

Charakterisierung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik intranasaler Glucocorticoide anhand von *in vitro* und *ex vivo* Modellen



DISSERTATION

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

vorgelegt von
Daniel Baumann
aus Tettwang

Würzburg 2011

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Petra Högger

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

Meiner Familie

Bereits aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen:

Originalpublikation:

Baumann D, Bachert C, Högger P:

Dissolution in nasal fluid, retention and anti-inflammatory activity of fluticasone furoate in human nasal tissue *ex vivo*.

Clin Exp Allergy 2009;39:1540-1550.

Posterbeitrag:

Gnadt M, Trammer B, Baumann D, Högger P:

Die stärkste Waffe gegen Entzündungen – Pharmakokinetik und Pharmakodynamik inhalativ oder nasal applizierter Glucocorticoide

Chem SystM – Chemie Symposium der Studierenden Mainfrankens 2007, Jungchemikerforum Würzburg.

Danksagung

Mit der Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die zum Entstehen und Gelingen beigetragen haben.

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Petra Högger sehr herzlich danken für die Möglichkeit in ihrem Arbeitskreis dieses anschauliche, abwechslungsreiche und äußerst interessante Thema zu bearbeiten, für die vertrauensvolle Zusammenarbeit, die jederzeitige Möglichkeit zur Diskussion und Hilfestellung sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein großer Dank möchte ich auch dafür aussprechen, dass ich meine Lehrtätigkeit in der Klinischen Pharmazie ausüben durfte, mich umfassend in diesem Fach weiterbilden und Begeisterung für diese wichtige pharmazeutische Disziplin entwickeln konnte.

Für die Bereitstellung von Gewebeproben bedanke ich mich bei Prof. Dr. Claus Bachert von der Universitätsklinik Gent, Belgien. Dr. Boris Kardziej vom Thoraxzentrum der Klinik Michelsberg in Münnerstadt sei herzlich gedankt für die Überlassung von Lungengewebe.

Den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universitätsklinik Würzburg möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Blutprodukten.

Bei Prof. Dr. Georg Krohne und seinen Assistentinnen von der zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie des Theodor-Boveri-Instituts für Biowissenschaften der Universität Würzburg möchte ich mich recht herzlich bedanken für die überaus freundliche und engagierte Einführung in die Elektronenmikroskopie, die Hilfsbereitschaft und das mir entgegengebrachte Vertrauen nach kurzer Zeit selbständig arbeiten zu dürfen.

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Dr. Anagnostis Valotis bedanken, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine Erfahrung mit Glucocorticoiden, sein wissenschaftliches Engagement und vor allem seine Bereitschaft zur fachlichen, aber auch zwischenmenschlichen Diskussion waren mir eine große Hilfe und Freude.

An dieser Stelle danke ich auch Frau Roswitha Skrabala, die mir vor allem in meiner Anfangszeit bei der Bearbeitung so mancher Gewebeproben geholfen hat und unseren Arbeitskreis durch ihre fröhliche und freundschaftliche Art immer bereichert hat.

Ebenso möchte ich Frau Roswitha Scheblein recht herzlich für ihre Hilfestellung im Labor danken. So manche süße Überraschung, ihr fröhliches und liebenswertes Wesen erfreuten den AK-Alltag immer wieder.

Im Besonderen möchte ich meinem lieben Kollegen Klaus Uhlenhut für die Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur danken. Seine Mithilfe und Erfahrung ermöglichten es mir,

wesentliche Prinzipien der Zellkultur schnell zu erlernen.

Der institutseigenen Werkstatt, allen voran Georg Walter sowie Matthias Völker, Karl Vollmuth und den Auszubildenden möchte recht herzlich danken für ihre freundliche und überaus engagierte Hilfe bei der technischen Umsetzung verschiedener experimenteller Modellvorhaben. Die „heilenden“ Hände von Matthias Völker halfen bei der Reparatur manch elektronischen Geräts. Herrn Christoph Kessler sei besonders gedankt für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung einer Teflonkonstruktion. Auch dem Glasbläser des Instituts der Organischen Chemie, Manfred Ludwig, danke ich für die bereitwillige Herstellung von Glasgeräten.

Die Lehrtätigkeit in der Klinischen Pharmazie hat mir, trotz des teilweise großen Arbeitsaufwandes, besondere Freude und Genugtuung bereitet. Nicht zuletzt deshalb, weil wir in der Lehre ein richtig gutes Team waren. Deshalb möchte ich mich bei Dr. Mirjam Gnad, Beatrice Trammer und Armin Welker recht herzlich für die tolle, fröhliche und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Unsere Motivation die wichtigen Inhalte des Faches zu vermitteln, die Seminarinhalte interessant zu gestalten und uns gegenseitig in der Lehrtätigkeit zu unterstützen waren wichtige Bestandteile unserer gemeinsamen Arbeit.

Bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises Dr. Mirjam Gnad, Martin Haas, Max Kurlbaum, Melanie Müle, Roswitha Scheblein, Beatrice Trammer, Klaus Uhlenhut und Frederic Vollmers möchte ich mich recht herzlich für die tolle und freundschaftliche Zusammenarbeit und wirklich schöne Zeit bedanken, die wir zusammen erlebt haben. In Erinnerung werden mir unsere kollegiale Zusammenarbeit bleiben, die interessanten Gespräche und Diskussionen und nicht zu vergessen so mancher Ausflug und lustiger Abend, den wir gemeinsam erleben durften.

Schließlich gilt mein besonderer Dank allen Freunden und Verwandten, die mich während meiner Promotion motiviert und unterstützt haben. Allen voran möchte ich meinen Eltern Alice und Reinhard Baumann und meiner lieben Karla von ganzem Herzen danken. Ihre Motivation und Geduld, ihre stetige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Liebe haben mir stets die sichere Zuversicht gegeben, meinen Weg zu gehen.

