größe in humanem Bronchialsekret charakterisieren zu können. Es zeigte sich dabei, dass eine Balance zwischen kleinen Partikeln, die optimal inhaliert werden, und großen Partikeln mit einer verzögerten Auflösung für eine günstige Verteilungskinetik am Applikationsort wichtig ist.

C. Experimenteller Teil

1 Bestimmung der relativen Rezeptoraffinität (RRA) von Glucocorticoiden

1.1 Verwendete Substanzen

Tab. 8: Verwendete Radiochemikalien zur Bestimmung der Rezeptoraffinität.

³ H]-Glucocorticoid	spezifische Aktivität (Ci/mmol)	Radioaktive Konzentration	Bezugsquelle
[³ H]-Dexamethason	41,0	1,0 mCi/ml	Amersham, England
[³ H]-Fluticason-17-propionat	46,4	1,2 mCi/ml	GlaxoSmithKline (GSK), England
[³ H]-Mometason-17-(2-furoat)	23,0	1,0 mCi/ml	GSK

Nach Überprüfung der radiochemischen Reinheit (siehe 1.2) wurde ein Teil der gelieferten Lösungen mit Ethanol p.a. im Verhältnis 1:20 (V/V) verdünnt (Verdünnungen V_0) und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Sonstige Substanzen und Chemikalien:

Fluticason-17-propionat (FP), Mometason-17-(2-furoat) (MF), Mometason (M) und 6 β -Hydroxy-Mometason-17-(2-furoat) (6 β -OH-MF) wurden von der Firma GlaxoSmithKline (Greenford, England) bezogen; Dexamethason, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) p.a., Glycerol 98 %, Natriumchlorid p.a., Natriummolybdat p.a. und Calciumchlorid p.a. wurden von E. Merck (Darmstadt) bezogen; Acetonitril (MeCN) (HPLC-Gradient Grade Qualität) (Fisher Scientific, Schwerte), Dimethyl-2,2-dichlorvinylphosphat (Dichlorvos, DCV), und Ethanol (EtOH) p.a. wurden von Riedel de Haën (Seelze) bezogen; DL-Dithiothreitol (DTT) wurde von Sigma-Aldrich-Chemie (Taufkirchen) bezogen; Complete™ (Proteaseinhibitorcocktail) wurde von Roche Applied Science (Mannheim) bezogen; Aktivkohle (Norit A®) wurde von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen; alle anderen Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma (Deisenheim) und E. Merck (Darmstadt) bezogen.

1.2 Überprüfung der radiochemischen Reinheit

Die radiochemische Reinheit der [^3H]-Glucocorticoide wurde mittels Dünnschicht- (DC) und Hochleistungsflusschromatographie (HPLC) mit Radiodetektion überprüft.

1.2.1 Verwendete Geräte und Materialien

- Dünnschichtchromatographie:

Tracemaster 20 Automatic TLC-Linear analyser	(Berthold Technologies, Bad Wildbad)
UV-Lampe Minuvis	Wellenlänge: 254 und 366 nm (Degussa, Heidelberg)
HPTLC-Fertigplatten F ₂₅₄	(E. Merck, Darmstadt)
Steuerung und Datenverarbeitung	Software „Chroma“, Version 7.27 (Berthold)

- HPLC mit Radiodetektion:

Pumpe	Waters-Pumpe Model 510 mit analytischem Pumpenkopf (Waters, Milford, USA)
Gradientenformer	Automatischer Gradientkontroller (Waters)
Injektor	Rheodyne Probenventil Nr. 7125, Probenschleife 100 μl
Trennsäule	Eurospher 100 C-18 (100 x 4,6 mm; 5 μm) (Knauer, Berlin)
Szintillationscocktail	Ultima-Flow™ AF (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande)
Detektoren	Absorbance Detector Spectroflow 757 (Kratos, Analytical Instruments, Weiterstadt)
	Flow Scintillation Analyzer Radiomatic™ 500 TR Series (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande)
Steuerung und Datenverarbeitung	Software „Flo ONE Control“ (Packard)

- Flüssigszintillationszähler (Liquid Scintillation Counting, LSC):

Szintillationszähler	Rackbeta 1214 LKB Pharmacia (Wallac, Freiburg)
Szintillationsgefäße	Polyethylen 10 und 20 ml (Packard Bioscience)
Szintillationscocktail	Emulsifier-Safe™ (Packard Bioscience)
Steuerung und Datenverarbeitung	Software „Ultrasoft“ (Wallac)

1.2.2 Durchführung der DC- und HPLC-Chromatographie mit Radiodetektion

10 µl der [³H]-Glucocorticoid-Verdünnungen V₀ (siehe 1.1) und 10 µl des entsprechenden nicht markierten Glucocorticoids (1 mmol/l in EtOH p.a.) wurden strichförmig auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Zur Auftrennung wurde folgendes Fließmittel verwendet:

Ether:Dichlormethan:MeOH:H₂O im Verhältnis 15:75:2:8 (V/V)

Nach 20minütiger Entwicklung ohne vorherige Kammersättigung wurden die R_f-Werte (*Retention factor*) der markierten und nichtmarkierten Glucocorticoide unter UV-Licht (254 nm) verglichen. Die cpm-Werte wurden am TLC-Scanner bestimmt und die prozentuale Aktivität der jeweiligen Banden nach Gleichung Gl. 1-1 berechnet (siehe 1.2.3).

Parallel dazu wurden 5 µl der [³H]-Glucocorticoid-Lösungen V₀ 1:10 (V/V) mit EtOH p.a. verdünnt (V_R) und mehrfach im Vergleich zu den entsprechenden nicht markierten Glucocorticoiden (0,5 mmol/l in EtOH p.a.) mittels HPLC analysiert. Hierbei wurde einerseits das Signal des UV- (254 nm) mit dem des ³H-Kanals des zu untersuchenden markierten Glucocorticoids und andererseits die Übereinstimmung der R_f-Werte der markierten und nicht markierten Glucocorticoide im UV-Kanal untersucht.

HPLC-Bedingungen:

Stationäre Phase:	Eurospher 100 C ₁₈ (150 x 4,6 mm 5 µm) (Knauer, Berlin)
Mobile Phase:	A: Wasser:Ameisensäure = 100:0,05 (V/V) B: MeCN
Gradient:	0-30 min: 35-70 % B, 30-40 min: 70-90 % B
Flußrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
UV-Detektor:	254 nm
Radiodetektor:	³ H-Kanal

Zur Überprüfung der insgesamt eingesetzten Menge an radioaktiv markierten GC [T] wurden 10 µl V_o (für die DC) bzw. 10 µl V_R (für die HPLC) des zu untersuchenden [^3H]-Glucocorticoids in Szintillationsfläschchen pipettiert, nach Zugabe von 5 ml Szintillationscocktail gut vermischt und ca. 60 min unter Lichtausschluss aufbewahrt. Anschließend wurden die dpm-Werte (Messzeit 5 min) der Proben bestimmt und mit den aus der HPLC- und Dünnschichtchromatographie ermittelten Werten verglichen.

1.2.3 Berechnung der radiochemischen Reinheit

Hierbei wurden die R_f -Werte der zu untersuchenden Substanzen bestimmt und miteinander verglichen. Die radiochemische Reinheit wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Gl. 1-1: } R_{GC} = \frac{(C_{GC} - C_0 \cdot Q_{b,h})}{(C_L - C_0)} \cdot 100$$

$[R_{GC}]$: Radiochemische Reinheit des untersuchten GC in %

$[C_{GC}]$: Radioaktivitätsmenge des Substanzpeaks

$[C_0]$: Radioaktivitätsmenge der Leerbahn

$[Q_{b,h}]$: Quotient aus Peakbreite und Laufhöhe

$[C_L]$: Radioaktivitätsmenge der Laufstrecke

Die radiochemische Reinheit aller für die Untersuchungen der Rezeptoraffinität eingesetzten Glucocorticoide war größer als 96 %.

1.3 Radioaktivitätsmessung

1.3.1 Verwendete Geräte und Materialien

Flüssigszintillationszähler (Liquid-Scintillation-Counting, LSC) (siehe 1.2.1)

1.3.2 Durchführung und Auswertung

Die Proben wurden in Szintillationsgefäße pipettiert, 5 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und gut gemischt. Die so erhaltenen Cocktails wurden mindestens 1 Stunde unter Lichtausschluss aufbewahrt und anschließend 5 Minuten im Szintillationszähler gemessen. Neben den gemessenen cpm-Werten wurden mit dem Kalibrierungsprogramm Ultroterm[®] mittels einer Quench-Korrekturkurve (aufgestellt nach der Methode des Kanalverhältnisses mit externem Standard unter Verwendung eines [³H]-Quench-Standards (LKB, Pharmacia Wallac, Freiburg) und CCl₄ als Löschagenz) auch die dpm-Werte der Proben ermittelt.

1.3.3 Berechnung der molaren Konzentration von radioaktiv markierten Glucocorticoiden aus dpm-Werten

Die Aktivität einer radioaktiv markierten Substanz wird in Curie [Ci] oder Becquerel [Bq] angegeben. Dabei entspricht ein Becquerel einer radioaktiven Kernumwandlung pro Sekunde [dps = Bq].

$$\begin{aligned} \text{Gl. 1-2:} \quad & 1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq (dps)} = 2,22 \cdot 10^{10} \text{ dpm (Zerfälle pro Minute)} \\ & 1 \text{ dpm} = 4,5045 \cdot 10^{-13} \text{ Ci} \end{aligned}$$

Die spezifische Aktivität wird in Curie pro mmol [Ci/mmol] angegeben. Die Konzentration [mol/l] einer Lösung mit 1 dpm pro ml lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Gl. 1-3:} \quad \text{Konzentration [mol/l]} = \frac{4,5045 \cdot 10^{-13}}{\text{spezifische Aktivität}}$$

1.4 Verwendete Probenmaterialien

Für die durchgeführten Untersuchungen wurde peripheres Lungengewebe verschiedener Spender, die sich einer Lungenteilresektion unterziehen mussten, verwendet. Eine Einverständniserklärung der Patienten für die Weiterverwendung des anfallenden Lungengewebes lag vor. In der Zeit von zwei Wochen vor dem Eingriff wurde keine Glucocorticoid-Therapie durchgeführt. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Lungengewebe wurde von den Fachkliniken für Thoraxchirurgie in Michelsberg und der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Die Gewebe wurden innerhalb von einer Stunde nach Entnahme entweder direkt verwendet oder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

1.5 Cytosolgewinnung

Die Cytosolgewinnung erfolgte wie bei Högger et al. [56] beschrieben.

1.5.1 Reagenzien und Geräte

Ultra-Turrax Mixer	(Janke & Kunkel, Staufen)
Ultrazentrifuge L8-55 M, Rotor Ti 65, Zentrifugenröhrchen	(Beckman Instruments Irvine, Californien)
pH-Meter	(Knick, Berlin)
Magnetrührer Variomag mono	(H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim)

- **Puffer G (Grundpuffer):**

1,21 g (10 mM) TRIS, 2,41 g (10 mM) Natriummolybdat, 1,76 g (30 mM) Natriumchlorid und 100 x g (10 %) Glycerol 98 % wurden mit Millipore[®] Wasser auf ca. 990 ml aufgefüllt. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit 2 M HCl wurde mit Wasser (Millipore[®]) auf 1000 ml ergänzt.

- **Puffer A:**

60 mg (4 mM) DTT, 73 mg (5 mM) Dichlorvos und 2 Tabletten (1 mM) Complete[™] wurden in 100 ml Puffer G gelöst. Der Puffer A wurde vor Gebrauch jeweils frisch hergestellt.

- **Puffer L:**

Zur Herstellung von Puffer L wurde ein Volumenteil Puffer G mit einem Volumenteil absolutem EtOH vermischt.

- **Aktivkohle-Suspension (2%):**

2 g gewaschenes (Millipore[®] Wasser) und getrocknetes (100 °C, 8 h) Norit A[®] wurden in 100 ml Puffer G suspendiert und mindestens 12 h vor Gebrauch bei 0-4 °C ständig gerührt (Magnetrührer).

1.5.2 Homogenisierung des Lungengewebes

Das bei -70 °C gelagerte Lungengewebe von mindestens vier Spendern wurde zur weiteren Abkühlung in flüssigen Stickstoff getaucht, in einem Gefrierbeutel mit einem Holzhammer grob zerkleinert und in einem Mörser überführt. Unter sukzessiver Zugabe von flüssigem Stickstoff wurde es mit Hilfe eines Pistills möglichst fein pulverisiert. Das so gewonnene Gewebepulver wurde mit 3 Teilen Puffer A versetzt und am Ultra-Turrax (bei voller Leistung, sechsmal 20 Sekunden, mit jeweils 30 Sekunden Pause zwischen den Intervallen) weiter zerkleinert und homogenisiert. Die Homogenisierung wurde unter ständiger Kühlung im Eisbad durchgeführt.

1.5.3 Ultrazentrifugation des Homogenats

Zur Cytosolgewinnung wurde das Homogenat eine Stunde bei 105.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation eventuell vorhandene Fettschicht wurde vorsichtig entfernt und der darunterliegende rote Überstand abdekantiert. Ein Teil des Cytosols wurde direkt zur Bestimmung des Protein- und Rezeptorgehaltes eingesetzt und der Rest aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und für spätere Untersuchungen bei -70°C gelagert.

1.6 Proteinbestimmung des Lungencytosols

Der Proteingehalt des Lungencytosols wurde spektralphotometrisch nach der Lowry- [230] bzw. Bicinchoninsäure-Methode [231] bestimmt.

1.6.1 Bestimmung nach Lowry

1.6.1.1 Reagenzien und Geräte

Spektralphotometer UV mini-1240	(Shimadzu, Duisburg)
Halbmikro PMMA-Küvetten	(Brand GmbH + CO KG Wertheim)
Vortex Reax 1	(Heidolph, Schwabach)
Rinderserumalbumin (BSA)	(Sigma, Deisenhofen)
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	(E. Merck, Darmstadt)

Lösung A: 2 g Na_2CO_3 wurden in 100 ml 0,1 M NaOH gelöst (18,86 mM)

Lösung B: 1 g CuSO_4 wurde in 100 ml Aqua dest. gelöst. (6,26 mM)

Lösung C: 2 g Na-tartrat wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst. (8,69 mM)

Lösung D: Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz : Aqua dest. im Verhältnis 5:4

Lösung E: 10 ml Lösung A, 0,1 ml Lösung B und 0,1 ml Lösung C

Kalibrierlösungen:

Aus einer Rinderserumalbumin-Stammlösung (5 mg/ml) wurden 6 Kalibrierlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 1,0 mg/ml hergestellt.

Probelösung:

Das Cytosol wurde vor der Bestimmung mit Aqua dest. 1:100 verdünnt.

1.6.1.2 Durchführung

200 µl der Probe-, Kalibrierlösungen bzw. Aqua dest. (Nullabgleich) wurden mit 1 ml Lösung E versetzt, gut gemischt (Vortex) und 10 min lang bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Lösung D zugegeben, nochmals gut gemischt und für weitere 30 min bei RT im Dunkeln stehengelassen. Nach der Inkubation wurde die Absorption der Probe- bzw. Kalibrierlösungen bei 750 nm gegen die Leerprobe (Nullabgleich) bestimmt. Mit Hilfe der erstellten Kalibriergeraden wurde der Proteingehalt des Cytosols ermittelt.

1.6.2 Bestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

1.6.2.1 Reagenzien und Geräte

Microplate-Reader	(Benchmark, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)
96-Lochplatte, Falcon 3912 MicroTest III™	(Becton Dickinson, CA, USA)
Rinderserumalbumin (BSA)	(Sigma, Deisenhofen)
Bicinchoninsäure-Lösung	(Sigma-Aldrich-Chemie, Taufkirchen)

Lösung I: Bicinchoninsäure-Lösung

Lösung II: 4 % CuSO₄·5H₂O

Lösung III: wurde unmittelbar vor der Verwendung aus 50 Teilen Lösung I und 1 Teil Lösung II hergestellt

Kalibrierlösungen:

Aus einer Rinderserumalbumin-Stammlösung (10 mg/ml) wurden 10 Kalibrierlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,02 bis 1,0 mg/ml hergestellt.

Probelösung: siehe 1.6.1.1

1.6.2.2 Durchführung

10 μl der Probe-, Kalibrierlösungen bzw. Wasser (Nullabgleich) wurden in einer 96-Lochplatte mit 200 μl Lösung III versetzt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und 30 min lang bei 37 °C (Wärmeschrank Memmert BE 400, Schwabach) inkubiert. Um Verdunstungen zu vermeiden, wurde die Platte mit Hilfe eines passenden Deckels, der unmittelbar vor der Absorptionsmessung wieder entfernt wurde, abgedeckt. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis für 1 min gekühlt und die Absorption am Microplate-Reader bei 562 nm gegen die Leerprobe (Nullabgleich) vermessen. Mit Hilfe der erstellten Kalibriergeraden wurde der Proteingehalt des Cytosols ermittelt.

1.7 Bestimmung der Binderkonzentration R_0 und der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D

Die Bestimmung wurde nach der Methode von Toft und Gorski [72] durchgeführt.

1.7.1 Prinzip der Bestimmung

Für die Ermittlung der Rezeptorenzahl des Cytosols wurden zunächst acht unterschiedliche Verdünnungen von [^3H]-Dexamethason in Puffer G hergestellt:

1) $6,0 \cdot 10^{-7}$ mol/l	5) $1,2 \cdot 10^{-7}$ mol/l
2) $4,8 \cdot 10^{-7}$ mol/l	6) $6,0 \cdot 10^{-8}$ mol/l
3) $3,6 \cdot 10^{-7}$ mol/l	7) $4,8 \cdot 10^{-8}$ mol/l
4) $2,4 \cdot 10^{-7}$ mol/l	8) $1,2 \cdot 10^{-8}$ mol/l

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde eine nicht radioaktiv markierte Dexamethasonlösung ($1,2 \cdot 10^{-5}$ mol/l) in Puffer G eingesetzt.

Pipettierschema:

	Gesamtbindung ($B_{t,GC}$)	unspezifische Bindung (B_{ns})
Puffer G	20 μ l	—
[3 H]-Dexamethasonlösung ($6 \cdot 10^{-7}$ bis $1,2 \cdot 10^{-8}$ mol/l)	je 20 μ l	je 20 μ l
Dexamethasonlösung ($1,2 \cdot 10^{-5}$ mol/l)	—	20 μ l
Cytosol	200 μ l	200 μ l

Analog dem Pipettierschema wurden die Lösungen in Eppendorfgefäße einpipettiert, am Vortex gemischt und 18 bis 20 h bei 0-4 °C inkubiert.

Zur Ermittlung der insgesamt eingesetzten Menge an radioaktiv markierten GC [T] wurden je 20 μ l der Ansätze 1 bis 8 in Szintillationsfläschchen pipettiert und nach Zugabe von 5 ml Emulsifier-Safe™ gut vermischt.

Jeweils 200 μ l vom restlichen Inkubationsgemisch (IG) wurden zu 200 μ l Aktivkohlesuspension (0 °C) pipettiert, am Vortex gemischt, 10 Minuten bei 0 °C inkubiert und 5 Minuten bei 0-4 °C und 10.000 x g zentrifugiert (Zentrifuge Micro 20, Hettich, Bäch, Schweiz). 200 μ l des Überstandes wurden wie unter 1.3 beschrieben vermessen. Hierfür wurde je ein Doppelansatz für die Gesamt- und die nichtspezifische Bindung bestimmt.

1.7.2 Auswertung

Die Berechnung der Binderkonzentration [R_0] und der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D erfolgte mit der von Scatchard [73] aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Gleichung:

$$\text{Gl. 1-4: } \frac{[B_s]}{[H]} = \frac{[R_0]}{K_D} - \frac{[B_s]}{K_D}$$

Bei Kenntnis der spezifisch gebundenen [B_s] und der nicht gebundenen [3 H]-Glucocorticoid-Konzentration [H] konnte hieraus die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante [K_D] und die Binderkonzentration [R_0] berechnet werden.

[B_s] und [H] wurden über folgende Beziehungen indirekt bestimmt:

$$[B_s] = [B_t] - [B_{ns}]$$

Gl. 1-5:

$$[H] = [T] - [B_t]$$

[B_s] : am GC-Rezeptor spezifisch gebundene [³H]-Dexamethason-Konzentration [mol/l]

[B_t] : total gebundene [³H]-Dexamethason-Konzentration [mol/l]

[B_{ns}] : unspezifisch gebundene [³H]-Dexamethason-Konzentration [mol/l]

[T] : insgesamt eingesetzte [³H]-Dexamethason-Konzentration [mol/l]

Die Auswertung erfolgte über ein im Tabellenkalkulationsprogramm Excel[®] erstelltes Arbeitsblatt unter Eingabe folgender Parameter:

Inkubationsvolumen

Volumen der Aktivkohlesuspension

Entnahmevolumen

spezifische Aktivität des [³H]-Dexamethasons

dpm der insgesamt eingesetzten [³H]-GC-Konzentration (in 20 µl IG · 50)

dpm des total gebundenen [³H]-Dexamethasons (in 200 µl IG · 5)

dpm des unspezifisch gebundenen [³H]-Dexamethasons (in 200 µl IG · 5)

Mit Hilfe der Gl. 1-3 (siehe 1.3.3) wurden zuerst die gemessenen dpm-Werte in Konzentrationswerte umgerechnet ([T], [B_t] [B_{ns}]). Aus diesen wurde wiederum nach der Gl. 1-5 [B_s], [H] und der Quotient [B_s]/[H] errechnet. Über eine Scatchard-Analyse und unter Berücksichtigung der bei der Inkubation eintretenden Verdünnung des Cytosols, sowie dessen Gesamtproteingehaltes, wurden die Gleichgewichtsdissoziationskonstante [K_D] (Steigung der erstellten Geraden) und Rezeptorkonzentration [R₀] (Schnittpunkt der erstellten Geraden mit der x-Achse) (mol Rezeptor / mg Gesamtprotein) ermittelt.

1.8 Bestimmung der relativen Rezeptoraffinität mittels kinetischer Konstanten

1.8.1 Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{Ass}

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{Ass} wurde nach der Methode von Baxter [60] bestimmt.

1.8.1.1 Prinzip der Bestimmung

Pipettierschema:

	Gesamtbindung (B_t)	unspezifische Bindung (B_{ns})
Puffer G	1 Volumenteil	—
[^3H]-Glucocorticoid-Lösung ($1,2 \cdot 10^{-7}$ mol/l)	1 Volumenteil	1 Volumenteil
Glucocorticoid-Lösung ($1,2 \cdot 10^{-4}$ mol/l)	—	1 Volumenteil
Cytosol	10 Volumenteil	10 Volumenteil

Analog dem Pipettierschema wurden die Lösungen in Glasgefäße²⁾ einpipettiert, am Vortex gemischt und bei 20 °C (Wasserbad, GFL 1002) inkubiert. Nach Zeitintervallen von 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 und 90 min wurden 200 μl des jeweiligen Inkubationsgemisches zu 200 μl Aktivkohlesuspension (0 °C) pipettiert, am Vortex gemischt, 10 Minuten bei 0 °C inkubiert und 5 Minuten bei 0-4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. 200 μl des Überstandes wurden wie unter 1.3 beschrieben vermessen. Zur Bestimmung der Radioaktivitätsmenge des insgesamt eingesetzten [^3H]-Glucocorticoids wurden aus den Inkubationsgemischen 3 x 20 μl entnommen, in Szintillationsgefäße pipettiert und wie unter 1.3 beschrieben vermessen.