*Ein Tropfen Liebe ist mehr
als ein Ozean an Willen und Verstand*

Blaise Pascal

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	23
1	Intranasale Glucocorticoide in der Therapie der allergischen Rhinitis	25
1.1	Anatomie und Physiologie der Nase.....	25
1.1.1	Nasenschleimhaut.....	25
1.2	Allergische Rhinitis.....	27
1.2.1	Pathophysiologie.....	27
1.2.1.1	Sensibilisierung.....	27
1.2.1.2	Sofortphase.....	28
1.2.1.3	Spätphase.....	28
1.2.2	Allergische Rhinitis und Asthma.....	28
1.2.3	Pharmakotherapie der allergischen Rhinitis.....	29
1.3	Pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften intranasaler Glucocorticoide.....	30
1.3.1	Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	31
1.3.2	Pharmakokinetische Eigenschaften.....	33
1.3.3	Pharmakodynamische Eigenschaften.....	35
1.3.3.1	Molekularer Wirkmechanismus.....	35
1.3.3.2	Sicherheit intranasaler Glucocorticoide.....	37
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	40
B	Allgemeiner Teil	43
1	Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils handelsüblicher Suspensionen zur intranasalen Applikation	45
1.1	Fragestellung.....	47
1.2	Prinzip der Bestimmung des bereits gelösten Glucocorticoidanteils.....	48
1.2.1	Methodenentwicklung.....	48
1.2.2	Prinzip der Ultrafiltration.....	49

1.2.3	Durchführung der Ultrafiltration.....	51
1.3	Ergebnisse.....	51
1.4	Diskussion.....	54
1.4.1	Nichtspezifische Bindung.....	54
1.4.2	Diskussion der entwickelten Methode und Bedeutung des bereits gelösten Glucocorticoidanteils.....	55
1.4.3	Einflussfaktoren der Sättigungslöslichkeit.....	58
2	Bestimmung des Sprühstoßvolumens handelsüblicher Glucocorticoid-Suspensionen zur intranasalen Applikation.....	63
2.1	Fragestellung.....	64
2.2	Prinzip der Bestimmung der Sprühstoßvolumina von Applikationssystemen nasaler Glucocorticoid-Suspensionen.....	65
2.3	Ergebnisse.....	65
2.4	Diskussion.....	66
2.4.1	Applikationsvolumen und orale Bioverfügbarkeit.....	66
2.4.2	Zusammenhang zwischen Applikationsvolumen, Verteilung und Clearance.....	68
2.4.3	Patientenpräferenz und Applikationsvolumen.....	69
3	Bestimmung der Löslichkeit intranasaler Glucocorticoid- Suspensionen in Puffer und künstlichem Nasensekret.....	71
3.1	Fragestellung.....	73
3.2	Prinzip der Bestimmung.....	73
3.2.1	Methodenentwicklung.....	73
3.2.2	Durchführung der Inkubation und Zentrifugation.....	74
3.3	Ergebnisse.....	75
3.4	Diskussion.....	77
3.4.1	Einfluss des Nasensekrets auf die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit von intranasalen Glucocorticoiden.....	77
3.4.2	Überlegungen zu den molekularen Vorgängen der Mucin-Glucocorticoid Wechselwirkung.....	82

4	Bindung intranasal angewendeter Glucocorticoide an humanes Nasengewebe	85
4.1	Fragestellung.....	86
4.2	Prinzip der Bestimmung	87
4.3	Ergebnisse	88
4.4	Diskussion.....	90
4.4.1	Gewebebindung im Zusammenhang mit physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Glucocorticoide	90
4.4.2	Bedeutung der Gewebebindung.....	93
4.4.3	Relevanz der Gewebebindung.....	94
5	Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch gewebegebundene intranasale Glucocorticoide.....	96
5.1	Fragestellung.....	97
5.2	Prinzip der Bestimmung	98
5.3	Ergebnisse	99
5.3.1	IL-8 Hemmung aus Gewebebindung.....	99
5.3.2	IL-8 Hemmung aus Plasmaproben.....	100
5.3.3	Stabilität der Substanzen und Nichtspezifische Bindung an Zellkulturmaterialien.....	102
5.4	Diskussion.....	103
5.4.1	Gewebebindung und RRA	103
6	Modell zur intranasalen Pharmakokinetik topisch applizierter Wirkstoffe.....	106
6.1	Fragestellung.....	107
6.2	Prinzip der Bestimmung	109
6.2.1	Methodenentwicklung	109
6.2.2	Versuchsprinzip	110
6.3	Ergebnisse	111
6.3.1	Gewebebindung.....	111

6.3.2	Bindung an Polyacrylamid-Gel	114
6.4	Diskussion	115
7	Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch wirkstoffenthaltendes Humanplasma des pharmakokinetischen Modells	120
7.1	Fragestellung	121
7.2	Prinzip der Bestimmung	122
7.3	Ergebnisse	122
7.4	Diskussion	125
7.4.1	Antiinflammatorische Eigenschaften von Antihistaminika und Glucocorticoiden.....	125
C	Experimenteller Teil	131
1	Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils handelsüblicher Suspensionen zur intranasalen Applikation	133
1.1	Verwendete Substanzen und Reagenzien	133
1.1.1	Stammlösungen	133
1.1.2	Verwendete Glucocorticoid-Nasensprays	134
1.1.3	Entnahme einer homogenen Glucocorticoid-Suspension aus den Nasenspray-Zubereitungen	135
1.2	Verwendete Geräte und Materialien	136
1.3	Durchführung der Ultrafiltration	136
1.4	Bestimmung der nichtspezifischen Bindung der Glucocorticoide an die Ultrafiltrationseinheit	138
1.5	Erfassung der log P-Werte	139
1.6	Probenvorbereitung für die HPLC	139
1.7	Quantifizierung mittels HPLC	139
1.7.1	HPLC Bedingungen.....	140
1.7.2	HPLC Methoden und Retentionszeiten (RT) der Glucocorticoide	140
1.7.3	Auswertung	141

2	Bestimmung des Sprühstoßvolumens handelsüblicher Glucocorticoid-Suspensionen zur intranasalen Applikation	142
2.1	Verwendete Substanzen und Reagenzien.....	142
2.1.1	Stammlösungen.....	142
2.2	Verwendete Geräte und Materialien	143
2.3	Gehaltsbestimmung intranasaler Glucocorticoid-Nasensprays	143
2.4	Quantifizierung mittels HPLC.....	144
2.5	Berechnung des Sprühstoßvolumens pro Sprühstoß.....	144
3	Bestimmung der Löslichkeit intranasaler Glucocorticoid-Suspensionen in Puffer und künstlichem Nasensekret	145
3.1	Verwendete Substanzen und Reagenzien.....	145
3.1.1	Stammlösungen.....	145
3.1.2	Isotonischer Phosphat-Puffer mit pH 6.5.....	145
3.1.3	Künstliches Nasensekret (KNS)	146
3.1.4	Proteinbestimmung der aufgereinigten Mucindispersion	146
3.1.4.1	Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry.....	146
3.1.4.1.1	Reagenzien und Geräte.....	147
3.1.4.1.2	Durchführung.....	147
3.1.4.2	Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)	148
3.1.4.2.1	Reagenzien und Geräte.....	148
3.1.4.2.2	Durchführung.....	149
3.1.4.3	Einstellung des Proteingehalts des künstlichen Nasensekrets	150
3.2	Verwendete Geräte und Materialien	150
3.2.1	Beschichtung von Reagiergefäßen mit Polypropylenglykol	151
3.2.1.1	Durchführung der Beschichtung	151
3.3	Durchführung der Löslichkeitsversuche	151
3.4	Probenaufarbeitung.....	152
3.5	Quantifizierung mittels HPLC.....	152
3.6	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Glucocorticoidkristallen in einer Mucindispersion	153

3.6.1	Verwendete Substanzen und Reagenzien	153
3.6.2	Herstellung einer Mucindispersion	153
3.6.3	Verwendete Geräte und Materialien	154
3.6.4	Durchführung der Inkubation und Probenvorbereitung	154
3.6.5	Präparation der Proben (Sputtern).....	154
3.6.6	Durchführung.....	155
4	Bindung intranasal angewendeter Glucocorticoide an humanes Nasengewebe	156
4.1	Verwendete Substanzen und Reagenzien	156
4.1.1	Stammlösungen	156
4.1.2	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	156
4.2	Verwendete Geräte und Materialien.....	157
4.2.1	Humanes Nasengewebe und Blutplasma	157
4.2.1.1	Vorbereitung des Nasengewebes	158
4.3	Bindung intranasal angewendeter Glucocorticoide an humanes Nasengewebe.....	158
4.3.1	Durchführung.....	158
4.4	Freisetzung der Glucocorticoide aus der Gewebefindung in Gegenwart von humanem Plasma	159
4.4.1	Durchführung.....	159
4.5	Probenaufarbeitung	159
4.6	Quantifizierung mittels HPLC	160
5	Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch gewebegebundene intranasale Glucocorticoide	161
5.1	Verwendete Substanzen und Reagenzien für die Zellkultur	161
5.1.1	Zusammensetzung des Zellkulturmediums für A549	161
5.1.2	Stimulation der Zellen.....	161
5.2	Verwendete Geräte und Materialien.....	162
5.2.1	Humanes Nasengewebe und Blutplasma	162
5.3	Kultivierung von A549	163

5.3.1	Humane Lungenepithelzellen A549	163
5.3.2	Erste Kultivierung von A549	163
5.3.3	Mediumwechsel und Passagieren von A549	163
5.3.4	Aussäen von A549 für Inkubationsversuche	164
5.4	Inkubation von A549 mit humanen Spezimen	165
5.4.1	Inkubation mit Humanplasma	165
5.4.2	Inkubation mit nasalen Gewebeproben	165
5.5	Zellzahlbestimmung nach Beendigung des Versuches	166
5.6	Quantitative Bestimmung der IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA	166
5.6.1	Prinzip der Bestimmung	166
5.6.2	Vorbereitung der Reagenzien	166
5.6.3	Herstellung der Kalibrierstandards	167
5.6.4	Durchführung der IL-8 Bestimmung	167
5.6.5	Auswertung der IL-8 Bestimmung	168
5.7	Bestimmung der nichtspezifischen Bindung der Glucocorticoide an Zellkulturmaterialien	169
5.7.1	Durchführung	169
5.7.2	Probenaufarbeitung	169
5.7.3	Quantifizierung mittels HPLC	169
6	Modell zur intranasalen Pharmakokinetik topisch applizierter Wirkstoffe	170
6.1	Verwendete Substanzen und Reagenzien	170
6.1.1	Nasale Arzneiformen der Experimente	170
6.1.2	Reagenzien zur Herstellung des Polyacrylamidgels	171
6.1.3	Stammlösungen	171
6.1.4	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	172
6.1.5	Isotonischer Phosphat-Puffer mit pH 7.4	172
6.1.6	Künstliches Nasensekret (KNS)	173
6.1.7	Humanes Lungengewebe, Blutplasma, Erythrozytenkonzentrat	173

6.1.7.1	Einstellung des Hämatokritwertes	173
6.1.7.2	Vorbereitung des Lungengewebes.....	174
6.2	Verwendete Geräte und Materialien.....	174
6.2.1	Waschvorrichtung zur Gelwaschung	175
6.3	Vorbereitungen zur Versuchsdurchführung	177
6.3.1	Herstellung von Kollagen Gelen mit/ohne Gewebe.....	177
6.3.1.1	Überführung des Gels in das Wägegglas.....	179
6.3.2	Herstellung eines Polyacrylamid-Gels mit/ohne Gewebe.....	179
6.3.2.1	Überführung des polymerisierten Gels in das Wägegglas	180
6.4	Bindung intranasal angewendeter Wirkstoffe an die Gewebe-Gel-Matrix	180
6.4.1	Durchführung.....	180
6.4.2	Waschen des Gels nach erfolgter Inkubation.....	182
6.4.3	Vorbereitung der Proben für die Analytik	182
6.5	Freisetzung der Wirkstoffe aus der Gewebe-Gel-Bindung in Gegenwart von humanem Plasma bzw. Plasma-Erythrozyten-Mischung.....	183
6.6	Verteilung von Azelastin-HCl in Erythrozyten	185
6.7	Probenaufarbeitung	185
6.8	Quantifizierung mittels HPLC	186
6.8.1	Bestimmung der Glucocorticoidproben	186
6.8.2	Bestimmung von Azelastin-HCl	186
6.8.2.1	HPLC Bedingungen	187
6.8.2.2	HPLC Methode und Retentionszeiten (RT)	187
6.8.2.3	Auswertung.....	187
7	Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch wirkstoffenthaltendes Humanplasma des pharmakokinetischen Modells	188
7.1	Verwendete Substanzen und Reagenzien	188
7.2	Verwendete Geräte und Materialien.....	188
7.3	Vorbereitungen zur Versuchsdurchführung	188
7.3.1	Gewinnung von Plasmaproben.....	188