1.8.1.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der für bimolekulare Reaktionen nach Rodbard [62] aufgestellten Gleichung:

²⁾ Um Adsorptionseffekte [232] zu vermeiden, wurden die Inkubationsversuche in Glasgefäßen durchgeführt.

$$\text{Gl. 1-6:} \quad Z_t = \frac{\ln([G_t]/[R_t])}{[G_0] - [R_0]} = k_{ASS} \cdot t + \frac{\ln([G_0]/[R_0])}{[G_0] - [R_0]}$$

$[G_t]$: Konzentration an nicht gebundenem [^3H]-Glucocorticoid zum Zeitpunkt t [mol/l]

$[R_t]$: Konzentration an freiem Rezeptor zum Zeitpunkt t [mol/l]

$[G_0]$: Konzentration an nicht gebundenem [^3H]-Glucocorticoid zum Zeitpunkt t = 0 [mol/l]

$[R_0]$: Konzentration an freiem Rezeptor zum Zeitpunkt t = 0 [mol/l]

k_{ASS} : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante [l/mol·min]

t : Inkubationszeit [min]

Mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel[®] wurde ein Arbeitsblatt für die Ermittlung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten $[k_{ASS}]$ erstellt, mit dessen Hilfe aus den gemessenen dpm-Werten folgende molare Konzentrationen berechnet wurden:

$[T]$: insgesamt eingesetzte [^3H]-Glucocorticoid-Konzentration [mol/l]

$[B_{T,t}]$: insgesamt gebundenes [^3H]-Glucocorticoid zum Zeitpunkt t [mol/l]

$[B_{ns,t}]$: unspezifisch gebundenes [^3H]-Glucocorticoid zum Zeitpunkt t [mol/l]

$$\text{Gl. 1-7:} \quad [G_0] = [T] - [B_{ns,0}]$$

$$\text{Gl. 1-8:} \quad [G_t] = [T] - [B_{ns,t}]$$

Um die berechneten Werte linearisieren zu können, wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung des Cytosols und der Rezeptorkonzentration für alle Messzeitpunkte jeweils ein Z_t -Wert nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Gl. 1-9: } Z_t = \frac{\ln \left\{ \frac{([T] - [B_{ns,t}])}{([R_0] - [B_{T,t}] + [B_{ns,t}])} \right\}}{[T] - [B_{ns,t}] - [R_0]}$$

Die errechneten Z_t -Werte wurden gegen die Zeit [t] aufgetragen und die gebildeten Wertepaare Z_t/t einer linearen Regression unterzogen. Die Steigung der Geraden [k_{Ass}] und der Korrelationskoeffizient r wurden ermittelt. Der Korrelationskoeffizient (r) von mindestens 4 Messpunkten war immer größer als 0,975.

1.8.2 Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{Diss}

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{Diss} wurde nach Baxter [60] bestimmt.

1.8.2.1 Prinzip der Bestimmung

Zur Bildung des Glucocorticoid-Rezeptorkomplexes wurden

1 Volumenteil [^3H]-Glucocorticoid-Lösung: $(6,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l})$

10 Volumenteile Cytosol

in ein Glasgefäß einpipettiert, am Vortex gemischt und ca. 20 Stunden bei 0-4 °C inkubiert (Inkubationsgemisch 1, (IG 1)).

Gleichzeitig wurden zur Bestimmung der unspezifischen Bindung

1 Volumenteil Glucocorticoid-Lösung: $(3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l})$

1 Volumenteil [^3H]-Glucocorticoid-Lösung: $(6,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l})$

10 Volumenteile Cytosol

in ein Glasgefäß einpipettiert, am Vortex gemischt und unter den gleichen Bedingungen wie Inkubationsgemisch 1 inkubiert (Inkubationsgemisch 2, (IG 2)).

Nach Ablauf der Inkubationszeit von ca. 20 Stunden wurden die Inkubationsgemische auf 20 °C (Wasserbad, GFL 1002) erwärmt. Zum IG 1 wurde 1 Volumenteil Glucocorticoid-Lösung ($3 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$) gegeben und am Vortex gemischt. Nach bestimmten Zeitintervallen von 0, 15, 30, 60, 90, 150, 210, 270, 390, 480 und 600 min wurden je 200 μl der Inkubationsgemische 1 und 2 zu je 200 μl Aktivkohlesuspension bei 0 °C (Eisbad) gegeben, am Vortex gemischt, 10 min inkubiert

(0 °C, Eisbad) und 5 min bei 0-4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Die Radioaktivität des Überstandes (200 µl) wurde wie unter 1.3 beschrieben bestimmt. Zur Bestimmung der Radioaktivitätsmenge des insgesamt eingesetzten [³H]-Glucocorticoids wurden aus den Inkubationsgemischen zu den Zeitpunkten 0, 150 und 390 min je 20 µl entnommen, in Szintillationsgefäße pipettiert und wie unter 1.3 beschrieben vermessen.

1.8.2.2 Auswertung

Die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion erster Ordnung wird nach folgender Beziehung bestimmt:

$$\text{Gl. 1-10:} \quad [B_{s,t}] = [B_{s,0}] \cdot e^{-k_{Diss} \cdot t}$$

$[B_{s,t}]$: spezifisch gebundenes [³H]-GC zum Zeitpunkt t [mol/l]

$[B_{s,0}]$: spezifisch gebundenes [³H]-GC zum Zeitpunkt t = 0 [mol/l]

k_{Diss} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante [min⁻¹]

t : Inkubationszeit [min]

Unter Berücksichtigung der indirekten Bestimmung der spezifischen Bindung und Anwendung der Gl. 1-5 (siehe 1.7.2) ergibt sich:

$$\text{Gl. 1-11:} \quad [B_{T,t}] - [B_{ns,t}] = ([B_{T,0}] - [B_{ns,0}]) \cdot e^{-k_{Diss} \cdot t}$$

$[B_{T,t}]$: Gesamtbindung an [³H]-GC zum Zeitpunkt t [mol/l]

$[B_{ns,t}]$: nicht spezifische Bindung an [³H]-GC zum Zeitpunkt t [mol/l]

$[B_{T,0}]$: Gesamtbindung an [³H]-GC zum Zeitpunkt t = 0 [mol/l]

$[B_{ns,0}]$: nicht spezifische Bindung an [³H]-GC zum Zeitpunkt t = 0 [mol/l]

Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel[®] wurde ein Arbeitsblatt für die Auswertung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten [k_{Diss}] erstellt. Mit diesem Arbeitsblatt wurde aus den gemessenen dpm-Werten des spezifisch und nicht spezifisch gebundenen [³H]-GC die prozentuale molare Konzentration und deren natürlicher Logarithmus berechnet. Die für jeden Messzeitpunkt ermittelte spezifische Bindung [$B_{s,t}$] wurde halblogarithmisch gegen die

Inkubationszeit aufgetragen. Aus der so erstellten Geraden wurden die Steigung (k_{Diss}) und der Korrelationskoeffizient berechnet. Der Korrelationskoeffizient (r) von mindestens 6 Messpunkten war immer größer als 0,975.

Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes wurde mit Hilfe der ermittelten k_{Diss} nach folgender Gleichung berechnet:

Gl. 1-12:
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{Diss}}$$

1.8.3 Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und Ermittlung der relativen Rezeptoraffinität (RRA)

Aus den vorher ermittelten Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wird die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D wie folgt berechnet:

Gl. 1-13:
$$K_D = \frac{k_{Diss}}{k_{Ass}}$$

Unter Kenntnis der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D eines Glucocorticoids (GC) kann die relative Rezeptoraffinität (RRA) mit Bezug auf Dexamethason nach folgender Formel berechnet werden:

Gl. 1-14:
$$RRA_{GC} = \frac{K_{D(Dexamethason)}}{K_{D(GC)}} \cdot 100$$

1.9 Bestimmung der relativen Rezeptoraffinität mittels Kompetitionstests

1.9.1 Prinzip der Bestimmung

Bei Kompetitionstests konkurrieren radioaktiv markiertes Glucocorticoid (Tracer, [³H]-Dexamethason) und nicht markiertes Glucocorticoid um die spezifische Bindung am Glucocorticoidrezeptor. Nach Gleichgewichtseinstellung wird die Konzentration an nicht markiertem Glucocorticoid berechnet, welche die in Abwesenheit vom Kompetitor beobachtete spezifische Bindung des Tracers um 50 % verringert.

Pipettierschema:

	Kompetition ($B_{t,GC}$)	Gesamtbindung (B_t)	unspezifische Bindung (B_{ns})
Puffer G	—	20 μ l	—
[³ H]-Dexamethasonlösung ($1,2 \cdot 10^{-7}$ mol/l)	20 μ l	20 μ l	20 μ l
Dexamethasonlösung ($1,2 \cdot 10^{-4}$ mol/l)	—	—	20 μ l
untersuchtes GC bzw. Dexta (10^{-5} - 10^{-9} mol/l)	20 μ l	—	—
Cytosol	200 μ l	200 μ l	200 μ l

Die so bei 0-4 °C in Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) pipettierten Ansätze wurden sechs Stunden bei 20 °C (Wasserbad, GFL 1002) inkubiert, anschließend im Eisbad wieder auf 0-4 °C abgekühlt, mit 200 μ l Aktivkohlesuspension versetzt und am Vortex gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation und 5-minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g bei 0-4 °C wurde von 200 μ l Überstand wie unter 1.3 beschrieben, die Radioaktivität bestimmt.

1.9.2 Auswertung

Die spezifische Bindung ($B_{s,GC}$) eines Glucocorticoids bei einer bestimmten Konzentration ergibt sich aus der Differenz der bei dieser Konzentration gemessenen totalen Bindung ($B_{t,GC}$) und der nicht spezifischen Bindung (B_{ns}):

$$\text{Gl. 1-15:} \quad B_{s,GC} = B_{t,GC} - B_{ns}$$

Die bei unterschiedlichen Konkretorkonzentrationen ermittelte spezifische Bindung wird in Prozent der in Abwesenheit des Konkretors beobachteten spezifischen Bindung ($B_{s,o}$), die aus der Differenz der totalen ($B_{t,o}$) und der unspezifischen Bindung (B_{ns}) des Tracers in Abwesenheit des Konkretors errechnet werden kann, ausgedrückt:

$$\text{Gl. 1-16:} \quad Y = \frac{B_{s,GC}}{B_{s,o}} \cdot 100 = \frac{B_{t,GC} - B_{ns}}{B_{t,o} - B_{ns}} \cdot 100$$

Nach einer logit-Transformation dieser Y-Werte entsprechend der Gleichung

$$\text{Gl. 1-17:} \quad \text{logit } Y = \ln \frac{Y}{100 - Y}$$

wurde der dekadische Logarithmus der Konkretorkonzentration gegen logit Y aufgetragen. Der Schnittpunkt der durch eine lineare Regression ermittelten Geraden mit der x-Achse gibt die Konzentration an nicht markiertem Glucocorticoid an, die die spezifische Bindung des [^3H]-Dexamethasons um 50 % verringert. Das Verhältnis der so ermittelten Konzentration $C_{GC,50}$ zu $C_{Ref,50}$ verhält sich umgekehrt proportional zum Verhältnis der jeweiligen relativen Rezeptoraffinitäten der Glucocorticoide:

$$\text{Gl. 1-18:} \quad \frac{C_{GC,50}}{C_{Ref,50}} = \frac{RRA_{Ref}}{RRA_{GC}}$$

Aus der für Dexamethason willkürlich festgesetzten Rezeptoraffinität von 100 erhält man somit die relative Rezeptoraffinität des untersuchten Glucocorticoids wie folgt:

Gl. 1-19:
$$RRA_{GC} = \frac{C_{Dex,50}}{C_{GC,50}} \cdot 100$$

1.10 Bestimmung der Kapazitätsfaktoren verschiedener Glucocorticoide

1.10.1 Prinzip der Bestimmung

Zur Bestimmung der Kapazitätsfaktoren (k') wurden die relativen Retentionszeiten der Glucocorticoide (rRt_{GC}), unter Verwendung von Dexamethason-21-isonicotinat als internen Standard, mittels HPLC an einer reversed-phase (RP) Säule C_{18} ermittelt.

Dabei wurden je 10 μ l einer methanolischen Lösung, die sowohl das zu untersuchende Glucocorticoid (1 μ g/ml) als auch den Standard Dexamethason-21-isonicotinat (1 μ g/ml) enthielt, unter den gleichen Bedingungen chromatographiert.

HPLC-Bedingungen:

Stationäre Phase: Symmetry C_{18} 5 μ m 150 x 4,6 mm, (Waters, MA)

Mobile Phase: MeOH : Wasser : ACN : Essigsäure = 40 : 20 : 5 : 0,2 (V/V)

Flußrate: 0,7 ml/min

Injektionsvolumen: 10 μ l

Detektion: UV bei 254 nm

Der Kapazitätsfaktor k' wurde als der Quotient aus der Nettoretentionszeit ($rRt_{GC} - t_0$) der zu untersuchenden Substanz und der Totzeit (t_0) nach folgender Gleichung errechnet

Gl. 1-20:
$$k' = \frac{rRt_{GC} - t_0}{t_0}$$

2 *In-vitro*-Untersuchungen der mRNA-Expression von CD163 durch verschiedene Glucocorticoide in humanen Monocyten

2.1 Reagenzien

- **Phosphatpuffer pH 7,4** (PBS, Puffer Buffered Salin, Biochrom, Berlin):

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
Millipore [®] Wasser	q.s.

- **Earle`s Salzlösung 10x** (Biochrom, Berlin)

NaCl	116 mM
KCl 400	5,4 mM
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1 mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,8 mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,4 mM
D-Glucose	5,5 mM
Phenolrot	8 mg/l
Millipore [®] Wasser	q.s.

- **Trennlösungen**

Biocoll, Dichte (20 °C) 1,077 g/ml, isoton (Biochrom, Berlin)

Percoll, Dichte (20 °C) 1,13 g/ml, hyperosmolar (Amersham Biosciences, Freiburg)

Percoll-Mischung: 45 % Percoll, 5 % Earle`s Salzlösung 10x, 50 % MEM-Spinner komplett

- **MEM-Spinner (Minimum Essential Medium) komplett**

1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin in MEM-Spinner (Biochrom, Berlin)

- **McCoy`s Kompletmedium**

15 % fötales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin in McCoy,s 5 A modifiziertem Medium (Biochrom, Berlin).

2.2 Geräte und Materialien

Zellaufarbeitung

Inkubator	Hera Cell Inkubator (Kendro, Hanau)
Laminar Air Flow	Typ UVF 6.07 (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)
Kulturplatten	Sterile 6-Loch-Platten, Multiwell™ Tissue Culture Plate (Becton Dickinson, New Jersey USA)
Zentrifugen	Megafuge 1.OR, Biofuge A, (Kendro-Haraeus, Berlin) Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)
Zentrifugengefäße	Zentrifugenröhrchen 50 ml, Steril (Karl Roth, Karlsruhe) Oak-Ridge-Zentrifugenröhrchen (VWR, Darmstadt)
Reaktionsgefäße	1,5 ml RNase-frei (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)
Inversmikroskop	ECLIPSE TS100 (Nikon, Düsseldorf)
Zählkammer	Neugebauer improved, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ² (Superior, Marienfeld)
pH-Meter	(Knick, Berlin)
Vortex	Reax 1 (Heidolph, Schwabach)
Dampfsterilisator	Vaculab S 3000 (MMM GmbH, München)
Sterilfilter 0,2 µm Porengröße	(Sartorius, Göttingen)

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Spektralphotometer	Ultrospec 2100 pro UV/Vis (Amersham Biosciences, Freiburg)
Küvetten	Quarzglasküvetten 10 mm mit 50-100 µl Arbeitvolumen (Biochrom, Gembridge, UK)
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Cyclone 25 (Peqlab, Erlangen)
Real Time PCR-Cycler	DNA Engine Opticon 2 (MJ Reserch, Waltham MA USA)
Steuerung und Datenverarbeitung	Opticon Monitor™ Analysis Software Version 1.4 (MJ Reserch, Waltham MA USA)

2.3 Gewinnung humaner Monocyten aus Blutzellkonzentraten

Humane Monocyten wurden aus Blutzell-Suspensionen (Bayerisches Rotes Kreuz) isoliert. Diese Suspensionen enthielten die bei Plasmaspenden abgetrennten Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten in einem Puffer und wurden vom Bayerischen Roten Kreuz durch Ausspülen von Leukocytendepletionsfiltern gewonnen. Leukocytendepletionsfilter bestehen aus Polyesterfasern, die in bestimmter Packungsdichte gepresst werden, so dass Poren definierter Größe entstehen. Die Leukocyten werden in den Filtern aufgrund verschiedener Mechanismen zurückgehalten. Seit 1997 ist die Leukocytendepletion bei Blutspenden Pflicht, um Immunreaktionen und Übertragung zellständiger Erreger bei Transfusionen zu vermeiden.

Die Isolierung der Monocyten erfolgte über zwei unterschiedliche Dichtezentrifugationen. Der erste Gradient, eine Polysucrose 400 Polymerlösung der Dichte 1,077 g/ml (Biocoll), bewirkte eine Sedimentierung der Erythrocyten und Granulocyten. Die übrigen Zellen, Monocyten, Lymphocyten und Thrombocyten, die eine geringere Dichte haben, konzentrierten sich als scharfe Bande im oberen Drittel des Gradienten [233]. Die Abtrennung der Thrombocyten erfolgte durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit (169 x g). Über einen zweiten Gradienten, bestehend aus einer Percoll-Mischung mit einer Dichte von 1,3 g/ml erfolgte eine Trennung zwischen Monocyten und Lymphocyten [234].

Die Blutzell-Suspensionen mehrerer Spender wurden gepoolt und durch Zentrifugation (604 x g, 20 min, 20 °C, ohne Bremse) auf 1/3 des Ausgangsvolumens eingeengt. Zur Bildung des ersten Gradienten wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 20 ml Biocoll-Lösung mit 30 ml der konzentrierten Blutzell-Suspension überschichtet und zentrifugiert (604 x g, 40 min, 20 °C, ohne Bremse). Monocyten, Lymphocyten und Thrombocyten wurden mit einer sterilen serologischen Pipette (Gorning, Karl Roth, Karlsruhe) abgenommen und in MEM-Spinner (komplett) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit jeweils 50 ml MEM-Spinner (komplett) gewaschen und zentrifugiert (353 x g, 10 min, 20 °C). Durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit (169 x g, 10 min, 20 °C) wurden die Thrombocyten abgetrennt. Vor der zweiten Gradientenzentrifugation muss eine Präformierung der Percoll-Mischung durchgeführt werden. Hierfür wurden in einem Oak-Ridge-Zentrifugenröhrchen 30 ml der Percoll-Mischung bei 3345 x g (60 min, 20 °C, ohne Bremse) zentrifugiert. Dabei bildet sich ein hypotonischer, kontinuierlicher Dichtegradient von 1 g/ml bis 1,3 g/ml aus. Dieser wurde dann mit jeweils 3 ml einer Suspension aus 5×10^8 mononuklearen Zellen in MEM-Spinner (komplett) überschichtet. Mittels Zentrifugation bei 1000 x g, 25 min, 20 °C, ohne Bremse

konnte eine Trennung der Monocyten von den Lymphocyten in zwei scharf begrenzte Banden erreicht werden, wobei die Monocyten auf Grund ihrer geringeren Dichte die obere Bande repräsentieren. Die Zellen dieser Bande wurden abgesaugt und dreimal mit MEM-Spinner (komplett) gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurde die Zellzahl der verbliebenen Monocyten bestimmt.

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen, wurde ein Aliquot der Suspension entnommen und je nach Zelldichte 1:10 oder 1:100 mit Trypanblau-Lösung (Fluka, Taufkirchen) verdünnt. Die Verdünnung wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Im Lichtmikroskop (400fache Vergrößerung) wurden die Zellen in vier Großquadranten gezählt und der Mittelwert gebildet. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass mindestens 10 und maximal 50 Zellen pro Großquadrant ausgezählt werden konnten. Während lebende Zellen in der Lage sind den Farbstoff auszuschließen und unter dem Mikroskop hell erscheinen, nehmen tote Zellen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt. Die Anzahl der intakten Monocyten wurde nach folgender Formel ermittelt.

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert} \cdot \text{Kammerfaktor} (10^4) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Ausgangsvolumen (ml)}$$

2.4 Stimulation der Monocyten zur CD163-Induktion

Monocyten einer Dichte von 2×10^7 Zellen / 5 ml McCoy's Kompletmedium wurden in sterilen 6-Lochplatten ausgesät und 12 Stunden bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 6 %iger CO₂-Begasung ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen analog Tab. 9 in zwei getrennten Ansätzen für 1, 2, 3, 5 bzw. 7 Stunden unter den vorgeschriebenen Bedingungen stimuliert. Als Negativkontrolle wurden je Ansatz dreimal 2×10^7 Monocyten ohne Stimulans unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

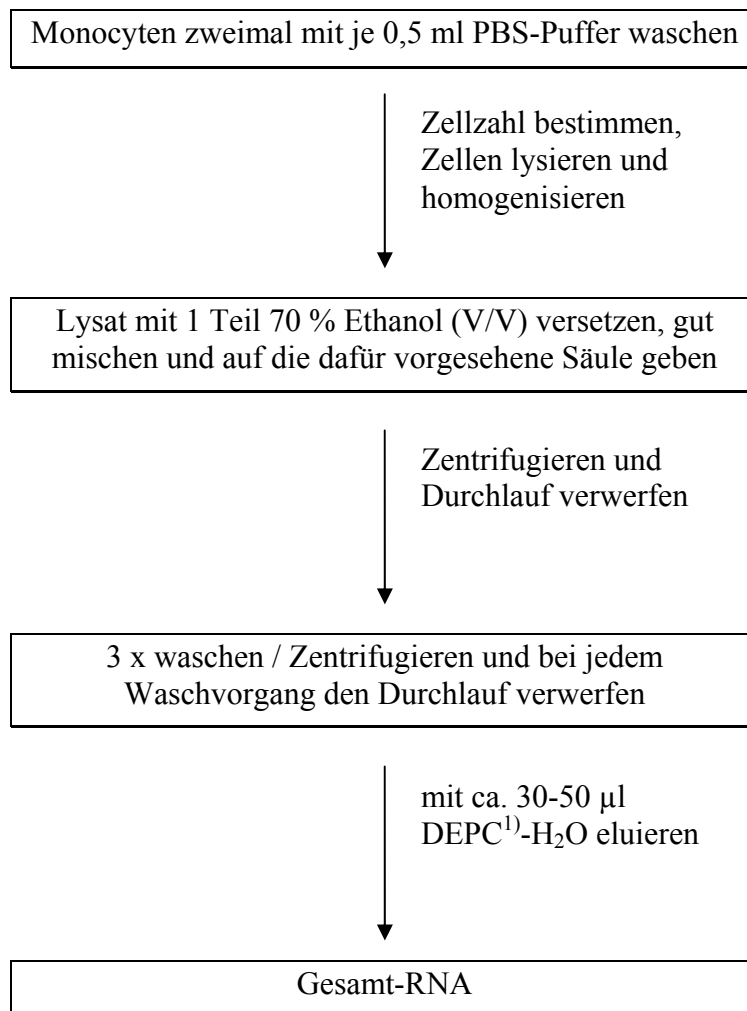
Tab. 9: Eingesetzte Glucocorticoidkonzentrationen zur Induktion des CD163 Proteins in humanen Monocyten.

Stimulans	Endkonzentration [mol/l]	
	Ansatz A	Ansatz B
Dexamethason	1×10^{-6}	$1,8 \times 10^{-7}$
Fluticasonpropionat	1×10^{-8}	$1,0 \times 10^{-8}$
Mometasonfuroat	1×10^{-8}	$7,8 \times 10^{-9}$

2.5 Isolierung der Gesamt-RNA aus $1-2 \times 10^7$ humanen Monocyten

Nach Beendigung der Stimulationszeiten wurde das Medium nach Zentrifugation (2500 x g und 4 °C für 5 min) abgenommen, die Pellets mit 1000 µl PBS-Puffer resuspendiert und in sterilisierte Reaktionsgefäße überführt. Erneutes Zentrifugieren bei 2500 x g und 4 °C für 3 min und anschließendes Suspendieren des Pellets in 500 µl PBS-Puffer diente zum Waschen der Zellen und Abtrennen von noch vorhandenem Medium.

Die Gesamt-RNA wurde mittels Affinitätschromatographie mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellervorschrift nach folgendem Schema isoliert, aliquotiert, bei -20 °C gelagert und erst kurz vor Gebrauch auf Eis aufgetaut.



¹⁾ Diethylpyrocarbonat

Die Konzentration der so gewonnenen RNA wurde in einer Verdünnung von 1:50 photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) in Quarzglasküvetten bestimmt (Messmedium DEPC-Wasser, Messvolumen 100 μ l). Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Nukleinsäure } [\mu\text{g/ml}] = \frac{A_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Faktor für Nukleinsäureart}}{1000}$$

Faktor für die Art der Nukleinsäure: 50 für doppelsträngige (ds) DNA
 40 für einzelsträngige (ss) DNA und RNA

Eine $OD_{260} = 1$ (*engl.*: optical density) entspricht dabei 50 μ g dsDNA bzw. 40 μ g RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung kann durch das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} ermittelt werden. Bei proteinfreien RNA-Lösungen sollte der Wert zwischen 1,8-2,0 liegen [235, 236]. Mittels BCA-Assay (siehe 1.6.2) konnte die Kontamination der Proben mit Proteinen nahezu (< 0,05 μ g Protein/ μ g RNA) ausgeschlossen werden

2.6 Reverse Transkription (RT) und quantitative *Real-Time*-PCR

2.6.1 Reagenzien

Wasser	Aqua ad injectabilia (B. Braun, Melsungen)
Reverse Transkriptase	Enhanced Avian (eAMV TM) 20 U/ μ l (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Anchored Oligo (dT) ₂₃ Primer	70 μ M (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
dNTPs	(MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
RNase Inhibitor	RNAquard TM 40 U/ μ l (Amersham Biosciences, Freiburg)

2.6.2 Durchführung

1 µg der unter 2.5 isolierten Gesamt-RNA wurde zunächst in cDNA durch reverse Transkription umgeschrieben. Die dafür benötigten Reagenzien wurden in einem 500 µl PCR-Gefäß und im Eisbad nach folgendem Schema zusammenpipettiert (Tab. 10).