7.4	Zellkultur.....	189
7.4.1	Inkubation mit Humanplasma.....	189
7.5	Zellzahlbestimmung nach Beendigung des Versuchs.....	190
7.6	Quantitative Bestimmung der IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA.....	190
7.6.1	Vorbereitung der Reagenzien	190
7.6.2	Herstellung der Kalibrierstandards	190
7.6.3	Durchführung der IL-8 Bestimmung	190
7.6.4	Auswertung der IL-8 Bestimmung	191
8	Validierung der Analysenmethoden	192
8.1	Selektivität.....	192
8.2	Kalibrierfunktion.....	193
8.3	Präzision und Richtigkeit	195
8.4	Bestimmungsgrenze.....	197
8.5	Extraktionseffektivität.....	199
D	Tabellarischer Anhang	201
1	Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils handelsüblicher Suspensionen zur intranasalen Applikation.....	203
1.1	Nichtspezifische Bindung (NSB).....	203
1.2	Bereits gelöster Glucocorticoidanteil.....	203
1.2.1	Wirkstoffkonzentration ohne NSB Korrektur.....	203
1.2.2	Wirkstoffkonzentration mit NSB Korrektur	204
2	Bestimmung des Sprühstoßvolumens handelsüblicher Glucocorticoid-Suspensionen zur intranasalen Applikation	205
2.1	Wirkstoffgehalt in 50 µL Glucocorticoid-Suspension	205
2.2	Sprühstoßvolumen	205

3	Bestimmung der Löslichkeit intranasaler Glucocorticoid-Suspensionen in Puffer und künstlichem Nasensekret.....	206
3.1	Nasacort®	206
3.2	Budes®	206
3.3	Flutide® Nasal	206
3.4	ratio Allerg®	207
3.5	Nasonex®	207
3.6	Avamys®	207
4	Bindung intranasal angewendeter Glucocorticoide an humanes Nasengewebe	208
4.1	Triamcinolonacetonid	208
4.2	Budesonid	208
4.3	Fluticasonpropionat	209
4.4	Mometasonfuroat	209
4.5	Fluticasonfuroat	209
5	Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch gewebegebundene intranasale Glucocorticoide	210
5.1	IL-8 Hemmung aus Gewebeproben	210
5.1.1	Zellviabilität	210
5.2	IL-8 Hemmung aus Plasmaproben	211
5.2.1	Zellviabilität	211
5.3	Stabilität im Zellkulturmedium	212
6	Modell zur intranasalen Pharmakokinetik topisch applizierter Wirkstoffe	213
6.1	Budesonid	213
6.1.1	Bindung und Freisetzung von Bud (Gewebe-Gel)	213
6.1.2	Bindung und Freisetzung von Bud (Vergleichsgel)	213
6.2	Fluticasonpropionat	214

6.2.1	Bindung und Freisetzung von FP (Gewebe-Gel)	214
6.2.2	Bindung und Freisetzung von FP (Vergleichsgel)	214
6.3	Azelastin-HCl.....	214
6.3.1	Bindung und Freisetzung von AZ-HCl (Gewebe-Gel).....	214
6.3.2	Bindung und Freisetzung von AZ-HCl (Vergleichsgel)	215
6.3.3	Verteilung von AZ-HCl in Erythrozyten.....	215
7	Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch wirkstoffenthaltendes Humanplasma des pharmakokinetischen Modells.....	216
7.1	IL-8 Hemmung aus Plasmaproben (1h)	216
7.1.1	Zellviabilität	216
7.2	IL-8 Hemmung aus Plasmaproben (1-3h).....	217
7.2.1	Zellviabilität	217
E	Zusammenfassung	219
F	Abkürzungsverzeichnis.....	229
G	Literaturverzeichnis	233

A Einleitung

1 **Intranasale Glucocorticoide in der Therapie der allergischen Rhinitis**

1.1 **Anatomie und Physiologie der Nase**

Bei der anatomischen Betrachtung der Nase kann zwischen einem äußeren Teil und einem inneren Teil unterschieden werden. Die äußere Nase besteht aus einem knöchernen pyramidenförmigen Skelett, an das sich flexible knorpelige Anteile anschließen [1]. Die Nasenhöhle (Cavum nasi), die über die Nasenlöcher (Nares) zugänglich ist, wird durch die Nasenscheidewand (Septum nasi) in zwei Hälften getrennt. Sie hat eine Länge von ca. 10 cm, eine Höhe von ca. 5 cm und besteht aus dem mit äußerer Haut ausgekleideten Nasenvorhof (Vestibulum nasi) und der Nasenhaupthöhle (Cavum nasi proprium) [2,3]. Die Nasenhaupthöhle ist mit Nasenschleimhaut ausgekleidet. Jede der zwei Hälften ist begrenzt durch die teils knöchernen, teils knorpelige Nasenscheidewand auf der einen Seite und die laterale Nasenwand auf der anderen. Die laterale Wand trägt die drei Nasenmuscheln (Conchae nasales), zwischen denen die drei Nasengänge liegen. Diese Vergrößerung der Oberfläche durch die untere, mittlere und obere Muschel ist für die Befeuchtung und Erwärmung der eingeatmeten Luft erforderlich [1]. So kann erreicht werden, dass am hinteren Ende der Nasenhöhle eine relative Luftfeuchtigkeit von 95 % und eine Lufttemperatur von 31-34 °C vorliegt [4]. Weitere Funktionen der Nase stellen die Regulierung des Atemstroms, die Luftreinigung, eine Reflexfunktion in Form des Niesreizes, sowie eine Abwehrfunktion gegenüber Mikroorganismen und Viren. Außerdem stellt die Nase das Riechorgan dar. Die Choanen begrenzen schließlich die Nasenhaupthöhle nach hinten und bilden den Übergang zum Nasenrachenraum (Nasopharynx) [1,3].

1.1.1 **Nasenschleimhaut**

Die Nasenschleimhaut unterteilt sich in die respiratorische Schleimhaut (regio respiratoria), die auf 120-150 cm² fast den gesamten Teil der Nasenhöhle auskleidet und die Riechschleimhaut (regio olfactoria) [2,5], die lediglich ca. 370 mm² im Bereich oberhalb der oberen Muschel ausmacht [6,3].

Die nasale Schleimhaut besteht aus drei Gewebeschichten. So sind epitheliale Zellen zu unterscheiden von der darunterliegenden Basalmembran und der submukosalen

Bindegewebsschicht (Lamina propria) [7].

Während die Epithelschicht der Riechschleimhaut aus spezialisierten Riech- und Stützzellen besteht, enthält die respiratorische Schleimhaut in den obersten Zellschichten ein mehrreihiges Flimmerepithel mit verschiedenen Zelltypen. Jede Zelle ist durch etwa 300-400 Mikrovilli gekennzeichnet, die für eine Oberflächenvergrößerung sorgen und somit die Schleimhaut vor dem Austrocknen schützen [3,5].

Einen Großteil des respiratorischen Epithels machen jedoch auch zilientragende Zellen aus. Zilien stellen Ausstülpungen der Zytoplasmamembran dar, die 5-10 µm lang und 250 nm dick sind. Ihre Beweglichkeit ist auf Mikrotubuli zurückzuführen. Diese Flimmerzellen, die etwa 200-300 Zilien pro Zelle aufweisen, sind für den Sekrettransport in den Rachenraum verantwortlich [5]. Der Zilienschlag sorgt im Zusammenwirken mit dem auf der Mukosa sezernierten Schleim für eine Reinigung der Schleimhaut, welche mukoziliäre Clearance genannt wird. Im vorderen Drittel der Nasenhaupthöhle kommen vermehrt zilienlose Epithelzellen vor, während die Zahl der zilientragenden Zellen am Vorderende der unteren Nasenmuschel, beginnend in Richtung Nasenrachenraum, immer weiter zunimmt [2].

Weitere epitheliale Zellen, die jedoch nur 5-15 % ausmachen, sind die Becherzellen. Sie stellen aufgrund ihrer einzelligen Drüsenfunktion in geringerem Maße Schleim höherer Viskosität her [5]. Die größten Schleimproduzenten der Atemwege sind allerdings die submukosalen Drüsen, die teilweise bis weit in das Bindegewebe reichen [2]. Pro Tag werden durch die respiratorische Nasenschleimhaut ca. 2 L frisches Sekret gebildet [4].

So wie alle Zellen des respiratorischen Epithels besitzen auch Basalzellen Kontakt zur Basalmembran. Basalzellen fungieren als Vorläuferzellen für andere Zelltypen und haben keine Verbindung zur Epitheloberfläche. Die Basalmembran selbst stellt eine mehrschichtige Verbindung zwischen den Epithelzellen und der angrenzenden Bindegewebsschicht dar. Sie ist durch eine stabilisierende Kollagenschicht gekennzeichnet [2].

Das angrenzende lockere Bindegewebe stellt die Lamina propria dar, welches direkt dem Knochen des Nasenskeletts bzw. dem Knorpel aufsitzt. Neben Fibroblasten sind hier aufgrund der wichtigen Abwehrfunktion der Atemwege eine Reihe von Abwehrzellen wie Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten vorzufinden [7]. Charakteristisch dazu sind zahlreiche Blutkapillaren, welche in einen Venenplexus übergehen und im nasalen Zyklus als Schwellkörper fungieren [5].

1.2 Allergische Rhinitis

Die allergische Rhinitis stellt eine symptomatische Überempfindlichkeitsreaktion der Nasenschleimhaut dar und wird als eine Allergie vom Soforttyp bezeichnet. Eine Überreaktion des Immunsystems gegenüber einem Antigen sorgt für eine Entzündung der Nasenschleimhaut. Sie wird je nach Dauer und Schwere der Symptomatik eingeteilt (siehe *Abbildung 1*). Durch die lokale Entzündungsreaktion kommt es in der Nase zu den Symptomen Juckreiz, Niesen, wässrige Sekretion und nasale Obstruktion. Gerade bei pollenbedingter Rhinitis tritt häufig auch eine begleitende Konjunktivitis auf. Die Auslöser stellen saisonale Allergene wie Pollen oder Schimmelpilzsporen, sowie perenniale Allergene wie Milben oder tierische Hautschuppen dar [8,9].

Dauer der Symptomatik	Intermittierend < 4 Tage/Woche oder < 4 aufeinanderfolgende Wochen	Persistierend > 4 Tage/Woche und > 4 aufeinanderfolgende Wochen
Schwere der Symptomatik	Mild Symptome sind vorhanden <u>Keine</u> Beeinträchtigung der Lebensqualität (Schlaf/Alltag)	Moderat-Schwer Symptome sind vorhanden <u>und</u> belastend Beeinträchtigung der Lebensqualität (Schlaf/Alltag)

Abbildung 1: ARIA Klassifikation der allergischen Rhinitis. Die Einteilung wird dabei nach Dauer und Schwere der Symptomatik vorgenommen (Abbildung modifiziert nach [8] und [9]).