Tab. 10: Pipettierschema 1 der Reversen Transkription.

Reagenz	Volumen µl	Endkonzentration in 20 µl
RNA template (1 µg)	—	50 ng
10 mM dNTP Mix	1	500 µM je dNTP
Anchored Oligo (dT) ₂₃ Primer	1	3.5 µM
Wasser	ad 10,0	

Der Ansatz wurde gemischt (Vortex) und 10 min bei 70 °C inkubiert (Thermocycler). Damit sollte die Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur erreicht werden, was eine effizientere RT erlaubt. Anschließend wurden zu diesem Ansatz noch weitere Reagenzien im Eisbad zugefügt (Tab. 11).

Tab. 11: Pipettierschema 2 der Reversen Transkription.

Reagenz	Volumen µl	Endkonzentration in 20 µl
10 x Reaktionspuffer	2	1 x
RNase Inhibitor	1	1 U/µl
Reverse Transkriptase	1	1 U/µl
Wasser	ad 20,0	

Der Ansatz wurde für 50 min bei 45 °C inkubiert, um den ersten komplementären (c) cDNA-Strang (first strand DNA) zu erhalten.

2.7 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von CD163 mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) im *Real-time*-Modus

Die Quantifizierung der Genexpression des Zielgens CD163 erfolgte relativ zu einem weiteren konstant exprimierten und nicht durch GC regulierten Gen (*Housekeeping Gen*), dem β -Actin [139], mit Hilfe der *Real-time*-PCR.

2.7.1 Reagenzien und Primer

Für die Real-Time PCR wurde das qPCRTM Core Kit für SYBR[®]Green I (Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet. Die Primersequenzen für die Amplifikation von CD163 und β -Actin wurden analog [115] gewählt:

CD163 (*forward*) 5'–CCT TGA AAG TCT CAT ATA C–3'

CD163 (*reverse*) 5'–GCA TTA TTC TTC TTG ACT A–3'

Optimale Annealing Temperatur: $T_m = 50^\circ\text{C}$ (von der Produktionsfirma errechnet)

β -Actin (*forward*) 5'–GTT TGA GAC CTT CAA CAC CCC–3'

β -Actin (*reverse*) 5'–GTG GCC ATC TCT TGC TCG AAG TC–3'

Optimale Annealing Temperatur: $T_m = 62^\circ\text{C}$ (von der Produktionsfirma errechnet)

Die Synthese der Primer erfolgte durch MWG (The Genomic Company Ebersberg, Deutschland).

2.7.2 Durchführung

Als Amplifikationsmatrix zur Durchführung der *Real-time*-PCR wurde die cDNA eingesetzt, die mittels reverser Transkription (siehe 2.6) aus der isolierten mRNA (siehe 2.5) gewonnen wurde. Für jedes Primerpaar (β -Actin bzw. CD163) wurden zunächst zwei getrennte Reaktionsansätze (Mastermix) hergestellt. Dabei wurde für jeden Reaktionsansatz entsprechend der Probenanzahl (n) ein Mastermix für n + 5 Proben angesetzt. Die Reaktionskomponenten der PCR, wurden auf Eis zusammenpipettiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt (Tab. 12).

Tab. 12: Reaktionsansatz (Mastermix und cDNA) für die *Real-time*-PCR

Reagenz	Volumen μl	Endkonzentration in 25 μl
Template (cDNA 1:10 in Wasser)	1,0	—
10 x Reaktionspuffer	2,5	1 x
MgCl ₂ 50 mM	1,75	3,5 mM
dNTPs (5,0 mM)	1,0	200 μM je dNTP
Forward Primer (10 μM)	0,8	320 nM
Reverse Primer (10 μM)	0,8	320 nM
SYBR [®] Green I stock (1:2000 in DMSO)	0,75	(Endverdünnung 1:66000)
Hot GoldStar Polymerase (5 U/ μl)	0,13	0,026 U/ μl
Wasser	ad 25,0	

Nach Aliquotierung von je 24 μl Mastermix (Reaktionsansatz ohne Template) in den PCR-Reaktionsgefäßen wurde zu jedem Reaktionsansatz 1 μl der zu untersuchenden cDNA bzw. für die Negativkontrollen 1 μl autoklaviertes Aqua ad injectabilia pipettiert. Zur Überprüfung der mRNA-Reinheit auf DNA-Kontaminationen wurden je 1 μl der unter 2.5 isolierten mRNA ohne vorherige reversen Transkription direkt in die PCR eingesetzt.

Die Ansätze wurden kurz zentrifugiert, in den Thermocycler (DNA Engine Opticon 2) überführt und das Zeit-Temperatur-Programm (Tab. 13) anschließend gestartet.

Tab. 13: Zeit-Temperatur-Programm für die *Real-time*-PCR

Programmschritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	10 min	95 °C
40 Zyklen	15 sec	95 °C
	1 min	60 °C
Ende	Warten bis Entnahme	4 °C

Mittels der dem Gerät zugehörigen Software wurde durch das Fluoreszenzsignal von SYBR[®]Green ein normalisiertes Reportersignal (R_n -Wert) berechnet.

Durch Subtraktion des Signals der Hindergrundfluoreszenz der ersten fünf PCR-Zyklen vom relativen Reportersignal wurde der ΔR_n -Wert ermittelt. Beim Auftragen des logarithmischen ΔR_n -Wertes (Abszisse) gegen den jeweiligen PCR-Zyklus (Ordinate) in ein Koordinatensystem wurde zunächst eine Graphik (Amplifikationsplot) erstellt (Abb. 45). Zusätzlich wurde aus den Fluoreszenzdaten von mindestens 5 der ersten 10 PCR-Zyklen eine Basislinie errechnet. Im Bereich der Basislinie kommt es immer zu leichten Schwankungen der gemessenen Fluoreszenz. Aufgrund dessen ist ein Punkt definiert worden, ab dem die gemessene Fluoreszenz einer Probe klar von der Hindergrundfluoreszenz zu unterscheiden und als positiv zu werten ist. Hierfür wird ein Schwellenwert gesetzt (*Threshold*) (Abb. 45). Er stellt eine Trennlinie zur Unterscheidung zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und der Hindergrundfluoreszenz dar und wird definiert als die Standardabweichung der Hindergrundfluoreszenz - gemessen zwischen Zyklus drei und 13 - multipliziert mit dem Faktor 10. Der Schnittpunkt zwischen der Fluoreszenz und dem Schwellenwert projiziert auf die Abszisse wird als *Cycle-threshold* (C_t) bezeichnet und stellt den niedrigsten messbaren positiven Wert einer quantitativen PCR dar (Abb. 45). Der C_t -Wert gibt eine Zyklenanzahl an und steht in direkter Beziehung zur Ausgangsmenge der eingesetzten DNA. Ist der C_t -Wert niedrig, ist die eingesetzte cDNA-Menge groß. Bei allen durchgeführten Experimenten wurde ein *Threshold* von $\leq 0,015$ angestrebt.

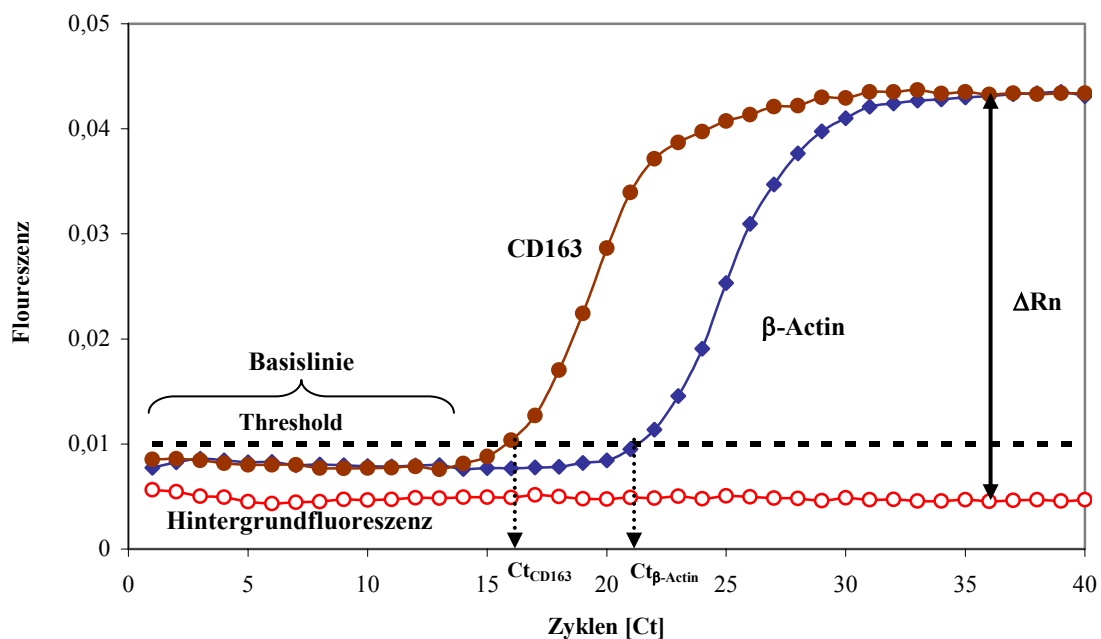


Abb. 45: Darstellung zweier Amplifikationsgraphiken mit den dazugehörigen Kenngrößen

Um ausschließen zu können, dass die Fluoreszenz aus unspezifischen Nebenprodukten resultiert, wurde im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzkurve aufgenommen (Abb. 46).

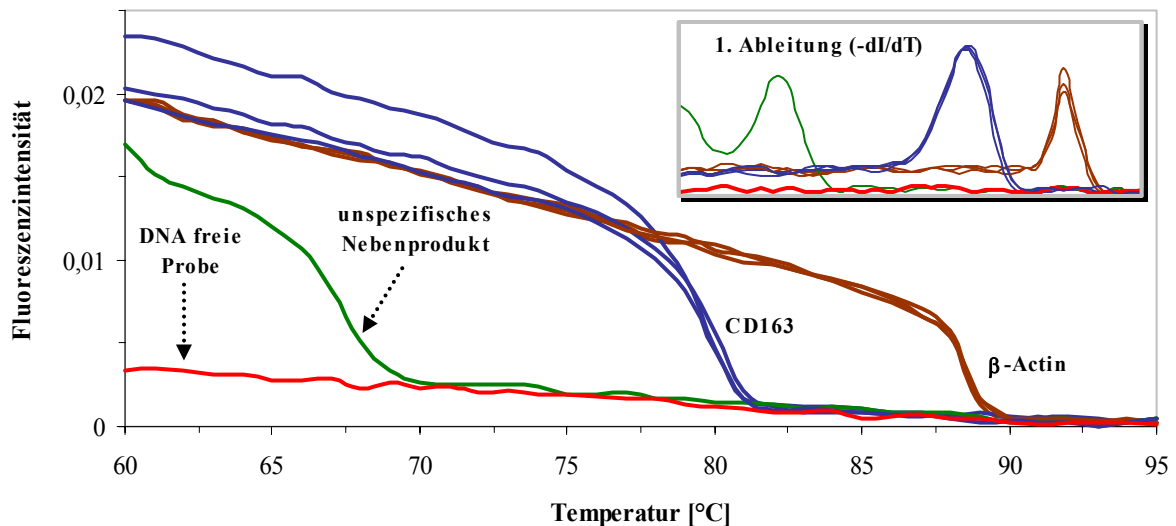


Abb. 46: Charakterisierung von Amplifikationsprodukten bei der *Real-time*-PCR mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse.

Ist die Schmelztemperatur des gewünschten Produkts erreicht, kann eine starke Verringerung des Fluoreszenzsignals detektiert werden. Unspezifische Produkte sind kleiner und schmelzen meist bei niedrigeren Temperaturen als die längeren spezifischen Produkte. Dies ermöglicht Fluoreszenzsignale aus unspezifischen Produkten aus der Messung auszuschließen. Proben, deren isolierte mRNA Kontaminationen aufwiesen und dadurch keine eindeutige Signalzuordnung zuließen, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Zur Überprüfung der Sensitivität der eingesetzten PCR-Methode und der Amplifikationsrate (PCR-Effizienz) der untersuchten Gene wurden verschiedene Verdünnungsreihen (eingesetzte cDNA:Wasser, 1:1 bis 1:10000 v/v) hergestellt und analog analysiert.

2.7.3 Auswertung

Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression von CD163 in humanen Monocyten bezogen auf das β -Actin als „Housekeeping Gen“ wurde nach einem effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmodell ermittelt [140].

Das Berechnungsmodell setzt sich aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung (Monocyten stimuliert mit GC) und Kontrolle (unstimulierte Monocyten) im Zielgen (CD163) im Zähler und aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes des Referenzgens (β -Actin) im Nenner wie folgt zusammen:

$$\text{Gl. 2-1: } \text{Ratio} = \frac{(E_{CD163})^{\Delta Ct_{CD163}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E_{\beta\text{-Actin}})^{\Delta Ct_{\beta\text{-Actin}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}$$

Im ersten Schritt wird für beide Gene (CD163 und β -Actin) der Ct-Wert der behandelten Proben (Monocyten stimuliert) vom Ct-Wert der entsprechenden Kontrollen (unstimulierte Monocyten) subtrahiert. Man erhält den sog. „delta-Ct“ (ΔCt) [141].

$$\text{Gl. 2-2: } \Delta Ct = Ct_{\text{Kontrolle}} - Ct_{\text{Behandlung}}$$

Da eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem PCR-Zyklus in der Praxis nicht realisierbar ist muss zunächst die „wahre Real-time-PCR-Effizienz“ (E) ermittelt werden.

Mit Hilfe von Standardkurven aus probenindividuellen cDNA Verdünnungsstufen wurden Geraden erstellt. Dabei wurde die eingesetzte Menge an cDNA (gesamt RNA) in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl (Ct) aufgetragen (Abb. 47).

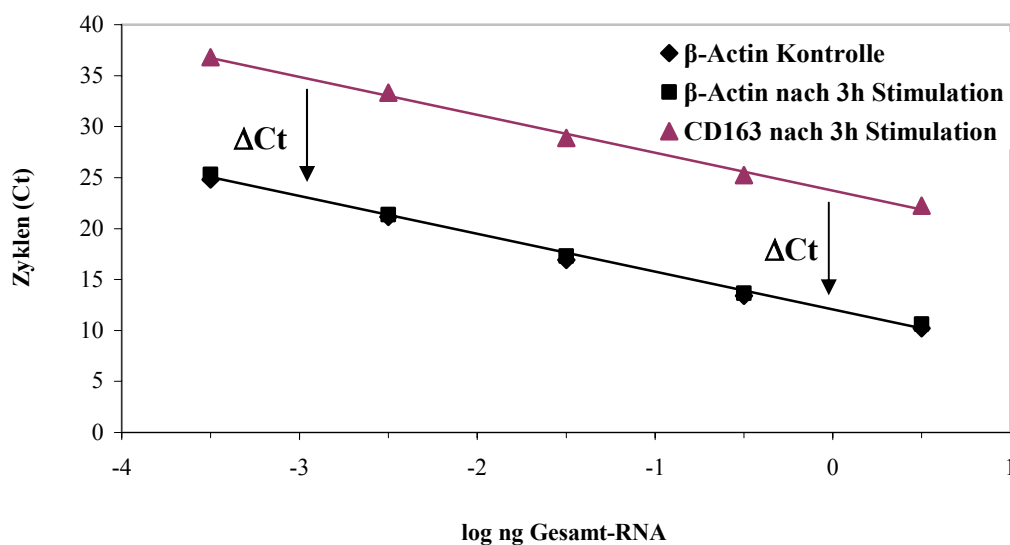


Abb. 47: Berechnung der PCR Effizienz anhand verschiedener Verdünnungsreihen.

Aus den ermittelten Steigungen konnte die Effizienz für beide Gene nach folgender Gleichung berechnet werden [138]:

$$\text{Gl. 2-3: } E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{Steigung}}\right)}$$

Um die Amplifikationsrate vom Zielgen mit der vom Referenzgen vergleichen zu können wurden zunächst nach Gl. 2-4 die Ct-Werte der erstellten Standardkurven (Ct_{SK}) voneinander subtrahiert (Abb. 47).

$$\text{Gl. 2-4: } \Delta Ct_E = Ct_{SK \text{ CD163}} - Ct_{SK \beta\text{-Actin}}$$

Anschließend wurden die entsprechenden ΔCt_E -Werte gegen den Logarithmus der Gesamt-RNA Menge aufgetragen (Abb. 48) und mit Hilfe einer linearen Regression die Steigung der Geraden errechnet

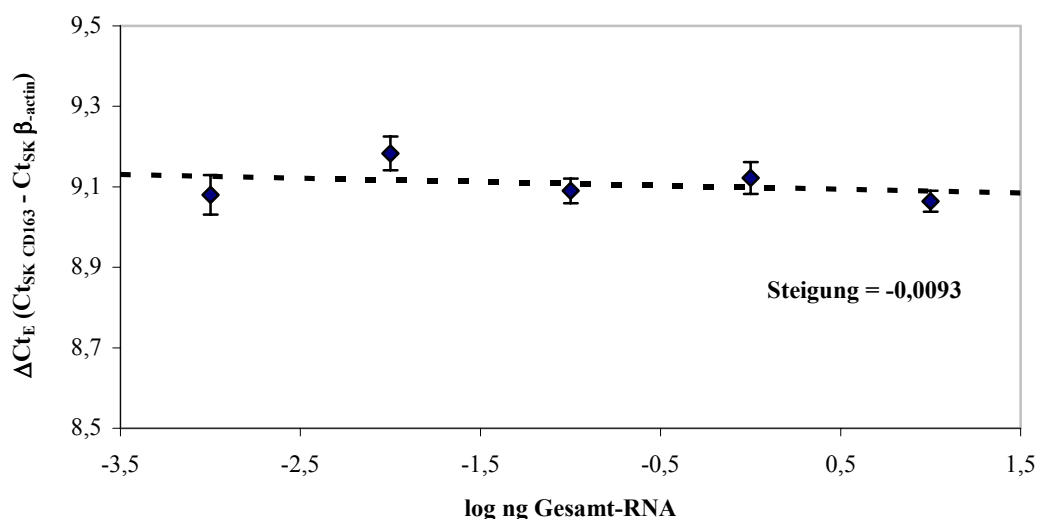


Abb. 48: Effizienzvergleich der Amplifikation von CD163 und β -Actin (n = 6).

Bei einer Steigung $< 0,1$ werden die Amplifikationseffizienzen von zwei Genen als vergleichbar angenommen [143]. Bei allen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit waren die Steigungen der so ermittelten Geraden für den Effizienzvergleich $< 0,025$.

Mittels der Berechnungssoftware REST[®] (*relative expression software tool*) [143] konnten aus drei Versuchsreihen die mittleren relativen Expressionsunterschiede (R_{MW}) von CD163 für jedes eingesetzte Glucocorticoid, normalisiert über β -Actin, nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Gl. 2-5: } R_{MW} = \frac{\left(E_{CD163}\right)^{\Delta Ct_{CD163}(MW \text{ Kontrolle}-MW \text{ Behandlung})}}{\left(E_{\beta-Actin}\right)^{\Delta Ct_{\beta-Actin}(MW \text{ Kontrolle}-MW \text{ Behandlung})}}$$

3 *In-vitro*-Untersuchungen zur Gewebefindung inhalativ angewendeter Glucocorticoide

3.1 Bindung inhalativ angewendeter Glucocorticoide an menschliches Lungengewebe

3.1.1 Reagenzien und Geräte

Krebs-Ringer-HEPES-Puffer:

Lösung A:	NaCl	118 mM
	KCl	4,84 mM
	KH ₂ PO ₄	1,20 mM
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,18 mM
Lösung B:	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,44 mM
Lösung C:	HEPES	10 mM

Es wurden jeweils 10,0 ml der Lösung A, B und C gemischt und mit Millipore® Wasser auf ca. 90 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt und mit Millipore® Wasser auf 100,0 ml ergänzt. Der Puffer wurde für jede Gewebeaufarbeitung frisch hergestellt.

3.1.2 Durchführung

Peripheres Lungengewebe (siehe 1.4) von mindestens 3 Spendern wurde mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (pH 7,4) blutfrei gewaschen und mit einem Skalpell in ungefähr 1 mm³ große Stücke zerschnitten. 0,5 g des so zerschnittenen Gewebes wurden in 20 ml Krebs-Ringer-HEPES-Puffer pH 7,4 bei 37 °C (Wasserbad, GFL 1083) mit 0,3 µg/ml des zu untersuchenden Glucocorticoids inkubiert. Im Falle des Prodrugs Ciclesonid (Cicle-PC) wurde eine enzymatisch induzierte Esterhydrolyse durch den Zusatz von Dichlorvos (1 mg Dimethyl-2,2-dihydrovinylphosphat pro ml Puffer) unterbunden [237]. Nach 5, 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten Inkubation wurden je 2 ml glucocorticoidhaltiger Puffer entnommen und durch jeweils 2 ml

frischen, auf 37 °C temperierten und ggf. mit Dichlorvos versetztem Puffer ersetzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -40 °C max. 24 Stunden gelagert.

3.2 Freisetzung der Glucocorticoide aus Lungengewebe in Humanplasma

3.2.1 Durchführung

Ein Gramm des unter 3.1.2 beschriebenen zerschnittenen Lungengewebes der gleichen Spender (siehe 3.1.2) wurde bei 37 °C 1 Stunde in 40 ml glucocorticoidhaltigen (0,3 µg/ml) Krebs-Ringer-HEPES-Puffer inkubiert. Im Falle des veresterten GC Cicle-PC wurde Dichlorvos (siehe 3.1.2) zugesetzt (1 mg/ml). Anschließend wurde das Gewebe abfiltriert, zweimal mit je 2 ml Puffer gewaschen und in 10 ml Humanplasma (37 °C) überführt. Die so erhaltene Gewebeplasmasuspension wurde 1 Stunde bei 37 °C (Wasserbad) geschüttelt. Nach 3, 6, 9, 15, 25, 40 und 60 Minuten wurde 1 ml Plasma entnommen und durch frisches Plasma (37 °C) ersetzt. Das Plasma erhielt im Falle von Cicle-PC Dichlorvos (1 mg/ml). Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -40 °C max. 24 Stunden gelagert.

3.3 Probenaufarbeitung

Die unter 3.1 und 3.2 erhaltenen Puffer- bzw. Plasmaproben, sowie 2 ml des verwendeten Puffers und 1 ml Plasma wurden mit 0,1 ml internem Standard (3 µg/ml) versetzt und zweimal mit je 3 ml Diethylether am Mischrad (340 mm Durchmesser, 10 Upm, konstruiert in der Werkstatt des Instituts) 20 min extrahiert. Die Etherphasen wurden vereinigt, unter Stickstoffbegasung bei 25 °C (Wasserbad) abgedampft, in 0,2 ml MeOH aufgenommen und mittels einer Kalibriergeraden per HPLC quantifiziert. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden je 2 ml des eingesetzten Puffers bzw. 1 ml Plasma mit methanolischen Glucocorticoidverdünnungen, in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 400 ng/ml versetzt und nach Zugabe von 0,1 ml internem Standard (3 µg/ml) in gleicher Weise wie die Proben analysiert.

3.4 HPLC-Bedingungen

Pumpe	Model 1525 für binäre Hochdruckgradienten mit analytischen Pumpenkopf (Waters, Milford, USA)
Probengeber	717plus Autosampler mit integrierter Kühlung (Analysentemperatur 10 °C) (Waters)
Stationäre Phase	Symmetry C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5µm) (temperiert mittels Säulenofens bei 25 °C) (Waters)
Detektor	UV dualband Model 2487, Meßwellenlänge 254 nm (Waters)
Steuerung und Datenverarbeitung	Software „Breeze [®] Version 3.30“ (Waters)

Fluticason-17-propionat: interner Standard (ISD) Amcinonid

Mobile Phase: A: Wasser : Essigsäure = 100 : 0,2 (V/V)
B: MeCN

Gradient: 0-30 min: 40-71 % B

Flussrate: 1 ml/min

Mometason-17-(2-furoat): ISD Amcinonid

Mobile Phase: A: Wasser : Essigsäure = 100 : 0,2 (V/V)
B: MeCN

Gradient I (Pufferproben): 0-30 min: 40-71 % B

Gradient II (Plasmaproben): 0-22 min: 38-47 % B, 22-40 min 47-72 %B

Flussrate: 1 ml/min

Cicle PC: ISD Fluticason-17-propionat

Mobile Phase: A: Wasser : Essigsäure = 100 : 0,2 (V/V)
B: MeCN

Gradient: 0-15 min: 45-65 % B, 15-30 min 65-80 %B

Flussrate: 1 ml/min

Cicle AP: ISD Fluticason-17-propionat

Mobile Phase: A: Wasser : Essigsäure = 100 : 0,2 (V/V)
B: MeCN

Gradient: 0-10 min: 30-40 % B, 10-30 min 40-75 %B

Flussrate: 1 ml/min

3.5 Quantitative Auswertung der HPLC-Ergebnisse

Nach Integration der Peakflächen mittels der Software „Breeze[®] Version 3.30“ (Waters) wurden die Quotienten aus der Fläche des Peaks der zu untersuchenden Substanz und der des Peaks des internen Standards gebildet. Die Quotienten der Kalibrierlösungen wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Mit Hilfe der so ermittelten Kalibriergeraden und der Quotienten, die für die jeweils zu untersuchende Substanz in den Inkubationsproben ermittelt wurden, konnten die Konzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten errechnet werden.

4 *In-vitro*-Untersuchungen zur Stabilität topisch angewendeter Glucocorticoide in humanen Spezimen

Die *In-vitro*-Stabilität der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Glucocorticoide (GC) in unterschiedlichen biologischen Matrices wurde mit Hilfe von Inkubationsversuchen ermittelt. In Hinblick auf die Stabilität der Esterfunktionen bei den untersuchten GC wurden die Inkubationsversuche mit und ohne Zugabe eines Esteraseinhibitors (Dichlorvos) durchgeführt. Zu festgelegten Zeiten wurden Proben entnommen und nach Aufarbeitung mittels HPLC weiter untersucht.

4.1 Stabilität der Glucocorticoide in humanen Lungengewebssuspensionen

Peripheres Lungengewebe (siehe 1.4), wurde innerhalb einer Stunde nach Entnahme mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (pH 7,4) blutfrei gewaschen und klein geschnitten. Ein Teil des geschnittenen Gewebes wurde mit 2 Teilen Puffer versetzt und unter ständiger Kühlung im Eisbad mit dem Ultra-Turrax (bei voller Leistung, viermal 20 Sekunden, mit jeweils 20 Sekunden Pause zwischen den Intervallen) homogenisiert. Sechs Gramm des so hergestellten Lungenhomogenats wurden bei 37 °C (Wasserbad, GFL 1083) 24 Stunden in 16 ml (entsprechend ca. 2 g Gewebe / 20 ml Puffer) glucocorticoidhaltigem (0,3 µg/ml) Krebs-Ringer-HEPES-Puffer mit bzw. ohne Dichlorvos (1 mg/ml) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, und 24 Stunden wurden 5 ml des Reaktionsansatzes 1 min lang bei 2000 Upm zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 2 ml abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -40 °C max. 24 Stunden gelagert. Das Zentrifugat wurde mit 2 ml frischem Puffer, mit bzw. ohne Dichlorvos (37 °C), ergänzt und zu dem Reaktionsansatz zurückgegeben. Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität des eingesetzten Gewebes wurde gleichzeitig mit dem Homogenat die Stabilität des Beclomethasondipropionats (BDP) (Positivkontrolle) verfolgt. Zur Unterdrückung eines mikrobiellen Wachstums wurden vor Beginn der Untersuchungen 200 µl einer Penicillin-Streptomycin-Lösung (Biochrom AG, Berlin) (Endkonzentration je 50 µg/ml) dem Inkubationsansatz zugegeben.

4.2 Stabilität der Glucocorticoide in humanem Plasma

20 ml gepooltes Plasma von mindestens drei Spendern wurden mit und ohne Zusatz eines Esteraseinhibitors (Dichlorvos) bei 37 °C (Wasserbad) und leichtem Schütteln mit 0,3 µg/ml GC inkubiert. Zur Unterdrückung eines bakteriellen Wachstums enthielt jeder Inkubationsansatz eine Penicillin-Streptomycin-Lösung (siehe 4.1). Nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, und 24 Stunden wurde 1 ml Plasma entnommen und bis zur weiteren Analyse bei -40 °C max. 24 Stunden gelagert. Die enzymatische Aktivität des eingesetzten Plasmas wurde ebenfalls wie unter (4.1) beschrieben durch Inkubation mit BDP untersucht.

4.3 pH-abhängige Stabilität von Mometasonfuroat in Puffer

Die Stabilität von Mometasonfuroat wurde neben Beclomethasondipropionat (Positivkontrolle) und Dexamethason (negative Kontrolle) in Phosphat-Puffer (0,02 M) bei drei verschiedenen pH-Werten (5,4, 7,4, und 9,0) untersucht. Dabei wurden 0,3 µg/ml des untersuchenden GC bei 37 °C 24 Stunden leicht geschüttelt. Nach 0, 1, 2, 3, 4, 6, 12, und 24 Stunden Inkubation wurden je 2 ml Proben entnommen und bis zur weiteren Analyse bei -40 °C gelagert.

4.4 Probenaufarbeitung

Alle bei den Stabilitätsuntersuchungen erhaltenen Proben wurden wie unter 3.3 beschrieben aufgearbeitet und mittels HPLC (3.4) analysiert.

4.5 Identifizierung der unbekanntem Substanz

Zur Identifizierung der bei der Inkubation von verschiedenen GC in humanen Spezimen entstandenen Substanzen wurden die Retentionszeiten der potenziellen Metaboliten mit denen von Reinsubstanzen verglichen. Dazu wurden methanolische Lösungen der erwarteten Substanzen mit der jeweiligen HPLC-Methode analysiert. Die Retentionszeit sollte dann mit der des im Inkubationsgemisch detektierten Metaboliten übereinstimmen.

Bei den Inkubationsversuchen mit Mometasonfuroat (MF) wurde neben der Hauptkomponente eine weitere Substanz detektiert, deren Retentionszeit nicht mit denen von MF bekannten

Metaboliten übereinstimmend war. Die Identität dieser Substanz musste zunächst mittels HPLC-MS aufgeklärt werden (4.5.1).

4.5.1 Identifizierung der unbekanntes Substanz mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

Mit Hilfe einer HPLC-MS/MS-Methode wurde die bei Inkubation des Mometasonfuroats in Plasma bzw. Puffer (pH 7,4) entstandene Nebensubstanz im Hinblick auf ihre Masse und ihr Fragmentierungsmuster analysiert.

Dazu wurde 1 ml einer Probe nach 4 Stunden Inkubation in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (pH 7,4) zweimal mit jeweils 3 ml Diethylether extrahiert, die Etherphasen vereinigt und unter Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 µl MeOH (HPLC-MS Qualität, Merck Darmstadt) aufgenommen.

5 µl dieser Lösung wurden mit Hilfe der unter 3.4 beschriebenen HPLC-Methode bei einer Flussrate von 0,2 ml/min untersucht. Die Detektion der Substanzen erfolgt in diesem Fall mit einem Massendetektor, der zusätzlich zum UV-Detektor mit der HPLC-Anlage gekoppelt ist. Es wurde ein ESI-Interface verwendet.

HPLC-MS/MS Bedingungen

Gerät	Finnigan TSQ 7000 Triple Stage Quadrupol-Massenspektrometer mit Finnigan Elektrospray Ionisation-Interface (ESI) (Finnigan MAT, Bremen)
Pumpe	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Applied Biosystems, Bensheim)
Injektor	Rheodyne 8125 Probenventil, Probenschleife 5 µl
Stationäre Phase	Eurospher 100 C-18 (150 x 2,0 mm; 5µm) (Knauer, Berlin)
Detektor	UV dualband Model 2487, Meßwellenlänge 254 nm (Waters)
ESI-Koppelkapillare	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm i.D.) (J&W, Folsom)
Hilfsgas	Stickstoff 5.0, 10 l/min
Kollisionsgas	Argon 5.0, Kollisionsdruck (0,239-0,293 Pa)

Kollisionsenergie	30 eV
Ionenquelle	1013,24 hPa
Eingangskapillare	200 °C
Kapillarspannung	3,5 kV
Steuerung und Datenverarbeitung	DEC 500/33 Workstation (Digital Equipment, Unterföhring) ICIS 8.1 Software (Finnigan, Bremen)

Anhand der detektierten Massen $[M+H]^+$ und der Fragmentierungsmuster des MF und des Zersetzungsproduktes konnte vermutet werden, dass es sich dabei um das 9,11-Epoxid des Mometasonfuroats handelt.

Zum Vergleich wurden Lösungen der Reinsubstanzen in MeOH hergestellt und analog untersucht. Sowohl die Retentionszeiten als auch die Fragmente beider Substanzpeaks stimmten mit denen der Reinsubstanzen überein.

Masse-Ladungs-Verhältnisse von Mometasonfuroat (MF) und des 9,11-Epoxids von MF:

MF

ESI-MS, $[M+H]^+$ m/z 521; ESI-MS-MS (Molekülion m/z 521, 30 eV, 267 mPa Ar):

m/z 521 (10), 503 (40), 410 (10), 391 (40), 373 (25), 355 (95), 301 (65), 278 (95), 263 (90), 171 (55).

MF-9,11-Epoxid

ESI-MS, $[M+H]^+$ m/z 485; ESI-MS-MS (Molekülion m/z 485, 30 eV, 267 mPa Ar):

m/z 485 (15), 467 (20), 373 (20), 355 (75), 301 (35), 278 (100), 263 (50), 171 (35).

4.5.2 Identifizierung der unbekanntes Substanz mittels ^1H - und ^{13}C -NMR

Mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie (NMR) konnte die Frage nach der Bildung eines Epoxids von Mometasonfuroat weiter geklärt werden.

Dazu wurden mehrere Proben wie unter 4.5.1 beschrieben mittels HPLC analysiert und der Nebensubstanzpeak getrennt gesammelt. Die so erhaltenen Fraktionen (ca. 6 ml) wurden dreimal mit jeweils 5 ml Diethylether extrahiert, die Etherphasen vereinigt und unter Stickstoffbegassung bei 30 °C (Wasserbad) zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in ca. 2 ml CDCl_3 (Aldrich, Steinheim) aufgenommen und am NMR-Spektrometer näher untersucht.

NMR-Bedingungen

Gerät	NMR-Spektrometer Bruker Avance 400 (400 MHz) (Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten)
Interner Standard	Tetramethylsilan (TMS) (Aldrich, Steinheim)
Lösungsmittel	CDCl ₃
Steuerung und Datenverarbeitung	XWIN [®] NMR Software Version 3.0 (Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten)

Zur Wiedergabe der Multiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Duplett vom Duplett. Die chemischen Verschiebungen (δ) relativ zum Standard werden in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz) ausgedrückt.

MF

¹H-NMR (400,13 MHz, CDCl₃, ppm)^a: δ = 0,98 (3H, d, J = 7,08 Hz, C₁₆-CH₃), 1,14 (3H, s, C₁₃-CH₃), 1,32 (1H, m, H₁₄), 1,68 (3H, s, C₁₀-CH₃), 1,72 (2H, dd, J = 2,27 Hz, 14,12 Hz, C₁₂), 1,94–1,76 (3H, m, H₁₅ (+1H von C₇)), 2,42 (1H, dd, J = 14,64 Hz; 3,54 Hz, (2H von C₇)), 2,66 (3H, m, H₈, and H₆), 2,91 (1H, dd, J = 14,4 Hz; 3,29 Hz, C₁₁-OH), 3,46 (1H, m, C₁₆), 4,13 (2H, s, H₂₁), 4,63 (1H, s, H₁₁), 6,12 (1H, s, H₄), 6,36 (1H, dd, J = 1,77 Hz, H₄'), 7,17 (1H, d, J = 2,78 Hz, H₁), 7,24 (1H, d, J = 2,78 Hz, H₃'), 7,63 (1H, d, J = 1 Hz, H₅').

¹³C-NMR (100,62 MHz, CDCl₃, ppm)^a: d 196,8 C₂₀, 186,3 C₃, 165,2 C₅, 158,1 C_OCO, 151,5 C₁, 147,7 C₅', 143,0 C₂', 129,8 C₂, 125,3 C₄, 119,6 C₄', 112,3 C₃', 97,4 C₁₇, 82,8 C₉, 75,2 C₁₁, 49,8 C₁₀, 48,8 C₁₃, 44,7 C₂₁, 43,7 C₁₄, 36,7 C₁₂, 35,8 C₁₆, 34,5 C₈, 32,9 C₁₅, 30,6 C₆, 27,2 C₇, 24,5 C₁₉, 17,7 C₁₈, 16,7 C₂₂.

MF-9,11-Epoxid

¹H-NMR (400,13 MHz, CDCl₃, ppm)^a: δ = 0,93 (3H, d, J = 7,07 Hz, C₁₆-CH₃), 1,02 (3H, s, C₁₃-CH₃), 1,48–1,39 (2H, m, H₁₄), 1,46 (3H, s, C₁₀-CH₃), 1,73 (1H, q, J = 11,70 Hz, H₁₅), 1,86 (1H, bs, J = 11,12 Hz; 2,02 Hz, H₁₄), 2,06 (1H, dd, J = 14,64 Hz; 2,02 Hz, C₁₂), 3,30 (1H, s, H₁₁), 3,39 (1H, m, C₁₆), 4,11 (2H, s, H₂₁), 6,22 (1H, s, H₄), 6,25 (1H, dd, J = 1,77 Hz, H₂), 6,57 (1H, dd, J = 1,77 Hz, H₃'), 6,62 (1H, d, J = 9,85 Hz, H₁), 7,26 (1H, dd, J = 1,48 Hz, H₄'), 7,66 (1H, d, J = 1,0 Hz, H₅').

¹³C-NMR (100,62 MHz, CDCl₃, ppm)^a: d 196,3 C₂₀, 186,3 C₃, 164,7 C₅, 158,0 C_{OCO}, 151,9 C₁, 147,5 C_{5'}, (142,8 C_{2'}), 128,3 C₂, 125,0 C₄, 119,9 C_{4'}, 112,3 C_{3'}, 97,6 C₁₇, 66,1 C₉, 62,7 C₁₁, 48,8 C₁₄, 47,9 C₁₀, 45,1 C₂₁, 44,0 C₁₃, 32,5 C₁₂, 35,6 C₁₆, 34,5 C₈, 31,3 C₁₅, 31,1 C₆, 29,6 C₇, 23,6 C₁₉, 17,7 C₁₈, 16,7 C₂₂.

^a Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte zusätzlich mit Hilfe von HMQC, HMBC, COSY und DEPT-Experimenten.

5 Validierung der analytischen Methoden

Die Methodvalidierung für die Pufferproben aus Gewebebin­dungs­un­ter­suchungen und Stabi­li­täts­un­ter­suchungen im Lungenhomogenat wurde wie bei den Plasmaproben durch­ge­führt. Der verwendete Puffer wurde 60 min bei 37 °C mit fein geschnittenem Lungengewebe (2,5 g Gewebe / 100 ml Puffer) in Kontakt gehalten und in einem Schüttelwasserbad (GFL 1083) inkubiert. Anschließend wurden die festen Bestandteile durch Zentrifugation (5 min bei 3000 Upm, Haereus) abgetrennt, der Überstand aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

5.1 Selektivität

Die Selektivität der Methoden wurde durch die Aufarbeitung und chromatographische Bestimmung von Leerproben in der untersuchten Matrix (Plasma, Gewebehomogenat, Puffer) gezeigt. Dazu wurde die entsprechende Matrix ohne bzw. mit Zusatz der zu untersuchenden Substanz, wie im Kapitel C 1 beschrieben aufgearbeitet und untersucht. Anschließend wurden die Chromatogramme verglichen. Es wurde in keinem Fall eine Übereinstimmung der Retentionszeiten der zu untersuchenden Substanzen mit evtl. vorhandenen Matrixbestandteilen gefunden.

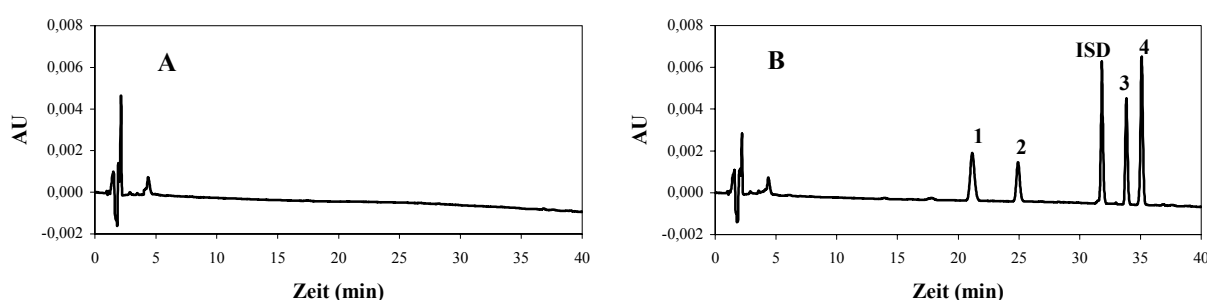


Abb. 49: Musterchromatogramme von Humanplasma vor (A) und nach Zugabe (B) der folgenden GC: 6 β -Hydroxy-Mometasonfuroat (1), Mometason (2), Mometasonfuroat (3), 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat (4) und Amcinonid als Interner Standard (ISD).

5.2 Kalibrierfunktion

5.2.1 Linearität

Die Linearität wurde mittels Kalibrationsreihen anhand von sechs Konzentrationen im Bereich von 10-400 ng/ml (für Pufferuntersuchungen) bzw. 20-400 ng/ml (für Untersuchungen im Plasma) überprüft. Jede erstellte Kalibrierfunktion wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism™ Version 4.0 anhand folgenden Parameter nachgeprüft und beurteilt: Varianzenhomogenität (Homoskedasizität), Normalverteilung der Stichproben nach D'Agostino, Residualplot (zur Überprüfung von Trends), Goodnes of Fit und Korrelationskoeffizient (r). Sind diese Voraussetzungen erfüllt und liegt ein linearer Zusammenhang vor, kann die lineare Regression durchgeführt werden.

Zur Erstellung der Kalibrierfunktionen wurden die Quotienten aus den Flächen des Peaks des zu untersuchenden Glucocorticoids und des Peaks des internen Standards gebildet. Aus den erhaltenen Quotienten (y) wurde für jede Konzentration der Mittelwert (MW) errechnet gegen die jeweilige Konzentration (x) aufgetragen und daraus die Geradengleichung ($y = ax + b$; a : Steigung, b : Achsenabschnitt) durch lineare Regression ermittelt.

Tab. 14: Kalibrierfunktionsparameter der untersuchten Glucocorticoide nach Extraktion aus mit Lungengewebe behandelten Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (pH 7,4) bzw. Humanplasma im Konzentrationsbereich von 10- bzw. 20-400 ng/ml. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 6).

Glucocorticoid	Matrix	Steigung (a)	Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (r)
FP	Puffer	0,00304 \pm 0,0001	-0,00157 \pm 0,005	0,9994
	Plasma	0,00317 \pm 0,0001	-0,00515 \pm 0,0139	0,9992
MF	Puffer	0,00693 \pm 0,0001	0,04266 \pm 0,0196	0,9991
	Plasma	0,00726 \pm 0,0001	0,01445 \pm 0,0155	0,9994
9,11-Epoxy-MF	Puffer	0,00604 \pm 0,0002	0,01001 \pm 0,0188	0,9976
	Plasma	0,00569 \pm 0,0001	0,01959 \pm 0,0236	0,9985
Cicle PC	Puffer	0,00301 \pm 0,0003	0,00798 \pm 0,021	0,9941
	Plasma	0,00289 \pm 0,0001	0,01235 \pm 0,0158	0,9975
Cicle AP	Puffer	0,0042 \pm 0,0004	0,02742 \pm 0,0291	0,9937
	Plasma	0,00394 \pm 0,0002	0,00661 \pm 0,0159	0,9973

Die Überprüfung der Kalibrierdaten mittels der GraphPad-Software „Prism 4.0“ ergab keinen Hinweis auf Trends oder Abweichungen von der Normalverteilung. Varianzhomogenität wurde bei allen hier untersuchten Glucocorticoiden erreicht. Die Korrelationskoeffizienten (r) von über 0,99 zeigen, dass die Kalibriergeraden eine gute Linearität zwischen Glucocorticoidkonzentration und Peakflächenverhältnis Corticoid zum internen Standard aufweisen [238, 239]. Keine der unter diesen Aspekten untersuchten Kalibrierfunktion wies eine Abweichung von der Linearität auf.

5.3 Prüfung auf Präzision und Richtigkeit der Methoden

Zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der Methoden wurde Krebs-Ringer-HEPES-Puffer bzw. Plasma mit verschiedenen Konzentrationen Glucocorticoid (Qualitätskontrollstandards) versetzt wie unter Kapitel C 3.3 beschrieben aufgearbeitet und wiederholt analysiert. Die Prüfung wurde exemplarisch für Fluticasonpropionat (FP) und Mometasonfuroat (MF) durchgeführt. Die Konzentrationen wurden anhand der Geradengleichung der durch lineare Regression erstellten Kalibriergeraden errechnet (Kapitel C 3.5).

Zur Feststellung der *Intra-day*-Präzision und Richtigkeit wurden an einem Tag drei verschiedene Konzentrationen (je eine Konzentration für den unteren, mittleren und oberen Arbeitsbereich) jeweils sechsmal aufgearbeitet und vermessen. Zur Ermittlung der *Inter-day*-Präzision und Richtigkeit wurde dies an fünf aufeinander folgenden Tagen wiederholt.

Zur Beurteilung der Methodenpräzision wurde die aus der Analyse der Qualitätskontrollstandards ermittelte prozentuelle relative Standardabweichung herangezogen [239]. Die Richtigkeit der Methoden wurde über die prozentuelle Abweichung der ermittelten Konzentration in Bezug auf die tatsächlich eingesetzte Konzentration nach folgender Gleichung berechnet [240]:

$$\text{Richtigkeit [\%]} = \frac{\text{ermittelte Konzentration}}{\text{eingesetzte Konzentration}} \cdot 100$$

Die Ergebnisse zur Präzision und Richtigkeit der eingesetzten Methoden für die untersuchte Glucocorticoiden sind in Tab. 15 (*intra day*) und Tab. 16 (*inter day*) wiedergegeben. Die Differenz zwischen der ermittelten und der tatsächlich eingesetzten Konzentration sowie die errechnete relative Standardabweichung lag bei allen Proben unter 10 %.

Tab. 15: *Intra-day*-Daten zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der verwendeten Methode.

Glucocorticoid	Matrix	Eingesetzte Konzentration (ng/ml)	Ermittelte Konzentration (ng/ml)	Richtigkeit (%)	relative Standardabweichung (%)
FP	Puffer	50	47,6 ± 2,4	95,2	5,6
		150	151,3 ± 3,5	99,1	3,2
		250	249,3 ± 5,4	99,6	5,9
	Plasma	100	105,6 ± 7,1	94,4	5,6
		200	196,2 ± 5,9	98,1	3,0
		300	304,3 ± 8,4	101,4	2,9
MF	Puffer	50	49,5 ± 3,6	98,0	6,4
		150	148,6 ± 4,9	99,1	3,4
		250	254,1 ± 6,1	101,6	7,7
	Plasma	100	97,2 ± 8,8	97,8	6,8
		200	203,4 ± 5,3	101,7	5,1
		300	307,5 ± 6,9	102,5	3,1

Tab. 16: *Inter-day*-Daten zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der verwendeten Methode.

Glucocorticoid	Matrix	Eingesetzte Konzentration (ng/ml)	Ermittelte Konzentration (ng/ml)	Richtigkeit (%)	relative Standardabweichung (%)
FP	Puffer	50	56,3 ± 6,8	112,6	5,6
		150	159,3 ± 4,9	106,2	3,2
		250	262,3 ± 1,3	104,8	8,2
	Plasma	100	98,1 ± 4,9	98,1	5,6
		200	208,4 ± 4,8	104,2	6,0
		300	294,6 ± 7,1	98,2	2,9
MF	Puffer	50	45,6 ± 5,3	91,2	6,4
		150	142,3 ± 2,6	94,8	3,4
		250	256,8 ± 4,7	102,7	1,7
	Plasma	100	95,8 ± 5,2	95,8	6,8
		200	207,5 ± 2,9	103,7	9,1
		300	309,4 ± 7,6	103,1	3,1

5.4 Bestimmungsgrenzen

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen der GC unter den hier angegebenen Aufarbeitungs- und Messbedingungen wurden niedrige Konzentrationen der Substanzen wiederholt ($n = 6$) aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert. Die Konzentration der Proben wurde über die erstellten Kalibriergeraden berechnet. Als kleinste quantifizierbare Konzentration (LOQ, *lower limit of quantitation*) wurde diejenige Konzentration definiert, die mit ausreichender Präzision (relative Standardabweichung $< 15\%$) und Richtigkeit (85 - 115 %) ermittelt werden kann [241]. Bei den Extraktionen aus Krebs-Ringer-HEPES-Puffer wurde für Cicle PC eine Bestimmungsgrenze von 20 ng/ml und für die anderen untersuchten GC eine Grenze von 10 ng/ml ermittelt. Die Bestimmungsgrenzen aus Humanplasma extrahierten GC wurde für Cicle PC bei 20 ng/ml, für MF 15 und für die anderen GC bei 10 ng/ml bestimmt (Tab. 17).