1.2.1 Pathophysiologie

1.2.1.1 Sensibilisierung

In der Sensibilisierungsphase werden zunächst Allergene in antigenpräsentierenden Zellen (APC) in der Schleimhaut aufgenommen. Allergenbestandteile werden nach der Phagozytierung durch die APC über MHC-Klasse II-Moleküle naiven T_H-Lymphozyten (CD4+) präsentiert [10]. Die naiven T_H-Lymphozyten differenzieren unter Kostimulation zu T_H2-Zellen. Die aktivierten T_H2-Zellen sekretieren eine Reihe von Cytokinen, wobei IL-4 und IL-13 in B-Lymphozyten einen Isotypwechsel einleiten [11]. Daneben kommt es durch aktivierte T_H2-Zellen

über weitere proinflammatorische Cytokine auch zur Proliferation von Eosinophilen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten. Zur Produktion von spezifischen Ig-E Antikörpern in B-Zellen ist neben der Signalproteine eine Interaktion zwischen dem CD40-Ligand auf der Oberfläche von aktivierten T_H2-Zellen und CD40-Protein auf B-Lymphozyten nötig [12]. Die zu Plasmazellen differenzierten B-Zellen sekretieren für das Antigen spezifische Ig-E Antikörper, die eine hohe Affinität zu zellgebundenen Fcε-Rezeptoren aufweisen. So kommt es zur Bindung von spezifischen Ig-E Antikörpern auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten [13].

1.2.1.2 Sofortphase

Beim erneuten Allergenkontakt kommt es über Kreuzvernetzung der Ig-E Antikörper auf Mastzellen und Basophilen zur Ausschüttung von Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen. Histamin stellt dabei den wichtigsten Mediator der Sofortphase dar [9]. Außerdem kommt es zur Induktion der Produktion von Cytokinen wie IL-4 und IL-5 in verschiedenen Immunzellen, die u.a. für die allergische Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht werden [14].

Die frühe Phase der allergischen Reaktion macht sich für etwa 30-60 min durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität und eine Sensibilisierung von Nozizeptoren der Schleimhaut in Form der vorwiegenden Symptome von Niesreiz, wässrigem Sekret und nasaler Obstruktion beim Patienten bemerkbar [15].

1.2.1.3 Spätphase

Etwa 4-8 Stunden nach der frühen Phase der allergischen Typ-I Reaktion kommt es in der Spätphase durch das Einwandern verschiedener Immunzellen zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der mukosalen Entzündung [4]. Als für diesen Vorgang wichtig haben sich neben Allergen-spezifischen T-Zellen, Monozyten und Basophilen, vor allem eosinophile Granulozyten erwiesen [4]. Es kommt zur Schädigung des Epithels, zur Hyperreagibilität des Gewebes und zu einer verstärkten Gefäßdurchgängigkeit. Die bereits durch die Sofortphase ausgelösten Symptome werden aufrechterhalten, wobei nun die Entzündung der Nasenschleimhaut die nasale Obstruktion verursacht [16].

1.2.2 Allergische Rhinitis und Asthma

Zwischen den Erkrankungen der allergischen Rhinitis und Asthma bronchiale gibt es eine Reihe von epidemiologischen Zusammenhängen. So ist bekannt, dass das Risiko an Asthma

bronchiale zu erkranken durch eine vorhergehende allergische Rhinitiserkrankung um ein Vielfaches steigt [17]. Umgekehrt ist ein Großteil der Asthmatiker auch von Rhinitissymptomen betroffen [8]. Bei etwa einem Drittel der Asthmapatienten ist erwiesen, dass eine Ig-E vermittelte Typ-1 Allergie der Auslöser für die Krankheit ist (exogen-allergisches Asthma). Diese Erkenntnisse führten dazu, einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen den Erkrankungen des oberen und des unteren Respirationstrakts anzunehmen und zu ergründen.

Es wird angenommen, dass die allergische Rhinitis und das Asthma bronchiale zwei Manifestationen einer Erkrankung darstellen, die lediglich in unterschiedlichen Bereichen des Respirationstrakts auftreten. Je nach Schwere der Symptomatik treten demnach im besten Fall die allergische Rhinitis alleinig auf. Ein Übergangsstadium stellt das gleichzeitige Erscheinen von allergischer Rhinitis und einer Hyperreagibilität des Respirationstrakts dar. Im Verlaufe der Erkrankung kann es schließlich zu einem sogenannten Etagenwechsel kommen, wobei die Patienten dann neben der allergischen Rhinitis auch von Asthma bronchiale betroffen sind [18].

Eine Reihe von klinischen Parametern lässt annehmen, dass diese Komorbidität durch einen pathophysiologischen Zusammenhang erklärt werden kann. Aufgrund der lokalen Entzündung in der Nasenschleimhaut kommt es zu einem Anstieg von Entzündungsmediatoren und Immunzellen im systemischen Blutkreislauf. Als entscheidend stellt sich in diesem Krankheitsgeschehen das Cytokin IL-5 dar, welches nach nasaler Entzündungsreaktion im Knochenmark zu einer verstärkten Produktion und Freisetzung von eosinophilen Granulozyten führt. So konnten Beeh et al. nach nasaler Provokation mit Allergenen bei Patienten erhöhte Plasmaspiegel an IL-5 nachweisen, die mit einer Erhöhung von Eosinophilen im Sputum einhergingen [19]. Im Gegenzug wurden von Braunstahl et al. nach bronchialer Allergenprovokation von Patienten mit allergischer Rhinitis signifikant erhöhte Konzentrationen an IL-5 in nasalen Epithelzellen gemessen und zusätzlich als klinischer Parameter eine nasale Obstruktion ermittelt [20]. Somit wurde der physiologische Kontext der Erkrankung auch durch eine erzeugte Entzündungsreaktion in der Bronchialschleimhaut, die sich in nasalen Symptomen bemerkbar macht, nachgewiesen. Diese Untersuchungen lassen also stark annehmen, dass ein Zusammenhang zwischen allergischen Erkrankungen des oberen und unteren Respirationstrakts besteht, welcher durch systemische Immunreaktionen zustande kommt.