Tab. 17: Bestimmungsgrenzen der untersuchten Glucocorticoide nach Extraktion aus Krebs-Ringer-HEPES-Puffer bzw. aus Humanplasma. Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 6$).

Glucocorticoid	Matrix	Eingesetzte Konzentration (ng/ml)	Ermittelte Konzentration (ng/ml)	relative Standardabweichung (%)
FP	Puffer	10	11,15 \pm 1,05	9,39
	Plasma	10	10,43 \pm 0,59	5,61
MF	Puffer	10	11,23 \pm 1,39	12,35
	Plasma	15	16,04 \pm 1,45	9,03
9,11-Epoxy-MF	Puffer	10	10,92 \pm 0,82	7,48
	Plasma	10	9,82 \pm 1,33	13,49
Cicle PC	Puffer	20	21,59 \pm 1,91	8,84
	Plasma	20	20,46 \pm 2,45	11,97
Cicle AP	Puffer	10	11,68 \pm 1,09	5,99
	Plasma	10	11,06 \pm 0,86	7,78

5.5 Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die Steigungen von sechs Kalibriergeraden (siehe 5.2.1) nach zweifacher Extraktion (a_E), wie unter 3.3 beschrieben, mit den Steigungen (a_S) von sechs Kalibriergeraden, im gleichen Konzentrationsbereich (10- bzw. 20-400 ng/ml) bei direkter Injektion (Standardproben) ins Verhältnis gesetzt. Die Wiederfindung wurde nach folgender Beziehung berechnet [242]:

$$\text{Wiederfindung [\%]} = \frac{(a_E) \text{Steigung}_{\text{extrahierte Probe}}}{(a_S) \text{Steigung}_{\text{Standardprobe}}} \cdot 100$$

Tab. 18: Kalibrierfunktionsparameter der ermittelten Geraden nach zweifacher Extraktion mit Diethylether. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 6).

Kalibriergeraden für extrahierte Proben				
Glucocorticoid	Matrix	a ¹⁾	b ¹⁾	r ¹⁾
FP	Puffer	0,00344 \pm 0,0001	0,00725 \pm 0,0086	0,998
	Plasma	0,00332 \pm 0,0003	-0,00037 \pm 0,0157	0,997
MF	Puffer	0,00741 \pm 0,0001	0,01690 \pm 0,0242	0,995
	Plasma	0,00720 \pm 0,0002	0,01652 \pm 0,0135	0,993
9,11-Epoxy-MF	Puffer	0,00561 \pm 0,0002	0,01865 \pm 0,0184	0,996
	Plasma	0,00574 \pm 0,0002	0,05318 \pm 0,0273	0,989
Cicle PC	Puffer	0,00287 \pm 0,0004	0,03636 \pm 0,0211	0,991
	Plasma	0,00264 \pm 0,0002	0,00137 \pm 0,0149	0,994
Cicle AP	Puffer	0,00383 \pm 0,0004	-0,1845 \pm 0,0346	0,992
	Plasma	0,00392 \pm 0,0001	-0,00252 \pm 0,0137	0,993

¹⁾ a: Steigung der Regressionsgeraden, b: y-Achsenabschnitt, r: Korrelationskoeffizient.

Tab. 19: Kalibrierfunktionsparameter der ermittelten Geraden bei direkter Injektion. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=6).

Kalibriergeraden für Standardproben			
Glucocorticoid	a¹⁾	b¹⁾	r¹⁾
FP	0,00361 \pm 0,0002	-0,00127 \pm 0,0012	0,999
MF	0,00786 \pm 0,0004	0,00031 \pm 0,0004	0,992
9,11-Epoxy-MF	0,0058 \pm 0,0002	-0,00244 \pm 0,0015	0,999
Cicle PC	0,0031 \pm 0,0007	0,00667 \pm 0,0162	0,991
Cicle AP	0,0042 \pm 0,0001	0,02052 \pm 0,0241	0,995

¹⁾ a: Steigung der Regressionsgeraden, b: y-Achsenabschnitt, r: Korrelationskoeffizient.

Die daraus errechneten Wiederfindungsraten für die hier untersuchten Glucocorticoide sind in folgender Tab. wiedergegeben (Tab. 20).

Tab. 20: Wiederfindungsrate (%) für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Glucocorticoide berechnet aus dem Verhältnis der unter Wiederholbedingungen (n=6) ermittelten Steigungen der Regressionsgeraden (siehe Tab. 18 und Tab. 19).

Wiederfindung (%)					
Matrix	FP	MF	9,11-Epoxy-MF	Cicle PC	Cicle AP
Puffer	95,3	94,2	96,7	92,5	91,2
Plasma	91,9	91,6	98,9	85,2	93,3

5.6 Extraktionseffektivität

Zur Bestimmung der Extraktionseffektivität wurden wiederholt ($n = 6$) die zu untersuchenden GC in drei verschiedenen Konzentrationen den Medien -Puffer (2 ml), Plasma (1 ml) und Lungenhomogenat (LH, 2 ml)- zugegeben, so dass die Endkonzentrationen 40, 150 und 350 ng/ml betragen. Anschließend wurde 30 Sekunden am Vortex gemischt und zweimal mit je 3 ml Diethylether am Mischrud 20 min extrahiert. Die Etherphasen wurden vereinigt, unter Stickstoffbegasung bei 25 °C (Wasserbad) abgedampft, in 0,2 ml Methanol aufgenommen und mittels HPLC analysiert. Die Berechnung der Extraktionseffektivität erfolgte nach folgender Gleichung [242]:

$$\text{Extraktionseffektivität [\%]} = \frac{\text{Peakfläche der Substanz nach Extraktion für } x \text{ ng/ml}}{\text{Peakfläche der Substanz bei direkter Injektion für } x \text{ ng/ml}} \cdot 100$$

Tab. 21: Extraktionseffektivität der untersuchten Glucocorticoide aus verschiedenen Medien mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion für unterschiedliche Konzentrationen (40, 150 und 350 ng/ml). Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 6$).

Glucocorticoid	Matrix	Extraktionseffektivität (%)		
		40 ng/ml	150 ng/ml	350 ng/ml
FP	Puffer	98,4 \pm 1,5	96,4 \pm 1,7	97,3 \pm 2,1
	Plasma	87,4 \pm 2,8	91,7 \pm 0,6	91,3 \pm 2,2
	LH	95,2 \pm 1,7	93,8 \pm 2,4	94,8 \pm 3,5
MF	Puffer	89,5 \pm 5,7	87,4 \pm 9,2	92,6 \pm 5,2
	Plasma	86,2 \pm 8,1	87,5 \pm 6,4	88,7 \pm 4,9
	LH	89,2 \pm 3,6	86,8 \pm 7,4	90,3 \pm 1,1
9,11-Epoxy-MF	Puffer	96,6 \pm 0,4	95,6 \pm 4,8	93,8 \pm 8,2
	Plasma	92,9 \pm 2,5	90,5 \pm 3,7	92,8 \pm 2,2
	LH	96,1 \pm 3,5	95,8 \pm 0,9	93,7 \pm 2,8
Cicle PC	Puffer	78,6 \pm 7,9	78,1 \pm 9,3	76,1 \pm 9,4
	Plasma	71,5 \pm 9,2	72,4 \pm 7,4	73,3 \pm 6,7
Cicle AP	Puffer	89,9 \pm 5,8	92,1 \pm 6,3	93,8 \pm 4,4
	Plasma	94,2 \pm 6,4	91,2 \pm 4,6	93,0 \pm 7,1

6 Auflösungsverhalten von Glucocorticoidkristallen in Bronchialsekret

6.1 Verwendete Geräte und Materialien

Raster-Elektronen-Mikroskop	(REM) Zeiss DSM 962 (Carl Zeiss, Oberkochen)
Inversmikroskop	ECLIPSE TS100 (Nikon, Düsseldorf)
Sputtersystem	SCD 005 für Palladium/Kohle (Baltec, Witten)
Wärmeschrank	BE 400 (Mettler, Schwabach)
Objektträger	Mit Vertiefung, Kalk-Natron-Glas, Durchmesser x Höhe der Vertiefung 15 x 1,5 mm (Karl Roth GmbH, Karlsruhe)
Inhalationshilfe (Spacer)	Volumatic [®] , ca. 900 cm ³ Volumen (GSK, UK)

Untersuchte Dosieraerosole

Handelspräparat	GC	Darreichungsform	sonstige Bestandteile	Hersteller
Sanasthmax[®]	BDP	HFA-DA ¹⁾	Norfluran, Ethanol 96 %, Glycerol	Asche Chiesi
	BDP	CFC-DA ²⁾	Trichlorfluormethan, Dichlordifluormethan, Ölsäure	GSK
Ventolair[®]	BDP	HFA-DA	Norfluran, Ethanol 11,8 %	IVAX Pharma

¹⁾ FCKW-freies Dosieraerosol (DA); ²⁾ FCKW-haltiges Dosieraerosol.

6.2 Probenvorbereitung und Durchführung

Glucocorticoidkristalle (GC-Kristalle) verschiedener Handelspräparate wurden mit gepooltem Bronchialsekret (Abteilung für innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik A, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster) von mindestens drei Spendern, die sich einer Bronchoskopie unterziehen mussten, für 0,5 bzw. 6 Stunden bei 37 °C (Wärmeschrank) inkubiert, aufgearbeitet und anschließend mit Hilfe eines Raster-Elektronen-Mikroskops (REM)

untersucht. Zum Vergleich wurden die GC-Kristalle direkt auf den Objektträger aufgebracht und analog untersucht. Das Aufbringen der GC-Kristalle auf die Objektträger erfolgte mit Hilfe eines Spacers und ist schematisch in der folgenden Abbildung dargestellt.

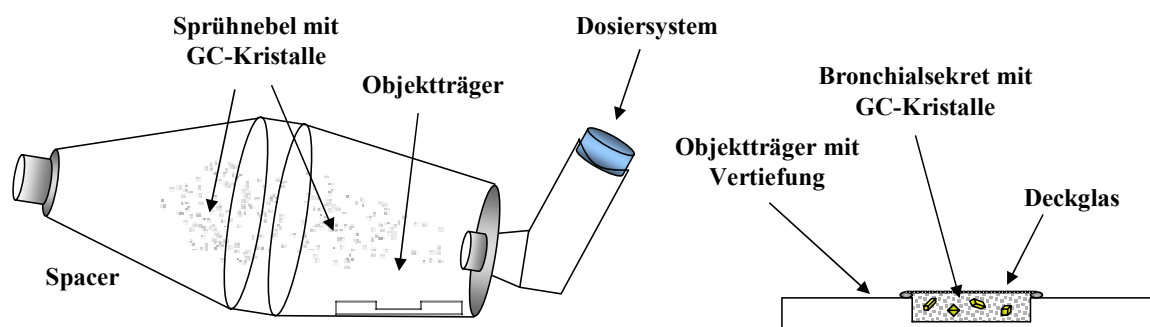


Abb. 50: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Im Inneren des Spacers wurden die Objektträger unmittelbar unter der Ansatzöffnung so positioniert, dass kein direkter Aufprall der GC-Kristalle auf die Trägeroberfläche beim Aufsprühen einer Dosis erfolgte. Vor dem Aufsprühen wurden die entsprechenden Dosierbehältnisse kräftig geschüttelt und am Spacer angebracht. Nach erfolgtem Sprühstoß (eine Dosis) wurden die Objektträger innerhalb von 5-10 s aus dem Spacer entfernt. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde bei 1000facher Vergrößerung die Anzahl und Verteilung der GC-Kristalle in der Vertiefung des Objektträgers überprüft. Durchschnittlich befanden sich bei den vorgegebenen Bedingungen ca. 50-70 Kristalle auf einer Fläche von etwa 10 mm^2 .

Die so auf die Objektträgervertiefung aufgebrachten GC-Kristalle wurden mit $200 \mu\text{l}$ Bronchialsekret suspendiert und für 0,5 bzw. 6 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Wärmeschrank) inkubiert. Um Verdunstungen zu vermeiden, wurde die Vertiefung mit einem Deckglas passender Größe abgedeckt und mit Siliconpaste abgedichtet.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Volumen der Suspension bei Raumtemperatur (RT) unter leichtem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Nachfolgend wurde zweimal mit je $50 \mu\text{l}$ Millipore[®] Wasser gewaschen und ebenfalls unter Stickstoffbegasung bei RT getrocknet.

Anschließend wurden die Proben in einem Sputtergerät mit einer dünnen elektrischen Leitschicht aus Palladium-Kohle überzogen. Die Palladium-Kohle-Schicht (Plasma) stammt aus einer Folie, dem Target, die in einer Vakuumkammer mit Argongas-Atmosphäre (bei 45 Pa und 50 mA)

ionisiert wurde. Das so erzeugte Plasma setzt sich auf der Probe ab und bildet während einer Sputterzeit von ca. 3 min eine einheitliche und bis zu 100 nm dicke Schicht.

Die so behandelten Proben wurden mit Hilfe eines Raster-Elektronen-Mikroskops (REM) bezüglich ihrer Morphologie und Größe untersucht. Zur Beurteilung dieser Parameter wurden Aufnahmen in zwei verschiedenen Vergrößerungen gemacht (10 bzw. 2 μm) und visuell ausgewertet.

Zur Betrachtung der Morphologie und Größe der eingesetzten GC-Kristalle direkt nach Abgabe der Dosis wurden sie auf einen Objektträger gebracht, gesputtet und ebenfalls bei gleicher Vergrößerung am REM untersucht.

D. Tabellarischer Anhang

1 Bestimmung der relativen Rezeptoraffinitäten von Glucocorticoiden**1.1 Einzelergebnisse zur Bestimmung der kinetischen Konstanten****1.1.1 Einzelergebnisse zur Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_1)**

	Ansatz I			Ansatz II		
	Dexa	FP	MF	Dexa	FP	MF
Zeit (min)	B_s ($\times 10^{-10}$ mol/l)			B_s ($\times 10^{-10}$ mol/l)		
2	0,475	2,169	1,125	0,338	1,971	1,027
5	0,843	2,648	2,072	0,746	2,441	1,434
10	0,996	3,025	2,277	1,002	2,659	1,750
15	1,318	3,400	2,512	1,209	2,935	2,230
20	1,630	3,638	2,625	1,333	3,214	2,498
30	1,733	3,648	3,004	1,662	3,498	2,828
40	1,931	3,758	2,993	1,632	3,732	3,110
50	1,834	3,672	3,694	1,620	3,828	3,826
60	1,968	3,646	3,890	1,718	3,849	3,715
70	2,269	3,877	3,960	1,809	3,893	3,913

	Ansatz III			Ansatz IV		
	Dexa	FP	MF	Dexa	FP	MF
Zeit (min)	B_s ($\times 10^{-10}$ mol/l)			B_s ($\times 10^{-10}$ mol/l)		
2	0,178	0,583	1,027	0,080	0,284	1,355
5	0,550	0,859	2,373	0,568	0,861	1,788
10	0,788	1,372	2,788	1,020	1,405	2,560
15	1,128	1,567	3,465	1,095	1,643	3,298
20	1,281	1,915	3,921	1,166	1,861	3,646
30	1,510	2,149	4,053	1,202	2,301	3,957
40	1,650	2,336	4,295	1,278	2,213	3,886
50	1,599	2,497	5,219	1,469	2,596	4,989
60	1,803	2,857	5,296	1,604	2,828	5,643
70	1,917	2,750	5,785	1,388	2,769	6,045

1.1.2 Einzelergebnisse zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-1})

Zeit (min)	Ansatz I			Ansatz II		
	Dexa	FP	MF	Dexa	FP	MF
	B_s (%)			B_s (%)		
5	100	100	100	100	100	100
15	98	101	97	85	98	94
30	84	97	96	48	95	97
60	53	94	87	54	94	91
90	38	87	79	26	90	88
150	18	82	76	22	88	81
210	11	77	74	11	82	73
270	9	66	70	6	77	67
390	6	64	65	3	68	63
480	2	56	47	3	65	58
600	1	53	43	2	30	52

Zeit (min)	Ansatz III			Ansatz IV		
	Dexa	FP	MF	Dexa	FP	MF
	B_s (%)			B_s (%)		
5	100	100	100	100	100	100
15	66	101	94	80	105	97
30	32	99	81	62	106	103
60	36	90	78	49	101	86
90	15	92	75	26	93	83
150	13	84	69	15	92	75
210	6	76	74	14	88	73
270	3	72	63	9	75	71
390	2	66	53	3	71	65
480	4	65	48	15	74	59
600	1	63	44	7	52	45

1.2 Einzelergebnisse der Kompetitionstests

Im Folgenden sind aufgeführt:

- Die bei den untersuchten Glucocorticoiden eingesetzten Konkretorkonzentrationen
- Die aus den Bestimmungen errechnete logit (y)-Werte (siehe C-1.8.2)
- Die relativen Rezeptoraffinitäten (RRA) und Korrelationskoeffizienten (r) der nach der Logit-log-Transformation resultierenden Geraden

Inkubationsansatz I

Konzentration (mol/l)	log Konz.	logit y			
		Dexa	M	6 β -OH-MF	9,11-Epoxy-MF
1 x 10 ⁻⁵	-5,0	-	-	-0,81	-1,34
5 x 10 ⁻⁶	-5,3	-1,13	-1,69	-0,63	-1,23
1 x 10 ⁻⁶	-6,0	-0,70	-1,17	-0,50	-0,95
5 x 10 ⁻⁷	-6,3	-0,41	-0,99	-0,34	-0,64
1 x 10 ⁻⁷	-7,0	-0,19	-0,48	-0,09	-0,15
5 x 10 ⁻⁸	-7,3	0,19	-0,42	-0,01	-0,02
1 x 10 ⁻⁸	-8,0	0,36	-0,15	0,06	0,23
5 x 10 ⁻⁹	-8,3	0,67	0,16	0,24	0,55
1 x 10 ⁻⁹	-9,0	-	0,29	-	-
r		0,997	0,991	0,988	0,993
RRA		100	787	227	186

Inkubationsansatz II

Konzentration (mol/l)	Log Konz.	logit y			
		Dexa	M	6 β -OH-MF	9,11-Epoxy-MF
1 x 10 ⁻⁵	-5,0	-	-1,03	-0,79	-1,48
5 x 10 ⁻⁶	-5,3	-1,23	-0,95	-0,57	-1,35
1 x 10 ⁻⁶	-6,0	-0,76	-0,89	-0,41	-1,09
5 x 10 ⁻⁷	-6,3	-0,47	-0,59	-0,30	-0,78
1 x 10 ⁻⁷	-7,0	-0,24	-0,35	-0,22	-0,46
5 x 10 ⁻⁸	-7,3	0,06	-0,30	-0,01	-0,14
1 x 10 ⁻⁸	-8,0	0,26	-0,13	0,14	0,16
5 x 10 ⁻⁹	-8,3	0,49	0,08	0,21	0,52
1 x 10 ⁻⁹	-9,0	-	0,25	0,41	0,78
r		0,994	0,990	0,991	0,995
RRA		100	741	187	247

Inkubationsansatz III

Konzentration (mol/l)	Log Konz.	logit y			
		Dexa	M	6 β -OH-MF	9,11-Epoxy-MF
1 x 10 ⁻⁵	-5,0		-1,05	-0,96	-0,90
5 x 10 ⁻⁶	-5,3	-1,27	-0,84	-0,69	-0,66
1 x 10 ⁻⁶	-6,0	-0,83	-0,59	-0,51	-0,50
5 x 10 ⁻⁷	-6,3	-0,47	-0,41	-0,33	-0,30
1 x 10 ⁻⁷	-7,0	-0,27	-0,23	-0,08	-0,18
5 x 10 ⁻⁸	-7,3	0,18	-0,19	0,02	0,00
1 x 10 ⁻⁸	-8,0	0,22	-0,13	0,13	0,11
5 x 10 ⁻⁹	-8,3	0,56	0,01	0,21	0,21
1 x 10 ⁻⁹	-9,0		0,14	0,37	0,34
r		0,991	0,979	0,982	0,986
RRA		100	816	202	227

1.3 Relative Retentionszeiten zur Bestimmung der Kapazitätsfaktoren (k')

HPLC-Bedingungen siehe Kapitel C 1.8

Glucocorticoid	Retentionszeit (min)	Retentionszeit ISD (min)	Kapazitätsfaktor k'	Log (k')
17-BMP	14,96	4,40	3,40	0,5315
21-BMP	10,23	4,21	2,43	0,3856
Amci	7,05	4,61	1,53	0,1845
BDP	35,64	4,40	8,10	0,9085
Becló	3,34	4,18	0,80	-0,0974
Bud	11,82	4,41	2,68	0,4281
Cicle AP	13,62	4,38	3,11	0,4928
Cicle PC	39,39	4,19	9,40	0,9731
Dexa	3,53	4,36	0,81	-0,0917
<i>Dexa-iso</i> ¹	4,46	4,46	1,00	0
Fluni	5,65	4,28	1,32	0,1206
FP	23,09	4,44	5,20	0,7160
F	8,79	4,60	1,91	0,2812
M	9,22	4,38	2,10	0,3230
MF	22,74	4,29	5,30	0,7243
6 β -OH-MF	5,44	4,39	1,24	0,0934
9,11-Epoxy-MF	24,42	4,53	5,39	0,7316
21-PP	6,32	4,32	4,46	0,1652
TCA	29,77	4,35	6,84	0,8352

¹ interner Standard (ISD).

2 *In-vitro*-Untersuchungen der mRNA-Expression von CD163

2.1 Einzelergebnisse der Genexpression von CD163 bei Stimulation mit GC

FP (1 x 10 ⁻⁸ M)	Ansatz I		Ansatz II	
	Zeit (h)	Ct β -Actin	Ct CD163	Ct β -Actin
0	14,13	22,430	20,02	26,21
1	14,86	22,022	16,67	21,25
3	16,11	21,291	17,18	19,92
5	16,33	19,949	17,26	18,87
7	15,61	18,742	18,72	19,32

MF (1 x 10 ⁻⁸ M)	Ansatz I		Ansatz II	
	Zeit (h)	Ct β -Actin	Ct CD163	Ct β -Actin
0	15,99	23,11	17,91	25,38
1	22,84	28,62	18,34	24,02
3	16,38	20,11	18,17	21,58
5	16,87	18,95	18,35	20,62
7	16,58	18,34	18,38	20,17

Dexa (1 x 10 ⁻⁶ M)	Ansatz I		Ansatz II	
	Zeit (h)	Ct β -Actin	Ct CD163	Ct β -Actin
0	15,36	22,86	16,43	23,98
1	15,36	22,04	15,78	21,09
3	16,98	22,91	15,24	20,07
5	15,88	21,20	14,68	18,19
7	14,90	18,99	14,57	17,46

2.2 Einzelergebnisse der Genexpression von CD163 bei equipotenten GC-Konzentrationen

FP (1×10^{-8} M)	Ansatz I		Ansatz II		Ansatz III	
Zeit (h)	Ct β -Actin	Ct CD163	Ct β -Actin	Ct CD163	Ct β -Actin	Ct CD163
0	14,14	22,43	16,35	24,79	15,39	22,96
1	14,86	22,02	16,73	23,24	16,98	22,88
3	16,11	21,29	18,16	22,96	15,99	20,56
5	16,34	19,95	18,32	22,66	15,49	18,44
7	15,51	18,74	17,31	20,66	14,99	17,31

MF ($7,8 \times 10^{-9}$ M)	Ansatz I		Ansatz II		Ansatz III	
Zeit (h)	Ct β -Actin	Ct CD163	Ct β -Actin	Ct CD163	Ct β -Actin	Ct CD163
0	16,01	23,13	19,99	26,11	15,49	24,08
1	22,83	28,62	15,99	20,62	13,24	21,01
3	15,98	20,31	17,75	20,31	15,04	19,61
5	15,87	19,78	18,08	18,68	15,60	19,59
7	16,08	18,38	18,16	18,88	18,54	22,10

Dexa ($1,8 \times 10^{-7}$ M)	Ansatz I		Ansatz II		Ansatz III	
Zeit (h)	Ct β -Actin	Ct CD163	Ct β -Actin	Ct CD163	Ct β -Actin	Ct CD163
0	15,34	22,86	17,43	24,34	21,37	26,55
1	15,26	22,04	17,29	23,96	20,84	24,47
3	16,92	22,91	16,89	21,68	21,27	25,02
5	15,78	21,25	17,05	20,30	21,56	24,08
7	14,70	18,99	16,56	18,99	20,80	23,03

2.3 Kalibrierdaten bei der *Real-time-PCR*

Kalibrierfunktion $y = ax + b$; a: Steigung; b: y-Achsenabschnitt; r: Korrelationskoeffizient

β -Actin ¹				β -Actin ²			
cDNA (ng)	FP (Ct)	MF (Ct)	Dexa (Ct)	cDNA (ng)	FP (Ct)	MF (Ct)	Dexa (Ct)
50	10,20	14,36	12,12	50	10,60	13,60	12,59
5	13,40	17,52	15,35	5	13,66	16,66	15,07
0,5	16,93	20,83	19,23	0,5	17,29	19,29	18,60
0,05	21,16	25,73	23,20	0,05	21,36	24,36	22,71
0,005	24,81	28,81	26,67	0,005	25,31	28,31	27,20
a	-3,711	-3,728	-3,687	a	-3,696	-3,7113	-3,695
b	13,934	16,734	15,548	b	13,603	17,739	15,620
r	0,998	0,993	0,993	r	0,998	0,996	0,998

¹ vor Stimulation; ² nach dreistündiger Stimulation.