1.2.3 Pharmakotherapie der allergischen Rhinitis

Neben den intranasalen Glucocorticoiden stellen H₁-Antihistaminika die wichtigste Wirkstoffgruppe in der Therapie der allergischen Rhinitis dar. Hierbei kommen orale

Antihistaminika wie z.B. (Des-)Loratadin, (Levo-)Cetirizin, Azelastin und Ebastin zum Einsatz. Diese Wirkstoffe der zweiten Generation zeigen keine bis minimale sedative Effekte, sind gegenüber allen Symptomen der allergischen Rhinitiserkrankung wirksam und zeichnen sich durch einen raschen Wirkeintritt aus. Jedoch sind sie bei der Therapie der nasalen Obstruktion im Vergleich zu den intranasalen Glucocorticoiden weniger effektiv. Die allergische Therapie mit H₁-Antihistaminika kann auch lokal in der Nase mit Azelastin oder Levocabastin erfolgen. Zur lokalen Therapie der brennenden und juckenden Augen einer Begleitkonjunktivitis kommen auch Augentropfen mit Azelastin, Levocabastin oder Olopatadin zum Einsatz [8,9].

Nedocromil und Chromoglycinsäure stellen Antiallergika dar, die neben der nasalen Anwendung vor allem zur okularen Therapie eingesetzt werden. Als nachteilig für die Compliance des Patienten stellt sich bei Cromoglicinsäure die Notwendigkeit der viermal täglichen Anwendung dar.

Bei einer starken Obstruktion können auch Dekongestiva eingesetzt werden. Neben der oralen Gabe mit einer relativ hohen Nebenwirkungsrate können über eine kurze Zeit und parallel zur Einleitung einer Therapie mit anderen Arzneistoffgruppen nasale Sympathomimetika wie Oxymetazolin und Xylometazolin eingesetzt werden.

Der Einsatz von Leukotrienantagonisten wie Montelukast oder von Anticholinergika wie Ipratropiumbromid spielt in der Therapie der allergischen Rhinitis eine eher untergeordnete Rolle.

In schweren Fällen einer allergischen Rhinitiserkrankung kann man auf eine kurzzeitige Therapie mit Glucocorticoiden, die peroral oder intramuskulär verabreicht werden, zurückgreifen. Von einer längeren systemischen Anwendung von Glucocorticoiden sollte aufgrund bekannter Risiken abgesehen werden [8,9].

1.3 Pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften intranasaler Glucocorticoide

Die intranasale Applikation mit Glucocorticoiden stellt die effektivste Therapie der allergischen Rhinitis sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern dar. Es handelt sich durch die topische Applikation und die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften gerade der modernen Wirkstoffe um eine überaus sichere Therapie [8]. In der Regel werden die nasalen Glucocorticoidformulierungen als wässrige Suspensionen appliziert. Die Wirkstoffe zur nasalen Therapie unterscheiden sich von den systemisch angewendeten Glucocorticoiden vor allem in der Lipophilie, die durch unterschiedliche Strukturmerkmale zustande kommen.

1.3.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Die Grundstruktur, auf die alle Glucocorticoide zurückzuführen sind, ist ein Steran, welches aus drei sechsgliedrigen und einem fünfgliedrigen Kohlenstoffring zusammengesetzt ist. Cortisol als physiologisches Corticoid hat als für die Wirkung essentielle Merkmale eine Ketogruppe an C₃, eine ungesättigte Doppelbindung zwischen C₄ und C₅, eine Hydroxylgruppe an C₁₁ sowie eine Ketogruppe an C₂₀ (siehe *Abbildung 2*). Eine Verstärkung der corticoiden Wirkung kann durch die Einführung einer Doppelbindung in Position 1 und 2 erreicht werden, wobei gleichzeitig die mineralocorticoide Wirkung abnimmt. Als ebenso wirkverstärkend hat sich eine Hydroxylgruppe an C₁₇ in α -Stellung herausgestellt. Die Einführung von Halogenatomen an den Positionen 6 und 9 steigern die corticoide Wirkung, während eine Methylgruppe in Position 16 zur Aufhebung der mineralocorticoiden Wirkung führt [21,22].

Variationen an den Positionen C₁₆, C₁₇ und C₂₁ führen bei den topisch applizierten Glucocorticoiden zu den größten strukturellen Unterschieden, die sich auch in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Substanzen widerspiegeln [23]. So kommt es durch die Acetalstruktur des Triamcinolonacetons und Budesonids an C₁₆, C₁₇ zur Erhöhung der Lipophilie und somit zur verbesserten topischen Aktivität [22].

Die Struktur des Mometasonfuroats (MF) zeichnet sich vor allem durch die 21-Chlor 17(2`furoat)-Gruppe aus. Fluticasonpropionat (FP) besitzt dagegen an Position 17 einen Fluormethylthioester in β -Stellung und einen Propionatester in α -Stellung. Zur Kombination der Merkmale an Position 17 von FP und MF kommt es beim Fluticasonfuroat (FF), wobei der Fluormethylthioester in 17 β -Stellung mit dem Furoatester in 17 α -Stellung einhergehen. Die durch diese Strukturmerkmale erreichte Erhöhung der Lipophilie des gesamten Moleküls führt zu einer verbesserten Penetration in die Schleimhaut. Eine erhöhte antiinflammatorische Aktivität dieser Substanzen kommt durch eine verbesserte Rezeptoraffinität zustande, die vor allem mit den strukturellen Besonderheiten an Position 17 α begründet werden kann [21,24].