CD163 ¹				CD163 ²			
cDNA (ng)	FP (Ct)	MF (Ct)	Dexa (Ct)	cDNA (ng)	FP (Ct)	MF (Ct)	Dexa (Ct)
50	22,25	26,90	21,24	50	17,78	21,78	24,00
5	25,23	30,23	24,74	5	21,38	25,38	26,42
0,5	28,89	33,89	27,89	0,5	24,98	28,98	30,16
0,05	33,33	38,01	32,33	0,05	28,80	32,80	34,53
0,005	36,81	\	35,81	0,005	32,52	36,52	38,49
a	-3,7231	-3,697	-3,672	a	-3,6898	-3,689	-3,709
b	23,719	28,562	22,896	b	19,557	23,557	25,158
r	0,998	0,998	0,998	r	0,999	0,999	0,995

¹ vor Stimulation; ² nach dreistündige Stimulation.

3 *In-vitro*-Untersuchungen zur Gewebbindung inhalativ angewendeter Glucocorticoide

Die folgenden Tabellen zeigen die ermittelten Konzentrationen der untersuchten Glucocorticoide im Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (pH 7,4 bei 37 °C) bzw. Humanplasma. Der Ersatz des entnommenen Puffer- bzw. Plasmavolumens durch frisches Medium wurde bei den nachfolgenden Daten berücksichtigt. Dargestellt sind Einzel- sowie Mittelwerte \pm mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA).

3.1 Einzelergebnisse zur Glucocorticoidbindung an menschliches Lungengewebe

FP	Gewebebindung (ng GC / mg Lungengewebe)				
Zeit (min)	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	Inkubation IV	Mittelwert \pm MA
5	2,11	1,79	1,99	2,30	2,09 \pm 0,11
10	3,01	2,65	3,00	2,66	2,83 \pm 0,17
20	3,15	3,02	3,24	2,97	3,10 \pm 0,10
30	3,40	3,02	3,24	2,90	3,14 \pm 0,18
45	3,19	3,28	3,06	3,14	3,17 \pm 0,07
60	3,40	3,30	3,00	3,24	3,23 \pm 0,12

MF	Gewebebindung (ng GC / mg Lungengewebe)				
Zeit (min)	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	Inkubation IV	Mittelwert \pm MA
5	2,72	2,11	1,60	2,15	2,15 \pm 0,29
10	3,20	2,48	2,62	2,46	2,69 \pm 0,26
20	3,60	2,87	3,49	2,66	3,16 \pm 0,39
30	3,61	3,19	3,28	2,98	3,27 \pm 0,18
45	3,50	3,59	3,44	3,20	3,43 \pm 0,12
60	4,33	3,83	3,44	3,31	3,73 \pm 0,35

Gewebebindung (ng GC / mg Lungengewebe)				
Zeit (min)	Cicle PC		Cicle AP	
	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation I	Inkubation II
5	1,92	1,96	2,69	1,90
10	2,43	2,73	3,15	2,73
20	3,42	3,16	3,68	3,30
30	3,71	3,59	3,78	3,61
45	4,33	3,98	4,04	3,61
60	4,75	4,16	4,07	3,66

3.2 Einzelergebnisse der Freisetzung der untersuchten Glucocorticoide aus Lungengewebe in Humanplasma

FP	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	Inkubation IV	Mittelwert ± MA
geb. an Lunge (ng/g)	3520,6	3428,5	3305,8	3348,8	3400,9 ± 73,62
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / ml Plasma)				
3	78,43	91,82	85,82	80,62	84,17 ± 4,65
6	94,94	104,66	120,66	101,69	105,49 ± 7,59
90	116,77	137,67	142,67	123,69	130,20 ± 9,97
15	138,25	146,06	159,06	141,67	146,26 ± 6,40
25	139,08	159,73	172,73	148,86	155,10 ± 11,13
40	147,89	167,63	180,63	152,68	162,21 ± 11,92
60	157,92	208,64	198,64	166,57	182,94 ± 20,70

MF	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	Inkubation IV	Mittelwert ± MA
geb. an Lunge (ng/g)	3651,7	3854,4	3416,8	3668,4	3647,8 ± 115,5
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / ml Plasma)				
3	163,51	200,97	168,83	97,49	157,7 ± 30,10
6	223,00	254,35	225,25	142,32	211,2 ± 35,45
90	256,34	315,59	253,84	197,64	255,9 ± 30,11
15	258,16	307,37	282,94	222,03	267,6 ± 27,53
25	282,32	321,87	303,26	240,08	286,9 ± 25,68
40	294,27	335,71	305,47	248,28	295,9 ± 24,65
60	312,96	336,03	322,93	262,11	308,5 ± 23,19

	Cicle PC		Cicle AP	
	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation I	Inkubation II
geb. an Lunge (ng/g)	3678,0	3423,3	4548,6	4257,9
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / ml Plasma)			
3	137,5	111,5	174,1	186,7
6	163,8	145,0	221,6	217,7
9	167,8	155,3	229,7	230,5
15	195,5	162,0	253,9	256,8
25	207,4	181,1	250,2	273,6
40	224,8	195,2	290,7	291,5
60	222,4	210,3	354,0	302,3

4 Stabilität der untersuchten Glucocorticoide in humanen Spezimen und Puffer

4.1 Einzelergebnisse der Stabilität in Lungenhomogenat mit und ohne Zusatz von Esteraseinhibitor (Dichlorvos, DCV)

MF		Stabilität (ng GC / ml Puffer)			
		Lungenhomogenat I (LH I)		Lungenhomogenat II (LH II)	
Zeit (h)	MF mit DCV (ng/ml)	MF ohne DCV (ng/ml)	MF mit DCV (ng/ml)	MF ohne DCV (ng/ml)	MF ohne DCV (ng/ml)
0	300	300	300	300	300
1	195	207	221	253	253
2	125	117	155	164	164
4	115	106	138	142	142
6	95	76	114	94	94
8	82	80	98	91	91
10	74	69	91	84	84
24	62	67	84	69	69

BDP		Stabilität (ng GC / ml Puffer)						
		Lungenhomogenat I (LH I)			Lungenhomogenat II (LH II)			
Zeit (h)	BDP mit DCV (ng/ml)	17-BMP mit DCV (ng/ml)	BDP ohne DCV (ng/ml)	17-BMP ohne DCV (ng/ml)	BDP mit DCV (ng/ml)	17-BMP mit DCV (ng/ml)	BDP ohne DCV (ng/ml)	17-BMP ohne DCV (ng/ml)
0	309	-	307	-	302	-	289	-
1	273	n.n	185	114	281	n.n	196	107
2	257	n.n	135	142	263	n.n	150	151
4	241	n.n	114	189	238	n.n	137	201
6	217	n.n	75	165	221	n.n	107	184
8	201	13	69	134	207	21	86	145
10	188	45	61	99	176	57	73	110
24	135	32	20	32	146	43	34	46

n.n; nicht nachweisbar

4.2 Einzelergebnisse der Stabilität in Humanplasma mit und ohne Zusatz von Esteraseinhibitor (Dichlorvos, DCV)

MF		Stabilität (ng GC / ml Plasma)			
		Inkubation I mit DCV		Inkubation I ohne DCV	
Zeit (h)	MF (ng/ml)	9,11-Epoxy-MF (ng/ml)	MF (ng/ml)	9,11-Epoxy-MF (ng/ml)	
0	300	-	300	-	
1	296	n.n	295	n.n	
2	284	16	285	18	
4	266	18	264	24	
6	244	11	240	29	
8	239	21	210	37	
10	240	24	173	40	
24	223	26	126	34	

n.n; nicht nachweisbar

MF		Stabilität (ng GC / ml Plasma)			
		Inkubation II mit DCV		Inkubation II ohne DCV	
Zeit (h)	MF (ng/ml)	9,11-Epoxy-MF (ng/ml)	MF (ng/ml)	9,11-Epoxy-MF (ng/ml)	
0	300	-	300	-	
1	264	n.n	284	n.n	
2	278	11	274	15	
4	257	21	265	27	
6	231	42	231	33	
8	218	34	192	41	
10	198	24	184	46	
24	187	35	158	37	

n.n; nicht nachweisbar

MF		Stabilität (ng GC / ml Plasma)			
		Inkubation III mit DCV		Inkubation III ohne DCV	
Zeit (h)	MF (ng/ml)	9,11-Epoxy-MF (ng/ml)	MF (ng/ml)	9,11-Epoxy-MF (ng/ml)	
0	300	-	300	-	
1	271	n.n	279	n.n	
2	261	13	261	22	
4	243	28	254	41	
6	215	34	225	34	
8	208	29	219	35	
10	231	32	194	39	
24	201	37	161	27	

n.n; nicht nachweisbar

4.3 Einzelergebnisse der Stabilität von Mometasonfuroat (MF), Beclomethasondipropionat (BDP) und Dexamethason (Dexa) in Phosphat-Puffer

Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 6).

MF	pH 5,4		pH 7,4		pH 9,0	
Zeit (h)	MF (ng/ml)	9,11-Epoxy-MF (ng/ml)	MF (ng/ml)	9,11-Epoxy-MF (ng/ml)	MF (ng/ml)	9,11-Epoxy-MF (ng/ml)
0	292,4 \pm 18,5	-	304,8 \pm 10,4	-	281,4 \pm 15,0	30,4 \pm 7,7
1	298,2 \pm 9,9	n.n	275,7 \pm 16,6	7,1 \pm 13,2	65,2 \pm 24,0	261,9 \pm 26,2
2	290,9 \pm 10,8	n.n	267,3 \pm 19,4	28,2 \pm 5,5	9,0 \pm 19,3	277,1 \pm 12,1
3	278,8 \pm 7,4	n.n	244,3 \pm 16,8	43,9 \pm 4,6	11,8 \pm 9,8	282,6 \pm 27,3
4	282,0 \pm 8,7	n.n	233,7 \pm 9,3	59,3 \pm 10,0	n.n	245,8 \pm 25,1
6	272,4 \pm 11,7	n.n	201,7 \pm 25,8	98,3 \pm 20,8	n.n	206,5 \pm 46,9
12	264,4 \pm 6,8	n.n	141,3 \pm 18,5	149,5 \pm 11,0	n.n	136,4 \pm 30,3
24	260,0 \pm 14,25	n.n	88,0 \pm 8,7	227,9 \pm 17,1	n.n	67,3 \pm 19,0

n.n; nicht nachweisbar

BDP	pH 5,4		pH 7,4		pH 9,0	
Zeit (h)	BDP (ng/ml)	9,11-Epoxy-BDP (ng/ml)	BDP (ng/ml)	9,11-Epoxy-BDP (ng/ml)	BDP (ng/ml)	9,11-Epoxy-BDP (ng/ml)
0	302,2 ± 18,9	-	309,7 ± 25,0	-	297,3 ± 5,9	-
1	296,1 ± 12,4	n.n	295,1 ± 16,5	n.n	259,7 ± 18,1	13,8 ± 6,6
2	287,7 ± 18,3	n.n	286,7 ± 12,5	n.n	202,4 ± 10,9	95,5 ± 6,2
3	288,8 ± 10,2	n.n	287,8 ± 18,6	6,5 ± 6,9	189,9 ± 4,2	155,2 ± 7,9
4	274,9 ± 23,4	n.n	264,6 ± 19,0	13,2 ± 8,6	165,8 ± 7,1	204,2 ± 9,8
6	260,9 ± 16,4	n.n	252,2 ± 25,8	24,6 ± 10,8	110,0 ± 6,4	218,9 ± 12,7
12	250,7 ± 11,9	n.n	206,3 ± 18,6	54,3 ± 6,4	47,9 ± 4,9	199,0 ± 39,5
24	256,4 ± 20,8	n.n	174,5 ± 20,7	92,2 ± 6,1	20,2 ± 2,2	192,2 ± 35,4

n.n; nicht nachweisbar

Dexa	pH 5,4	pH 7,4	pH 9,0
Zeit (h)	Dexa (ng/ml)	Dexa (ng/ml)	Dexa (ng/ml)
0	298,2 ± 16,9	308,9 ± 9,4	305,7 ± 19,8
2	297,7 ± 15,3	294,0 ± 15,7	287,4 ± 18,3
6	275,9 ± 11,4	266,6 ± 16,7	266,5 ± 16,7
24	269,4 ± 16,8	262,0 ± 14,3	240,5 ± 19,6

4.4 Einzelergebnisse zur Wiederfindung des 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats in humanem Plasma und Lungenhomogenat

Die Anfangskonzentration betrug bei allen Versuchen 300 ng/ml.

Plasma	9,11-Epoxy-MF Konzentration (ng/ml)					Mittelwert ± sdv
	I	II	III	IV	V	
Zeit (h)						
0,25	302,4	293,7	300,3	305,5	291,0	298,6 ± 6,1
0,5	304,7	305,4	292,9	301,3	288,9	298,6 ± 7,3
1,0	301,8	300,1	304,52	298,0	281,3	297,2 ± 9,1
1,5	295,1	297,9	293,2	292,9	290,5	293,9 ± 2,7
2,0	285,5	290,2	283,3	295,8	284,0	287,8 ± 5,2
2,5	279,5	273,7	273,1	282,4	281,2	278,0 ± 4,3
3,0	268,7	275,1	258,3	272,6	278,1	270,6 ± 7,7

Lungenhomogenat	9,11-Epoxy-MF Konzentration im Überstand(ng/ml)			Mittelwert ± sdv
	I	II	III	
Zeit (h)				
0,25	294,9	298,8	293,3	295,7 ± 2,8
0,5	290,3	282,9	294,0	289,1 ± 5,6
1,0	289,2	284,2	292,9	288,8 ± 4,4
1,5	283,8	280,6	269,8	278,1 ± 7,3
2,0	280,0	268,5	281,0	276,5 ± 6,9
2,5	255,2	255,0	272,4	260,8 ± 8,9
3,0	238,8	248,7	252,2	246,5 ± 5,9

Krebs-Ringer-HEPES- Puffer (pH 7,4)	9,11-Epoxy-MF Konzentration (ng/ml)			Mittelwert ± sdv
	I	II	III	
Zeit (h)				
0,25	304,7	309,7	304,7	306,4 ± 2,8
0,5	303,3	296,5	292,6	297,5 ± 5,4
1,0	299,8	309,0	297,1	301,9 ± 6,2
1,5	296,4	303,1	290,0	296,5 ± 6,5
2,0	302,1	295,1	294,6	297,2 ± 4,2
2,5	297,7	294,3	296,5	296,1 ± 1,7
3,0	300,4	295,2	294,7	296,8 ± 3,2

4.5 Pharmakokinetische und Pharmakodynamische Parameter ausgewählter Glucocorticoide (GC)

GC	F [%]		PB [%]	Cl _{total} [l/h]	Vd _{ss} [l/Kg]	GB [%]	Elimination t _{1/2} [h]		RRA
	oral	pulmonal					i.v.	inhalativ	
MF	< 1 [174]	–	98-99 [174]	53 [177]	4,3 [177]	16 *	5,8 [175]	–	2244 *
FP	< 1 [243]	16 – 30 [165]	90-99 [174]	69 [46]	4,5 [34]	46 *	7,8 [46]	10-14 [178]	1800 [55]
BDP	40 [169]	–	87 [34]	150 [169]	0,26 [169]	53 [157]	0,5 [169]	–	53 [55]
17-BMP	25 [169]	50 [169]	–	120 [169]	5,6 [169]	70 [157]	2,7 [169]	6,5 [34]	1345 [55]
Cicle PC	< 1 [167]	–	> 99 [176]	140 [49]	–	39 *	0,7 [49]	–	12 [78]
Cicle AP	< 1 [167]	50 [167]	> 99 [176]	396 ^a [166]	15,4 [166]	29 *	3,5 [167]	6,7 [42]	1200 [78]
Bud	11 [244]	–	88 [34]	84 [244]	2,6 [35]	37 [157]	2,7 [244]	3,3 [244]	935 [74]
Fluni	20 [215]	39 [215]	80 [245]	58 [215]	1,3 [245]	58 [157]	1,6 [245]	–	180 [55]
TCA	23 [246]	22 [246]	71 [247]	37 [246]	1,4 [246]	–	2,4 [246]	–	361 [55]

F: Bioverfügbarkeit; PB: Proteinbindung (Anteil gebunden); Cl_{total}: gesamt Clearance; Vd_{ss}: Verteilungsvolumen ermittelt im steady state; GB: Gewebbindung (Anteil des am Gewebe verbleibenden GC nach Inkubation in Plasma); RRA: relative Rezeptoraffinität mit Dexamethason als Referenzsubstanz (RRA_{Dex} = 100); ^a Ausgehend aus der gesamten applizierten Dosis und ohne Berücksichtigung der pulmonalen Bioverfügbarkeit; Daten aus eigenen Untersuchungen sind mit (*) gekennzeichnet.

E. Zusammenfassung

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden vielfältige pharmakokinetische bzw. molekularpharmakodynamische Aspekte topisch angewandter Glucocorticoide untersucht und deren klinische Relevanz diskutiert.

Um die Potenz der Glucocorticoide vergleichen zu können, wurden deren relative Rezeptoraffinitäten zum humanen Glucocorticoidrezeptor mit Dexamethason als Referenzsubstanz bestimmt. Hierzu wurden Studien zur Kinetik der Assoziation und Dissoziation oder Kompetitionstests durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Glucocorticoide der neueren Generation wie Mometasonfuroat und Fluticasonpropionat sich in ihrer Assoziationskinetik unterschieden, während die Dissoziationskinetik vergleichbar war.

Die Erfassung der Bindungskinetik ermöglicht die Berechnung relativer Rezeptoraffinitäten und erlaubt somit die Einordnung neuer Glucocorticoide hinsichtlich ihrer Wirkstärke in Relation zu anderen Vertretern dieser Substanzklasse. Damit wurde erstmals für Mometasonfuroat eine relative Rezeptoraffinität berechnet, die einen unmittelbaren Vergleich mit weiteren in der Literatur publizierten Daten anderer Glucocorticoide erlaubte. Diese relative Rezeptoraffinität ist die höchste aller soweit bekannten inhalativen Glucocorticoide.

In Kompetitionversuchen wurde erstmals gezeigt, dass die *in vitro* nachgewiesenen Metabolite des Mometasonfuroats eine signifikante Rezeptoraffinität aufwiesen. Die Potenz dieser Metabolite ist dabei vergleichbar mit der von anderen inhalativ angewandten Corticosteroiden, wie Flunisolid und Triamcinolonacetonid. Mometasonfuroat konnte damit als das einzige inhalative Glucocorticoid charakterisiert werden, dessen Metabolite affiner als Dexamethason sind.

Weiterführend zu den Erkenntnissen zur Rezeptorkinetik des Mometasonfuroats und Fluticasonpropionats wurde erstmals die vergleichende Kinetik der mRNA-Induktion auf zellulärer Ebene untersucht. Diese wurde am Beispiel des Glucocorticoid-regulierten CD163 in humanen Monocyten verfolgt. Es wurde eine Methode adaptiert, die schließlich eine Quantifizierung der CD163-mRNA mittels *Real-time*-PCR ermöglichte. Es zeigte sich, dass die Anzahl der neu gebildeten mRNA-Kopien direkt von der Rezeptoraffinität und der Konzentration des Mometasonfuroats und Fluticasonpropionats abhängig war. Die

unterschiedliche Assoziationsgeschwindigkeit der beiden Glucocorticoide spiegelte sich jedoch nicht in einer schnelleren Induktion der CD163-mRNA wider.

Neben der spezifischen Rezeptorbindung werden Glucocorticoide auch unspezifisch an Gewebe gebunden. Dies ist bei topisch angewandten Glucocorticoiden ein durchaus erwünschter Effekt, da die Substanz möglichst lang im therapeutischen Zielgewebe verbleiben soll, um einerseits ein mögliches Depot für eine verlängerten Wirkung zu stellen andererseits den Eintritt hoher Konzentrationen in die systemischen Zirkulation mit der Gefahr des Auftretens von Nebenwirkungen zu vermeiden. Es wurden erstmals umfassende *In-vitro*-Versuche zur Bindung des Mometasonfuroats, Ciclesonids und seines aktiven Metaboliten an humanes Lungengewebe durchgeführt. Die Adsorption der Glucocorticoide an humanes Lungengewebe verlief schnell und war vergleichbar hoch. Die wesentlichen Unterschiede zwischen den Substanzen beruhten dabei auf den nach Equilibrierung mit Plasma im Gewebe verbleibenden Konzentrationen. Es stellte sich heraus, dass Mometasonfuroat im Vergleich zu Fluticasonpropionat, Ciclesonid und dessen aktivem Metabolit Desisobutyryl-Ciclesonid die niedrigste Gewebeaffinität aufwies (Fluticasonpropionat > Ciclesonid > Desisobutyryl-Ciclesonid > Mometasonfuroat). Es konnte eine gute Übereinstimmung der *in vitro* Bindungsverhältnisse an Lungengewebe mit klinischen *In-vivo*-Daten aufgezeigt werden.

Aus den zuvor in der Literatur beschriebenen Untersuchungen ließen sich zwar Hinweise auf die hepatische Metabolisierung des Mometasonfuroats entnehmen, doch Ergebnisse einer möglichen Metabolisierung bzw. der Stabilität in humanem Spezimen von therapeutischer Relevanz lagen soweit nicht vor. Somit wurde die Stabilität dieses Glucocorticoids im humanen Lungengewebe und Plasma systematisch untersucht. Dabei wurde eine unbekannte Substanz detektiert, die mittels HPLC-MS/MS, ¹H- und ¹³C-NMR eindeutig als das 9,11-Epoxid des Mometasonfuroats identifiziert wurde. In weiteren Untersuchungen konnte die Bildung des 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats als pH-abhängig und nicht enzymatisch katalysiert charakterisiert werden. Kompetitionsversuche am humanen Glucocorticoidrezeptor zeigten, dass die relative Rezeptoraffinität des 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats hoch war und wiederum vergleichbar mit der Bindungsaffinität des Triamcinolonacetonid oder Flunisolid.

Voruntersuchungen wiesen zudem auf eine kovalente Bindung des 9,11-Epoxy-Mometasonfuroats an Plasmaproteine hin, die aufgrund der reaktiven Epoxidstruktur plausibel erscheint. Die Bildung dieses Epoxids sowie der hepatisch gebildeten Metabolite hoher Affinität

leisten einen Beitrag zur Klärung des Widerspruchs beobachteter unerwünschter systemischer Wirkungen trotz der postulierten geringen pulmonalen Bioverfügbarkeit des Mometasonfuroats.

Das Auflösungsverhalten inhalativ angewandter Glucocorticoide in Bronchialflüssigkeit spielt eine entscheidende Rolle für deren weitere Verteilungskinetik und Wirkungen. Es wurde erstmals eine Methode entwickelt, mit der neben Morphologie und Größe der Partikel aus kommerziell erhältlichen Arzneiformen auch das Auflösungsverhalten in Bronchialsekret untersucht werden konnte. Durch den Einsatz der Raster-Elektronen-Mikroskopie wurde eine maximale Sensitivität zur Beobachtung der Partikelveränderungen bis zu einer Größe von 0,5 µm gewährleistet. Am Beispiel des Beclomethasondipropionats wurde gezeigt, dass die Arzneistoffpartikel aus verschiedenen Dosieraerosolen nach einer raschen Auflösung rekristallisieren. Erst diese Rekristallisation ist offenbar die Grundlage für eine nachfolgende langsame Auflösung und Umverteilung des Arzneistoffs ins Plasmakompartiment. Da diese neuartigen Beobachtungen in vollkommener Übereinstimmung mit pharmakokinetischen Daten nach Inhalation dieses Glucocorticoids stehen, darf angenommen werden, dass sich vergleichbare Vorgänge *in vivo* abspielen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass Glucocorticoide der neuen Generation nicht zwangsläufig eine Annäherung an das „ideale“ inhalative Glucocorticoid darstellen müssen. Am Beispiel des Mometasonfuroats konnte gezeigt werden, dass der positiven Eigenschaft einer hohen relativen Rezeptoraffinität die Instabilität dieses Glucocorticoids in Lungengewebe und Plasma entgegensteht. Die Tatsache, dass sein Degradationsprodukt 9,11-Epoxy-Mometasonfuroat und einige seiner hepatischen Metabolite eine signifikant hohe Rezeptoraffinität zeigen, kann als ein bedeutender Nachteil des Mometasonfuroats angesehen werden. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erfüllt Mometasonfuroat somit nicht die Voraussetzungen eines „idealen“ inhalativen Glucocorticoids.

Summary

In the present thesis, various pharmacokinetic and molecularpharmacodynamic aspects of topical glucocorticoids were investigated and their clinical relevance was discussed.

To be able to compare the potency of glucocorticoids, their relative receptor affinities to the human glucocorticoid receptor was determined with reference to dexamethasone. This was achieved by two different methods: by kinetic studies of association and dissociation or by competition tests. The assays revealed that newer glucocorticoids like mometasone furoate and fluticasone propionate differed in their association kinetics, while they displayed comparable dissociation kinetics.

The assessment of binding kinetics allows the calculation of relative receptor affinities and thereby facilitates the ranking of the potency of newer glucocorticosteroids with respect to other compounds of that class. For the first time a relative receptor affinity of mometasone furoate was calculated that could be directly compared with published data of other glucocorticoids. This relative receptor affinity is the highest among all known glucocorticoids so far.

Competition assays revealed the novel finding that metabolites of mometasone furoate that had been detected *in vitro* have a significant receptor affinity. The potency of these metabolites is comparable with inhaled glucocorticoids like flunisolide and triamcinolone acetonide. Thus, mometasone furoate was characterized as the only inhaled glucocorticoid with metabolites more potent than dexamethasone.

In extension to insights into receptor kinetics of mometasone furoate and fluticasone propionate, comparative kinetics of mRNA-induction were investigated on cellular level for the first time. For this purpose CD163 served as an example of a glucocorticoid-regulated gene in human monocytes. A method was adapted that ultimately allowed the quantification of CD163-mRNA via *real-time-PCR*. It was shown that the amount of newly formed mRNA-copies was directly related to receptor affinity and concentration of mometasone furoate and fluticasone propionate. The differences in association velocity did not result in diverse induction rate of CD163-mRNA.

Besides specific receptor binding, glucocorticoids are bound nonspecifically to tissues as well. For topically applied corticosteroids this is a desired effect as the compound should be retained in the therapeutically relevant tissue as long as possible in order to serve as a potential depot for sustained effects and to avoid release of high concentrations into the systemic circulation that may predispose to adverse effects. For the first time, extensive *in-vitro* experiments about binding of mometasone furoate, ciclesonide and its active metabolite to human lung tissue were conducted. The adsorption of glucocorticoids to human lung tissue proceeded quickly and was comparably high. Substantial differences amongst compounds were due to different concentrations remaining in tissue after equilibration with plasma. It emerged that mometasone furoate had the lowest tissue affinity in comparison to fluticasone propionate, ciclesonide and its active metabolite desisobutyryl-ciclesonide (fluticasone propionate > ciclesonide > desisobutyryl-ciclesonide > mometasone furoate). A good agreement of *in vitro* binding to lung tissue with *in vivo* clinical studies was shown.

Though information on hepatic metabolism of mometasone furoate could be found in published literature data about possible metabolism or stability in human specimen of therapeutic relevance were lacking so far. Consequently, the stability of this glucocorticoid in human lung tissue and plasma was investigated systematically. Thereby, an unknown substance was detected that was unambiguously identified as 9,11-epoxide of mometasone furoate via HPLC-MS/MS, ¹H- and ¹³C-NMR. In further experiments, the formation of 9,11-epoxide of mometasone furoate was characterized to be pH-dependent and not enzymatically catalyzed. Competition assays revealed a high relative receptor affinity of 9,11-epoxy-mometasone furoate that was again comparable to binding affinity of triamcinolone acetonide or flunisolide.

Preliminary investigations indicated a covalent binding of 9,11-epoxy-mometasone furoate to plasma proteins, which seems reasonable in the view of the reactive epoxide structure. The formation of the epoxide and of hepatic metabolites with high affinity contributes to resolve the contradiction between observed unwanted systemic effects despite a postulated low pulmonary bioavailability of mometasone furoate.

The dissolution characteristics of glucocorticoids in bronchial fluid play a pivotal role for their distribution and effects. For the first time, a method was developed that allows assessing morphology and size of drug particles from commercially available devices as well as monitoring the particle dissolution in bronchial fluid. Utilizing scanning electron microscopy

maximal sensitivity for following changes of particles down to a size of 0.5 μm was ensured. With beclomethasone dipropionate as an example, it was shown that particles of different pressurized metered dose inhalers initially dissolve quickly and then recrystallize. This process seems to be the basis for the subsequent slow dissolution and redistribution of the compound into the plasma compartment. As these novel observations are in complete agreement with pharmacokinetic data after inhalation of this glucocorticoid, it can be assumed that comparable processes take place *in vivo*.

It can be concluded that glucocorticoids of the new generation do not necessarily approximate the “ideal” inhalative glucocorticoid. The example of mometasone furoate revealed that its positive feature of high relative receptor affinity is opposed by its instability in lung tissue and plasma. The fact that its degradation product 9,11-epoxy-mometasone furoate and two of its hepatic metabolites show a high receptor affinity can be regarded as a significant disadvantage. According to the results presented in this thesis, mometasone furoate does not fulfill the prerequisites of an “ideal” glucocorticoid.

F. Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

17-BMP	Beclomethason-17-monopropionat
21-BMP	Beclomethason-21-monopropionat
6 β -OH-MF	6 β -Hydroxy-Mometason-17-(2-furoat)
9,11-Epoxy-MF	Mometason-17-(2-furoat)-9,11-epoxid
Abb.	Abbildung
Amci	Amcinonid
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchonic acid</i>)
BDP	Beclomethason-17,21-dipropionat
BOH	Beclomethason
BSA	bovines Serumalbumin
Bud	Budesonid
cDNA	komplementär DNA (<i>complementary bzw. copy DNA</i>)
Cicle AP	Ciclesonide active principle
Cicle PC	Ciclesonide parent compound
Cl	Clearance
cpm	Count per minute
Ct	Schwellenwertzyklus (<i>threshold cycle</i>)
Dexa	Dexamethason
DCV	Dichlorvos (Dimethyl-2-2-dichlorvinylphosphat)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dpm	desidegration per minute
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>doble strand DNA</i>)
DTT	DL-Dithiothreitol
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
F	Bioverfügbarkeit
Fluni	Flunisolid
FP	Fluticason-17-propionat
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
GB	Gewebebindung
GC	Glucocorticoid(e)
Gl.	Gleichung
h	Stunden
hGR	humaner Glucocorticoidrezeptor
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>High performance liquid chromatography</i>)
k'	Kapazitätsfaktor
k _{Ass}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
K _D	Gleichgewichtsdissoziationsgeschwindigkeitskonstante
k _{Diss}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
M	Mometason

<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis
MA	mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MF	Mometason-17-(2-furoat)
min	Minuten
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
PB	Proteinbindung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
r	Korrelationskoeffizient
RRA	relative Rezeptoraffinität
RT	reverse Transkription
R _t	Retentionszeit
s	Sekunden
sdv	Standardabweichung
ssDNA	Einzelstrang DNA (<i>single strand DNA</i>)
SYBR [®] Green I	[2-[<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -propylamino]-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylliden]-1-phenyl-quinolinium] ⁺ -Ion
T	Teil(e)
t	Zeit
t _{1/2}	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TLC	Dünnschichtchromatographie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V.K.	Variationskoeffizient
Vd	Verteilungsvolumen

G. Literaturverzeichnis

1. Kelly, H.W., *Establishing a therapeutic index for the inhaled corticosteroids: part I. Pharmacokinetic/pharmacodynamic comparison of the inhaled corticosteroids*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(4 Pt 2): p. S36-51.
2. Gysler, A., et al., *Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin*. Pharm Res, 1999. **16**(9): p. 1386-91.
3. Hollenberg, S.M., et al., *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature, 1985. **318**(6047): p. 635-41.
4. Reichardt, H.M., et al., *Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo*. Z Rheumatol, 2000. **59 Suppl 2**: p. II/1-5.
5. Hollenberg, S.M. and R.M. Evans, *Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor*. Cell, 1988. **55**(5): p. 899-906.
6. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
7. Li, Y., et al., *Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1*. Mol Cell, 2005. **17**(4): p. 491-502.
8. Steinmetz, A.C., J.P. Renaud, and D. Moras, *Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2001. **30**: p. 329-59.
9. Bledsoe, R.K., et al., *Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition*. Cell, 2002. **110**(1): p. 93-105.
10. LaCasse, E.C. and Y.A. Lefebvre, *Nuclear and nuclear envelope binding proteins of the glucocorticoid receptor nuclear localization peptide identified by crosslinking*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. **40**(1-3): p. 279-85.
11. Renaud, J.P. and D. Moras, *Structural studies on nuclear receptors*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(12): p. 1748-69.
12. Bourguet, W., et al., *Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 289-98.

13. Rochel, N., et al., *The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand*. Mol Cell, 2000. **5**(1): p. 173-9.
14. Wagner, R.L., et al., *A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 690-7.
15. Nolte, R.T., et al., *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Nature, 1998. **395**(6698): p. 137-43.
16. Sack, J.S., et al., *Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 4904-9.
17. Brzozowski, A.M., et al., *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 753-8.
18. Hellal-Levy, C., et al., *Crucial role of the H11-H12 loop in stabilizing the active conformation of the human mineralocorticoid receptor*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(8): p. 1210-21.
19. Williams, S.P. and P.B. Sigler, *Atomic structure of progesterone complexed with its receptor*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 392-6.
20. Allan, G.F., et al., *Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 11750-4.
21. van der Velden, V.H., *Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma*. Mediators Inflamm, 1998. **7**(4): p. 229-37.
22. Schaaf, M.J., L.J. Lewis-Tuffin, and J.A. Cidlowski, *Ligand-selective targeting of the glucocorticoid receptor to nuclear subdomains is associated with decreased receptor mobility*. Mol Endocrinol, 2005.
23. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones*. Endocr Rev, 1997. **18**(3): p. 306-60.
24. Bamberger, C.M., H.M. Schulte, and G.P. Chrousos, *Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids*. Endocr Rev, 1996. **17**(3): p. 245-61.
25. Encio, I.J. and S.D. Detera-Wadleigh, *The genomic structure of the human glucocorticoid receptor*. J Biol Chem, 1991. **266**(11): p. 7182-8.

26. Savory, J.G., et al., *Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 781-93.
27. Barnes, P.J., *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms*. Clin Sci (Lond), 1998. **94**(6): p. 557-72.
28. Umland, S.P., R.P. Schleimer, and S.L. Johnston, *Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma*. Pulm Pharmacol Ther, 2002. **15**(1): p. 35-50.
29. Thompson, E.B., et al., *Mechanisms of glucocorticoid function in human leukemic cells: analysis of receptor gene mutants of the activation-labile type using the covalent affinity ligand dexamethasone mesylate*. J Steroid Biochem, 1988. **30**(1-6): p. 63-70.
30. Ojasoo, T., et al., *Binding of steroids to the progestin and glucocorticoid receptors analyzed by correspondence analysis*. J Med Chem, 1988. **31**(6): p. 1160-9.
31. Shroot, B., J.C. Caron, and M. Ponc, *Glucocorticoid specific binding: structure-activity relationships*. Br J Dermatol, 1982. **107**(Suppl 23): p. 30-4.
32. Buchwald, P. and N. Bodor, *Soft glucocorticoid design: structural elements and physicochemical parameters determining receptor-binding affinity*. Pharmazie, 2004. **59**(5): p. 396-404.
33. Dahlberg, E., et al., *Correlation between chemical structure, receptor binding, and biological activity of some novel, highly active, 16 alpha, 17 alpha-acetal-substituted glucocorticoids*. Mol Pharmacol, 1984. **25**(1): p. 70-8.
34. Derendorf, H., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**(4 Pt 2): p. S440-6.
35. Rohatagi, S., et al., *Risk-benefit value of inhaled glucocorticoids: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective*. J Clin Pharmacol, 2004. **44**(1): p. 37-47.
36. Leach, C.L., et al., *Lung deposition of hydrofluoroalkane-134a beclomethasone is greater than that of chlorofluorocarbon fluticasone and chlorofluorocarbon beclomethasone : a cross-over study in healthy volunteers*. Chest, 2002. **122**(2): p. 510-6.
37. Kircher, W., *Arzneiformen und Applikationssysteme, in Der Asthma-Patient in der Apotheke*, E. Martin, Editor. 2003, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart. p. 109.
38. Woodcock, A., D. Acerbi, and G. Poli, *Modulite technology: pharmacodynamic and pharmacokinetic implications*. Respir Med, 2002. **96 Suppl D**: p. S9-15.

39. Rote Liste[®], in *Rote Liste*. 2005, Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH: Aulendorf.
40. Ganderton, D., et al., *Modulite: a means of designing the aerosols generated by pressurized metered dose inhalers*. *Respir Med*, 2002. **96 Suppl D**: p. S3-8.
41. Bateman, E.D., et al., *Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **170**(8): p. 836-44.
42. Allen, D.B., et al., *Inhaled corticosteroids: past lessons and future issues*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **112**(Suppl 3): p. S1-40.
43. Högger, P., *Dose response and therapeutic index of inhaled corticosteroids in asthma*. *Curr Opin Pulm Med*, 2003. **9**(1): p. 1-8.
44. Thorsson L, T.F., Korn S, Carlshaf A, Edsbäcker S, Wouters EFM, *Formation of fatty acid conjugates of budesonide in human lung tissue in vivo*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(A404).
45. O'Connell, E.J., *Review of the unique properties of budesonide*. *Clin Ther*, 2003. **25**(Suppl C): p. 42-60.
46. Mackie, A.E., et al., *Pharmacokinetics of intravenous fluticasone propionate in healthy subjects*. *Br J Clin Pharmacol*, 1996. **41**(6): p. 539-42.
47. Rohdewald, P.J., *Comparison of clinical efficacy of inhaled glucocorticoids*. *Arzneimittelforschung*, 1998. **48**(8): p. 789-96.
48. Rohatagi, S., H. Derendorf, and K. Zech, *Risk-benefit value of inhaled corticosteroids: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective*. *Chest*, 2003. **123**(3 Suppl): p. 430S-1S.
49. Derendorf, H., *Relevant pharmacokinetic parameters for determining efficacy and safety in inhaled corticosteroids*. *Eur Respir Rev*, 2004. **13**(90): p. 62-65.
50. Bojar, H., et al., *Detection and partial characterization of glucocorticoid-binding components in hepatic metastases of human bronchial and gastric carcinoid tumors*. *Hepato-gastroenterology*, 1980. **27**(3): p. 183-8.
51. Golikov, P.P., *Specific glucocorticoid receptors of human muscle cytosol*. *Neurosci Behav Physiol*, 1986. **16**(3): p. 254-7.
52. Hochhaus, G., et al., *Identification of glucocorticoid receptors in normal and neoplastic adult human lung*. *Res Exp Med (Berl)*, 1983. **182**(1): p. 71-8.
53. Rohdewald, P., et al., *Glucocorticoide Rezeptoren in den Atemwegen*. In: (Ed.): *Bochumer Treff 1984*. Gedon & Reuss, München, 1985: p. 223-242.

54. Rohdewald, P., H.W. Mollman, and G. Hochhaus, *Affinities of glucocorticoids for glucocorticoid receptors in the human lung*. Agents Actions, 1986. **17**(3-4): p. 290-1.
55. Würthwein, G., Rehder, S., Rohdewald, P., *Lipophilicity and receptor affinity of glucocorticoids*. Pharm. Ztg. Wiss., 1992. **137**: p. 161-7.
56. Högger, P. and P. Rohdewald, *Binding kinetics of fluticasone propionate to the human glucocorticoid receptor*. Steroids, 1994. **59**(10): p. 597-602.
57. Hochhaus, G., *Bindungsaffinitäten handelsüblicher Glucocorticoiden zum Glucocorticoid Rezeptor der menschlichen Lunge*. Dissertation Universität Münster, 1984.
58. Eliard, P.H. and G.G. Rousseau, *Thermodynamics of steroid binding to the human glucocorticoid receptor*. Biochem J, 1984. **218**(2): p. 395-404.
59. Höflinger, M., M. and A.G. Beck-Sickinger, *Receptor-Ligand Interaction*, in *Protein-Ligand Interactions From Molecular Recognition to Drug Design*, H.-J.B.a.G. Schneider, Editor. 2003, Wiley-VCH Verlag: Weinheim. p. pp 107-135.
60. Baxter, J.D. and G.M. Tomkins, *Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(5): p. 932-7.
61. Aranyi, P., *Dependence of rate constants of the glucocorticoid hormone-receptor interaction on steroid structure*. J Steroid Biochem, 1982. **17**(2): p. 137-41.
62. Rodbard, D., et al., *Statistical quality control of radioimmunoassays*. J Clin Endocrinol Metab, 1968. **28**(10): p. 1412-8.
63. Schaumburg, B.P., *Studies of the glucocorticoid-binding protein from thymocytes. 3. pH dependence of the binding and density-gradient centrifugation of the protein*. Biochim Biophys Acta, 1972. **263**(2): p. 414-23.
64. Bell, P.A. and A. Munck, *Steroid-binding properties and stabilization of cytoplasmic glucocorticoid receptors from rat thymus cells*. Biochem J, 1973. **136**(1): p. 97-107.
65. Mendel, D.B., N.J. Holbrook, and J.E. Bodwell, *Degradation without apparent change in size of molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cytosol*. J Biol Chem, 1985. **260**(15): p. 8736-40.
66. Granberg, J.P. and P.L. Ballard, *The role of sulfhydryl groups in the binding of glucocorticoids by cytoplasmic receptors of lung and other mammalian tissues*. Endocrinology, 1977. **100**(4): p. 1160-8.
67. Leach, K.L., M.K. Dahmer, and W.B. Pratt, *Glucocorticoid receptor stabilization: relative effects of molybdate ion on inactivation by alkaline phosphatase and phospholipase A2*. J Steroid Biochem, 1983. **18**(1): p. 105-7.

68. Barsony, J. and W. McKoy, *Molybdate increases intracellular 3',5'-guanosine cyclic monophosphate and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing filaments*. J Biol Chem, 1992. **267**(34): p. 24457-65.
69. Modarress, K.J., et al., *Metal oxyanion stabilization of the rat glucocorticoid receptor is independent of thiols*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25621-8.
70. Lee, H.J., et al., *Binding of glucocorticoid 21-oic acids and esters to molybdate-stabilized hepatic receptors*. J Steroid Biochem, 1981. **14**(12): p. 1325-35.
71. Sando, J.J., C.J. Nielsen, and W.B. Pratt, *Reactivation of thymocyte glucocorticoid receptors in a cell-free system*. J Biol Chem, 1977. **252**(21): p. 7579-82.
72. Toft, D. and J. Gorski, *A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **55**(6): p. 1574-81.
73. Scatchard, G.N., *The attractions of proteins for small molecules and ions*. Ann. NY Acad. Sci., 1949. **51**: p. 660 - 672.
74. Esmailpour, N., P. Högger, and P. Rohdewald, *Binding kinetics of budesonide to the human glucocorticoid receptor*. Eur J Pharm Sci, 1998. **6**(3): p. 219-23.
75. Snochowski, M., et al., *Androgen and glucocorticoid receptors in human skeletal muscle cytosol*. J Steroid Biochem, 1981. **14**(8): p. 765-71.
76. Wolff, M.E., et al., *Nature of steroid-glucocorticoid receptor interactions: thermodynamic analysis of the binding reaction*. Biochemistry, 1978. **17**(16): p. 3201-8.
77. Munck, A. and N.J. Holbrook, *Glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cells. Rapid kinetic behavior and a cyclic model*. J Biol Chem, 1984. **259**(2): p. 820-31.
78. Stoeck, M., et al., *In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of the new glucocorticoid ciclesonide*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **309**(1): p. 249-58.
79. Isogai, M., et al., *Binding affinities of mometasone furoate and related compounds including its metabolites for the glucocorticoid receptor of rat skin tissue*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **44**(2): p. 141-5.
80. Crim, C., L.N. Pierre, and P.T. Daley-Yates, *A review of the pharmacology and pharmacokinetics of inhaled fluticasone propionate and mometasone furoate*. Clin Ther, 2001. **23**(9): p. 1339-54.
81. Smith, C.L. and W. Kreutner, *In vitro glucocorticoid receptor binding and transcriptional activation by topically active glucocorticoids*. Arzneimittelforschung, 1998. **48**(9): p. 956-60.

-
82. Williams, D.M., *Clinical considerations in the use of inhaled corticosteroids for asthma*. Pharmacotherapy, 2001. **21**(3 Pt 2): p. 38S-48S.
83. O'Connor, B., et al., *Dose-ranging study of mometasone furoate dry powder inhaler in the treatment of moderate persistent asthma using fluticasone propionate as an active comparator*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2001. **86**(4): p. 397-404.
84. Mandl, M., K. Nolop, and B.N. Lutsky, *Comparison of once daily mometasone furoate (Nasonex) and fluticasone propionate aqueous nasal sprays for the treatment of perennial rhinitis. 194-079 Study Group*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1997. **79**(4): p. 370-8.
85. Affrime, M.B., et al., *Bioavailability and metabolism of mometasone furoate following administration by metered-dose and dry-powder inhalers in healthy human volunteers*. J Clin Pharmacol, 2000. **40**(11): p. 1227-36.
86. Teng, X.W., D.J. Cutler, and N.M. Davies, *Kinetics of metabolism and degradation of mometasone furoate in rat biological fluids and tissues*. J Pharm Pharmacol, 2003. **55**(5): p. 617-30.
87. Teng, X.W., D.J. Cutler, and N.M. Davies, *Mometasone furoate degradation and metabolism in human biological fluids and tissues*. Biopharm Drug Dispos, 2003. **24**(8): p. 321-33.
88. Sahasranaman, S., et al., *Characterization of degradation products of mometasone furoate*. Pharmazie, 2004. **59**(5): p. 367-73.
89. Ponec, M., J.A. Kempenaar, and E.R. De Kloet, *Corticoids and cultured human epidermal keratinocytes: specific intracellular binding and clinical efficacy*. J Invest Dermatol, 1981. **76**(3): p. 211-4.
90. Peterkofsky, B., et al., *Species differences in cis-elements of the proalpha1(I) procollagen promoter and their binding proteins*. J Cell Biochem, 1999. **73**(3): p. 408-22.
91. Tanigawa, K., et al., *Species-specific differences in the glucocorticoid receptor transactivation function upon binding with betamethasone-esters*. Int Immunopharmacol, 2002. **2**(7): p. 941-50.
92. Hochhaus, G. and H.W. Moellmann, *Binding affinities of rimexolone (ORG 6216), flunisolide and their putative metabolites for the glucocorticoid receptor of human synovial tissue*. Agents Actions, 1990. **30**(3-4): p. 377-80.
93. Grogan, W.M., et al., *Corticosterone 6 beta-hydroxylase in A6 epithelia: a steroid-inducible cytochrome P-450*. Am J Physiol, 1990. **258**(3 Pt 1): p. C480-8.

94. Affrime, M.B., et al., *Mometasone furoate has minimal effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis when delivered at high doses*. Chest, 2000. **118**(6): p. 1538-46.
95. Lipworth, B.J., *Mometason furoate levels*. Chest, 2001. **120**(3): p. 1034-5.
96. Derendorf, H., et al., *Bioavailability and metabolism of mometasone furoate: pharmacology versus methodology*. J Clin Pharmacol, 2002. **42**(4): p. 383-7.
97. Wolff, M.E., *Structure-activity relationships in glucocorticoids*. Monogr Endocrinol, 1979. **12**: p. 97-107.
98. Leo, A., C. Hansch, and P.Y. Jow, *Dependence of hydrophobicity of apolar molecules on their molecular volume*. J Med Chem, 1976. **19**(5): p. 611-5.
99. Caron, J.C. and B. Shroot, *Determination of partition coefficients of glucocorticosteroids by high-performance liquid chromatography*. J Pharm Sci, 1984. **73**(12): p. 1703-6.
100. Högger, P., *[What happens in the body with glucocorticoids? Pharmacokinetics and pharmacodynamics]*. Pharm Unserer Zeit, 2003. **32**(4): p. 296-301.
101. Weinberger, M.H., *Eplerenone: a new selective aldosterone receptor antagonist*. Drugs Today (Barc), 2004. **40**(6): p. 481-5.
102. Delyani, J.A., et al., *Eplerenone: a selective aldosterone receptor antagonist (SARA)*. Cardiovasc Drug Rev, 2001. **19**(3): p. 185-200.
103. Weber, M.A., *Clinical implications of aldosterone blockade*. Am Heart J, 2002. **144**(Suppl 5): p. S12-8.
104. Magni, P. and M. Motta, *Aldosterone receptor antagonists: biology and novel therapeutical applications*. J Endocrinol Invest, 2003. **26**(8): p. 788-98.
105. Ritter, M., et al., *Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(2): p. 466-74.
106. Droste, A., C. Sorg, and P. Högger, *Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(1): p. 110-3.
107. Topoll, H.H., et al., *Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis*. J Periodontal Res, 1989. **24**(2): p. 106-12.
108. Moller, H.J., et al., *Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma*. Blood, 2002. **99**(1): p. 378-80.

109. Matsushita, N., et al., *Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3*. Clin Exp Immunol, 2002. **130**(1): p. 156-61.
110. Högger, P. and C. Sorg, *Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(4): p. 841-3.
111. Kristiansen, M., et al., *Identification of the haemoglobin scavenger receptor*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 198-201.
112. Schaer, D.J., et al., *Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids*. Br J Haematol, 2002. **119**(1): p. 239-43.
113. Zwadlo-Klarwasser, G., et al., *Glucocorticoid-induced appearance of the macrophage subtype RM 3/1 in peripheral blood of man*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990. **91**(2): p. 175-80.
114. Högger, P., et al., *Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163)*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1883-90.
115. Högger, P., et al., *Biochemical characterization of a glucocorticoid-induced membrane protein (RM3/1) in human monocytes and its application as model system for ranking glucocorticoid potency*. Pharm Res, 1998. **15**(2): p. 296-302.
116. Sulahian, T.H., et al., *Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155*. Cytokine, 2000. **12**(9): p. 1312-21.
117. Brooks, E.M., L.G. Sheflin, and S.W. Spaulding, *Secondary structure in the 3' UTR of EGF and the choice of reverse transcriptases affect the detection of message diversity by RT-PCR*. Biotechniques, 1995. **19**(5): p. 806-12, 814-5.
118. Gerard, G.F., et al., *Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA*. Mol Biotechnol, 1997. **8**(1): p. 61-77.
119. Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. J Mol Endocrinol, 2002. **29**(1): p. 23-39.
120. Joyce, C., *Quantitative RT-PCR. A review of current methodologies*. Methods Mol Biol, 2002. **193**: p. 83-92.
121. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.

122. O'Connell, J., T. Goode, and F. Shanahan, *Quantitative measurement of mRNA expression by competitive RT-PCR*. *Methods Mol Biol*, 1998. **92**: p. 183-93.
123. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. *J Mol Endocrinol*, 2000. **25**(2): p. 169-93.
124. Singer, V.L., T.E. Lawlor, and S. Yue, *Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test)*. *Mutat Res*, 1999. **439**(1): p. 37-47.
125. Ishiguro, T., et al., *Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater*. *Anal Biochem*, 1995. **229**(2): p. 207-13.
126. Tseng, S.Y., et al., *An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify Salmonella*. *Anal Biochem*, 1997. **245**(2): p. 207-12.
127. Singer, V.L., et al., *Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation*. *Anal Biochem*, 1997. **249**(2): p. 228-38.
128. Ogura, M. and M. Mitsuhashi, *Screening method for a large quantity of polymerase chain reaction products by measuring YOYO-1 fluorescence on 96-well polypropylene plates*. *Anal Biochem*, 1994. **218**(2): p. 458-9.
129. Bink, K., et al., *TO-PRO-3 is an optimal fluorescent dye for nuclear counterstaining in dual-colour FISH on paraffin sections*. *Histochem Cell Biol*, 2001. **115**(4): p. 293-9.
130. Zipper, H., et al., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(12): p. e103.
131. Wittwer, C.T., et al., *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*. *Biotechniques*, 1997. **22**(1): p. 130-1, 134-8.
132. Morrison, T.B., J.J. Weis, and C.T. Wittwer, *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*. *Biotechniques*, 1998. **24**(6): p. 954-8, 960, 962.
133. Sovenyhazy, K.M., J.A. Bordelon, and J.T. Petty, *Spectroscopic studies of the multiple binding modes of a trimethine-bridged cyanine dye with DNA*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(10): p. 2561-9.
134. Cardullo, R.A. and V. Parpura, *Fluorescence resonance energy transfer microscopy: theory and instrumentation*. *Methods Cell Biol*, 2003. **72**: p. 415-30.

135. Clegg, R.M., *Fluorescence resonance energy transfer*. Curr Opin Biotechnol, 1995. **6**(1): p. 103-10.
136. Schneeberger, C., et al., *Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain*. PCR Methods Appl, 1995. **4**(4): p. 234-8.
137. Rutledge, R.G. and C. Cote, *Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(16): p. e93.
138. Rasmussen, R., *Quantification on the LightCycler*, in *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*, C.M. Wittwer, S. and Nakagawara, K., Editor. 2001, Springer Press: Heidelberg. p. 21-34.
139. Dheda, K., et al., *Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR*. Biotechniques, 2004. **37**(1): p. 112-4, 116, 118-9.
140. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
141. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
142. Peirson, S.N., J.N. Butler, and R.G. Foster, *Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(14): p. e73.
143. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
144. Tichopad, A., et al., *Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(20): p. e122.
145. Beetz, A., et al., *Induction of interleukin 6 by ionizing radiation in a human epithelial cell line: control by corticosteroids*. Int J Radiat Biol, 1997. **72**(1): p. 33-43.
146. Vermeer, H., et al., *Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(1): p. 277-84.
147. Goulding, N.J., *The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation - a four-ring circus*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(6): p. 629-36.

148. Abbinante-Nissen, J.M., L.G. Simpson, and G.D. Leikauf, *Corticosteroids increase secretory leukocyte protease inhibitor transcript levels in airway epithelial cells*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 1): p. L601-6.
149. English, A., et al., *Some biological activities of a new corticosteroid, fluticasone propionate*. Br J Pharmacol, 1994. **112**(Suppl 2): p. U83.
150. Perrin-Wolff, M., et al., *Structure-activity relationships in glucocorticoid-induced apoptosis in T lymphocytes*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(1): p. 103-10.
151. Hagaman, D., T. Bridges, and W. Serafin, *Glucocorticoids inhibit cytokine production by human and murine mast cells*. J Allergy Clin Immunol, 1995. **95**(Suppl 1): p. 298.
152. Roumestan, C., et al., *Fluticasone propionate and mometasone furoate have equivalent transcriptional potencies*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(7): p. 895-901.
153. Van den Bosch, J.M., et al., *Relationship between lung tissue and blood plasma concentrations of inhaled budesonide*. Biopharm Drug Dispos, 1993. **14**(5): p. 455-9.
154. Esmailpour, N., et al., *Distribution of inhaled fluticasone propionate between human lung tissue and serum in vivo*. Eur Respir J, 1997. **10**(7): p. 1496-9.
155. Holz, O., et al., *Direct measurement of BDP and 17-BMP in bronchial and peripheral lung tissue after inhalation of HFA- vs CFC-driven aerosols*. Pulm Pharmacol Ther, 2004. **17**(4): p. 233-8.
156. Högger, P., *Comparison of the tissue affinity of glucocorticoids to human lung, nasal and skin tissue in vitro*. Arzneimittelforschung, 2001. **51**(10): p. 825-31.
157. Rohdewald, P., U. Bonsmann, and P. Högger, *Die Bindung inhalativer Glukokortikoide an menschliches Lungengewebe in vitro.*, in *Neue Aspekte der inhalativen Glukokortikoid-Therapie des Asthma bronchiale*, W.L.u.D. Nolte, Editor. 1995: München-Deisenhofen. p. pp 14-27.
158. Ponec, M. and J.A. Kempenaar, *Biphasic entry of glucocorticoids into cultured human skin keratinocytes and fibroblasts*. Arch Dermatol Res, 1983. **275**(5): p. 334-44.
159. Scavone, J.M., et al., *Effect of age, body composition, and lipid solubility on benzodiazepine tissue distribution in rats*. Arzneimittelforschung, 1987. **37**(1): p. 2-6.
160. Iwamoto, K., J. Watanabe, and H. Yonekawa, *Specific age-dependence in capacity-limited uptake of propranolol by isolated rat lung*. J Pharm Pharmacol, 1989. **41**(6): p. 398-401.
161. Yoshida, H., et al., *Accumulation mechanism of basic drugs in the isolated perfused rat lung*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1989. **37**(2): p. 450-3.

-
162. Johnson, M., *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inhaled glucocorticoids*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**(1 Pt 2): p. 169-76.
163. Esmailpour, N., P. Högger, and P. Rohdewald, *Binding of glucocorticoids to human nasal tissue in vitro*. Int Arch Allergy Immunol, 2000. **122**(2): p. 151-4.
164. Bonsmann, U., et al., *Presence of fluticasone propionate on human nasal mucosal surface and in human nasal tissue over a period of 24 h after intranasal application*. Allergy, 2001. **56**(6): p. 532-5.
165. Fardon, T.C., et al., *Adrenal suppression with dry powder formulations of fluticasone propionate and mometasone furoate*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(9): p. 960-6.
166. Rohatagi, S., et al., *Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of ciclesonide*. J Clin Pharmacol, 2003. **43**(4): p. 365-78.
167. Nave, R., et al., *Pharmacokinetics of [¹⁴C]ciclesonide after oral and intravenous administration to healthy subjects*. Clin Pharmacokinet, 2004. **43**(7): p. 479-86.
168. Bethke, T., et al., *Pharmakokinetics of ciclesonide and its aktive principle in asthma patients and healthy subjects after single-dose inhalation*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(Suppl 2): p. 217.
169. Daley-Yates, P.T., et al., *Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **51**(5): p. 400-9.
170. Edsbäcker, S., O. Sternebring, and C. Johansson, *Pharmacokinetic factors affecting airway selectivity of inhaled steroids – role of prodrug conversion and absorption*. Eur Respir J, 2004. **24**(Suppl 48): p. 347.
171. Gullstrand, H., et al., *Tissue retention and esterification is greater for budesonide than for ciclesonide in trachea ex vivo*. Eur Respir J, 2004. **24**(Suppl 48): p. 345.
172. Falk Nilsson, H., et al., *Greater esterification and retention of budesonide in the airways and lung as compared to ciclesonide after repeated intratracheal administration in vivo*. Eur Respir J, 2004. **24**(Suppl 48): p. 346.
173. Nave, R., et al., *Highly lipophilic fatty acid esters of the active metabolite of ciclesonide formed in vitro in rat lung tissue*. Eur Respir J, 2004. **24**(Suppl 48): p. 345.
174. Hochhaus, G., *New Developments in Corticosteroids*. Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(3): p. 269-274.
175. Szeffler, S.J., *Pharmacokinetics of intranasal corticosteroids*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(Suppl 1): p. S26-31.

176. Humbert, M., *Ciclesonide: a novel inhaled corticosteroid*. Expert Opin Investig Drugs, 2004. **13**(10): p. 1349-60.
177. Kelly, H.W., *Pharmaceutical characteristics that influence the clinical efficacy of inhaled corticosteroids*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2003. **91**(4): p. 326-34; quiz 334-5, 404.
178. Rohatagi, S., et al., *Dynamic modeling of cortisol reduction after inhaled administration of fluticasone propionate*. J Clin Pharmacol, 1996. **36**(10): p. 938-41.
179. Onrust, S.V. and H.M. Lamb, *Mometasone furoate. A review of its intranasal use in allergic rhinitis*. Drugs, 1998. **56**(4): p. 725-45.
180. Fournier, T., N.N. Medjoubi, and D. Porquet, *Alpha-1-acid glycoprotein*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 157-71.
181. Kosa, T., T. Maruyama, and M. Otagiri, *Species differences of serum albumins: I. Drug binding sites*. Pharm Res, 1997. **14**(11): p. 1607-12.
182. Endo, H., et al., *Stereoselectivity and species difference in plasma protein binding of KE-298 and its metabolites*. Biol Pharm Bull, 2001. **24**(7): p. 800-5.
183. Imamura, K., et al., *Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state*. J Pharm Sci, 2003. **92**(2): p. 266-74.
184. Kratochwil, N.A., et al., *Predicting plasma protein binding of drugs--revisited*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2004. **7**(4): p. 507-12.
185. Ryrfeldt, A., et al., *Pharmacokinetics and metabolism of budesonide, a selective glucocorticoid*. Eur J Respir Dis Suppl, 1982. **122**: p. 86-95.
186. Brindley, C., et al., *Absorption kinetics after inhalation of fluticasone propionate via the Diskhaler, Diskus and metered-dose inhaler in healthy volunteers*. Clin Pharmacokinet, 2000. **39**(Suppl 1): p. 1-8.
187. Würthwein, G. and P. Rohdewald, *Activation of beclomethasone dipropionate by hydrolysis to beclomethasone-17-monopropionate*. Biopharm Drug Dispos, 1990. **11**(5): p. 381-94.
188. Herderich, A.a.S., P., *HPLC-MS/MS in der Naturstoff- und Lebensmittelanalytik*. GIT Fachz. Lab., 1996. **9**: p. 841-844.
189. Niessen, W.M.A. and A.P. Tinke, *Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation*. Journal of Chromatography A, 1995. **703**(1-2): p. 37-57.
190. Whitehouse, C.M., et al., *Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers*. Anal Chem, 1985. **57**(3): p. 675-9.

-
191. Lehmann, W.D., et al., *Biomakromoleküle, Neutrinos und ein Wurm*. Nachrichten aus der Chemie, 2002. **11**: p. 1208-12.
192. Schröder, E., *Massenspektrometrie, Begriffe und Definitionen*. Springer Verlag, Berlin, 1991.
193. Draper, R.W., et al., *An unusual dienone-phenol rearrangement product formed during the synthesis of mometasone furoate (Sch 32088)*. Steroids, 1998. **63**(3): p. 135-40.
194. Rachwal, S., et al., *Chemistry of loteprednol etabonate and related steroids. II. Reactions at ring C and NMR structural studies of the resulting compounds*. Steroids, 1998. **63**(4): p. 193-201.
195. Draper, R.W., et al., *Unusual hydroxy-gamma-sultone byproducts of steroid 21-methanesulfonylation. An efficient synthesis of mometasone 17-furoate (Sch 32088)*. Tetrahedron, 1999. **55**(11): p. 3355-64.
196. Koradi, R., M. Billeter, and K. Wuthrich, *MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): p. 51-5, 29-32.
197. Pedretti, A., L. Villa, and G. Vistoli, *VEGA--an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming*. J Comput Aided Mol Des, 2004. **18**(3): p. 167-73.
198. Foe, K., et al., *Degradation products of beclomethasone dipropionate in human plasma*. Drug Metab Dispos, 1998. **26**(2): p. 132-7.
199. Foe, K., et al., *Metabolism kinetics of beclomethasone propionate esters in human lung homogenates*. Pharm Res, 2000. **17**(8): p. 1007-12.
200. Foe, K., K.F. Brown, and J.P. Seale, *Comparative kinetics of metabolism of beclomethasone propionate esters in human lung homogenates and plasma*. J Pharm Sci, 2000. **89**(9): p. 1143-50.
201. Foe, K., K.F. Brown, and J.P. Seale, *Decomposition of beclomethasone propionate esters in human plasma*. Biopharm Drug Dispos, 1998. **19**(1): p. 1-8.
202. Timmins, P. and E.A. Gray, *The degradation of triamcinolone acetonide in aqueous solution: influence of the cyclic ketal function*. J Pharm Pharmacol, 1983. **35**(3): p. 175-7.
203. Teng, X.W., et al., *High-performance liquid chromatographic analysis of mometasone furoate and its degradation products: application to in vitro degradation studies*. J Pharm Biomed Anal, 2001. **26**(2): p. 313-9.
204. Teng, X.W., D.C. Cutler, and N.M. Davies, *Degradation kinetics of mometasone furoate in aqueous systems*. Int J Pharm, 2003. **259**(1-2): p. 129-41.

205. Kalkwarf, D.R., *Dissolution rates of uranium compounds in simulated lung fluid*. Sci Total Environ, 1983. **28**: p. 405-14.
206. Zbaida, S., et al., *In vitro metabolism of mometasone furoate*. Faseb J, 1997. **11**(Suppl 9): p. 829.
207. Sharpe, M. and B. Jarvis, *Inhaled mometasone furoate: a review of its use in adults and adolescents with persistent asthma*. Drugs, 2001. **61**(9): p. 1325-50.
208. Brazzini, B. and N. Pimpinelli, *New and established topical corticosteroids in dermatology: clinical pharmacology and therapeutic use*. Am J Clin Dermatol, 2002. **3**(1): p. 47-58.
209. Trangsrud, A.J., A.L. Whitaker, and R.E. Small, *Intranasal corticosteroids for allergic rhinitis*. Pharmacotherapy, 2002. **22**(11): p. 1458-67.
210. Kodama, Y., et al., *In vivo determinations of carbamazepine and carbamazepine-10, 11-epoxide binding parameters to serum proteins in monotherapy patients*. J Clin Pharmacol, 1993. **33**(9): p. 851-5.
211. Brunmark, P., et al., *Identification of subdomain IB in human serum albumin as a major binding site for polycyclic aromatic hydrocarbon epoxides*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(8): p. 880-6.
212. Degenkolb, T., et al., *The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions*. J Pept Sci, 2003. **9**(11-12): p. 666-78.
213. Gäfvert, E., et al., *Contact allergy to resin acid hydroperoxides. Hapten binding via free radicals and epoxides*. Chem Res Toxicol, 1994. **7**(2): p. 260-6.
214. Kilpio, K. and M. Hannuksela, *Corticosteroid allergy in asthma*. Allergy, 2003. **58**(11): p. 1131-5.
215. Chaplin, M.D., et al., *Flunisolide metabolism and dynamics of a metabolite*. Clin Pharmacol Ther, 1980. **27**(3): p. 402-13.
216. Argenti, D., et al., *A mass balance study to evaluate the biotransformation and excretion of [¹⁴C]-triamcinolone acetonide following oral administration*. J Clin Pharmacol, 2000. **40**(7): p. 770-80.
217. Sahasranaman, S., Issar. M, and Hochhaus. G, *Why does mometasone furoate exhibit low systemic exposure after oral inhalation?* J Clin Pharmacol, 2003. **43**(9): p. 1036.
218. Högger, P. and P. Rohdewald, *Glucocorticoid receptors and fluticasone propionate*. Reviews Contemporary Pharmacotherapy, 1998. **9**(8): p. 501-22.

-
219. Högger, P., J. Rawert, and P. Rohdewald, *Dissolution, tissue binding and kinetics of receptor binding of inhaled glucocorticoids*. Eur Respir J, 1993. **6**(Suppl 17): p. 584.
220. Vanden Burgt, J.A., et al., *Efficacy and safety overview of a new inhaled corticosteroid, QVAR (hydrofluoroalkane-beclomethasone extrafine inhalation aerosol), in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(6): p. 1209-26.
221. Zeidler, M. and J. Corren, *Hydrofluoroalkane formulations of inhaled corticosteroids for the treatment of asthma*. Treat Respir Med, 2004. **3**(1): p. 35-44.
222. Lipworth, B.J. and C.M. Jackson, *Pharmacokinetics of chlorofluorocarbon and hydrofluoroalkane metered-dose inhaler formulations of beclomethasone dipropionate*. Br J Clin Pharmacol, 1999. **48**(6): p. 866-8.
223. Harrison, L.I., et al., *Pharmacokinetic differences between chlorofluorocarbon and chlorofluorocarbon-free metered dose inhalers of beclomethasone dipropionate in adult asthmatics*. J Pharm Pharmacol, 1999. **51**(11): p. 1235-40.
224. Agertoft, L., et al., *Influence of particle size on lung deposition and pharmacokinetics of beclomethasone dipropionate in children*. Pediatr Pulmonol, 2003. **35**(3): p. 192-9.
225. Seale, J.P. and L.I. Harrison, *Effect of changing the fine particle mass of inhaled beclomethasone dipropionate on intrapulmonary deposition and pharmacokinetics*. Respir Med, 1998. **92 Suppl A**: p. 9-15.
226. Rasenack, N., H. Steckel, and B.W. Muller, *Micronization of anti-inflammatory drugs for pulmonary delivery by a controlled crystallization process*. J Pharm Sci, 2003. **92**(1): p. 35-44.
227. Müller, R.H., K. Mader, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*. Eur J Pharm Biopharm, 2000. **50**(1): p. 161-77.
228. Wiedmann, T.S., R. Bhatia, and L.W. Wattenberg, *Drug solubilization in lung surfactant*. Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): p. 43-47.
229. Freiwald, M., et al., *Monitoring the initial pulmonary absorption of two different beclomethasone dipropionate aerosols employing a human lung reperfusion model*. Respir Res, 2005. **6**(1): p. 21.
230. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
231. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.

232. Bruning, P.F., K.M. Jonker, and A.W. Boerema-Baan, *Adsorption of steroid hormones by plastic tubing*. J Steroid Biochem, 1981. **14**(6): p. 553-5.
233. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
234. Feige, U., B. Overwien, and C. Sorg, *Purification of human blood monocytes by hypotonic density gradient centrifugation in Percoll*. J Immunol Methods, 1982. **54**(3): p. 309-15.
235. Manchester, K.L., *Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids*. Biotechniques, 1995. **19**(2): p. 208-10.
236. Dreier, J., P. Hogger, and C. Sorg, *Rapid method for isolation of total RNA from eukaryotic cell lines and leukocytes*. DNA Cell Biol, 1998. **17**(4): p. 321-3.
237. Lucic, A., et al., *The effect of dichlorvos treatment on butyrylcholinesterase activity and lipid metabolism in rats*. Arh Hig Rada Toksikol, 2002. **53**(4): p. 275-81.
238. Buick, A.R., et al., *Method validation in the bioanalytical laboratory*. J Pharm Biomed Anal, 1990. **8**(8-12): p. 629-37.
239. Braggio, S., et al., *A strategy for validation of bioanalytical methods*. J Pharm Biomed Anal, 1996. **14**(4): p. 375-88.
240. Shah, V.P., et al., *Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1991. **16**(4): p. 249-55.
241. Shah, V.P., et al., *Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress*. Pharm Res, 2000. **17**(12): p. 1551-7.
242. Gan, S.H., et al., *Method development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for tramadol in human plasma using liquid-liquid extraction*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **772**(1): p. 123-9.
243. Falcoz, C., et al., *Bioavailability of orally administered micronised fluticasone propionate*. Clin Pharmacokinet, 2000. **39**(Suppl 1): p. 9-15.
244. Donnelly, R. and J.P. Seale, *Clinical pharmacokinetics of inhaled budesonide*. Clin Pharmacokinet, 2001. **40**(6): p. 427-40.
245. Möllmann, H., et al., *Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of systemic effects of flunisolide after inhalation*. J Clin Pharmacol, 1997. **37**(10): p. 893-903.

246. Argenti, D., B. Shah, and D. Heald, *A pharmacokinetic study to evaluate the absolute bioavailability of triamcinolone acetonide following inhalation administration*. J Clin Pharmacol, 1999. **39**(7): p. 695-702.
247. Rohatagi, S., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of triamcinolone acetonide after intravenous, oral, and inhaled administration*. J Clin Pharmacol, 1995. **35**(12): p. 1187-93.

Lebenslauf

Anagnostis Valotis, geboren am 18. April 1972 in Solingen

Ausbildung

Sep. 1978	Einschulung, Krinides Kr. Kavala, Griechenland
Sep 1984 – Juni 1990	Gymnasium, Krinides Kr. Kavala, Griechenland
Juli 1990	Abitur
Sept. 1991 – März 1992	Goethe-Institut, Schwäbisch-Hall
Nov. 1994 – März 1999	Studium der Pharmazie an der Bayerischen Julian-Maximilians-Universität, Würzburg
Mai 1997 – Juni 1997	studentische Hilfskraft beim AK Prof. Dr. S. Ebel Uni-Würzburg
Juli 1997 – Sep. 1997	wiss. Hilfskraft beim AK PD. Dr. M. Veit Uni-Würzburg
April 1999	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 1999 – April 2000	Praktische Ausbildung zum Apotheker in der Laurentius-Apotheke, Marktheidenfeld
Juni 2000	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker
April 2001 – Dez. 2004	Promotionsstudium am Institut für Pharmazie der Uni-Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Petra Högger.

Berufstätigkeit

Aug. 1990 – Aug. 1991	Entwicklungsabteilung der Firma Markutec, Marktheidenfeld
Juli 2000 – März 2001	Laurentius-Apotheke, Marktheidenfeld
seit Januar 2005	wiss. Angestellter bei Prof. Dr. Petra Högger

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

Pharmakokinetische und molekularpharmakodynamische Aspekte inhalativ angewandter Glucocorticoide

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den urkundlich vorgelegten und anerkannten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Anagnostis Valotis