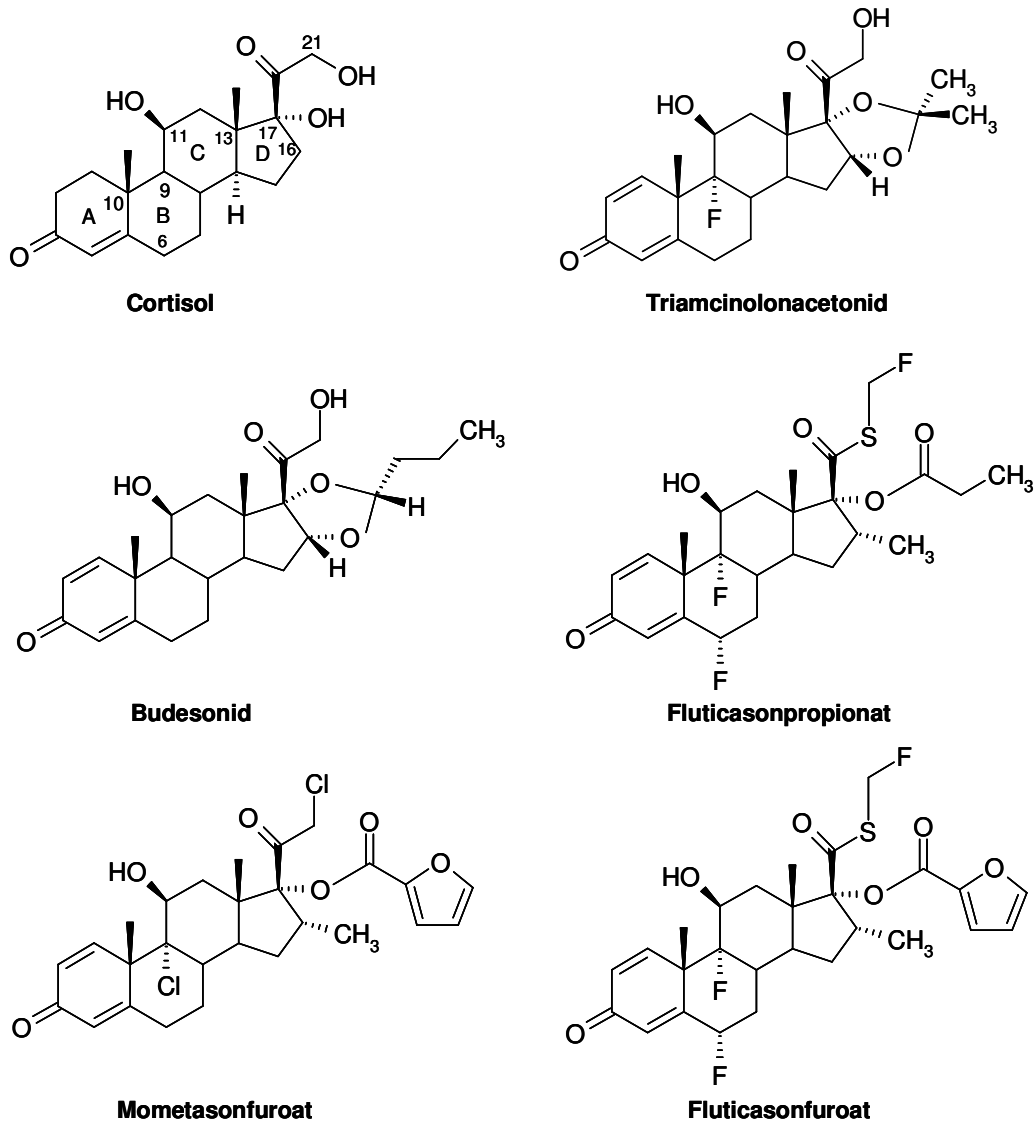


Abbildung 2: Strukturformeln von Cortisol (Hydrocortison) sowie Glucocorticoiden zur intranasalen Therapie

1.3.2 Pharmakokinetische Eigenschaften

Das Schicksal eines nasal applizierten Glucocorticoids ist maßgeblich von den Wirkstoffeigenschaften, der Arzneiform und den physiologischen Gegebenheiten des Applikationsorts, abhängig. Die Wirkstoffe werden als wässrige Glucocorticoid-Suspensionen auf der nasalen Mukosa appliziert. Die Verwendung eines Dosierpumpsprays als Applikationsgerät gewährleistet eine ausreichende Verteilung und Deposition des Wirkstoffs in der Nasenhöhle. Der ungelöste Arzneistoff muss nun zunächst im begrenzt vorhandenen Nasensekret auf der Schleimhaut gelöst werden, ehe er in die entzündete Epithelschicht und tieferliegende Gewebereiche absorbiert werden kann. Die Lipophilie der Wirkstoffe ist bestimmend für die Löslichkeit auf der Mukosa, die Penetration in die Schleimhaut, aber auch für die Retention der Corticoide im Nasengewebe [25].

Es wird angenommen, dass mit etwa 50-70 % der größte Teil der applizierten Dosis im Gastrointestinaltrakt verschluckt wird, während etwa 30-50 % in den Schleimhautbereichen der Nase deponiert werden [26]. Die Glucocorticoidkristalle haben allerdings nur eine begrenzte Zeit von ca. 20-30 min, um sich im nasalen Mukus aufzulösen [5], da die mukoziliäre Clearance dafür sorgt, dass deponierter, ungelöster Wirkstoff vor allem in den hinteren Bereichen der Nasenhöhle effektiv in den Rachenraum transportiert wird. Je nach Glucocorticoid kommt es beim verschluckten Wirkstoffanteil bereits im Gastrointestinaltrakt zur Inaktivierung bzw. aufgrund des first pass Effekts zu einer effektiven Eliminierung bei der ersten Leberpassage [22].

Die Bioverfügbarkeit intranasal applizierter Glucocorticoide hängt deshalb zum einen vom nasal absorbierten Wirkstoff ab, der unter Umgehung der Leber den systemischen Kreislauf erreicht, zum anderen von der gastrointestinal absorbierten Substanzmenge, die nicht präsystemisch eliminiert wird (siehe *Abbildung 3*). So liegt die systemische Bioverfügbarkeit nach nasaler Applikation am höchsten bei den älteren Substanzen wie Flunisolid (Flu; $F = 49\%$, [27]), Triamcinolonacetonid (TCA; $F = 46\%$ [26]), Beclomethasondipropionat (BDP; $F = 44\%$, ermittelt durch Messung der Plasmakonzentration des aktiven Metaboliten 17-Beclomethasonmonopropionat (17-BMP) [28]) und Budesonid (Bud; $F = 29\%-34\%$ [29-31]). Die relativ hohe systemische Verfügbarkeit der genannten Wirkstoffe ist bei Flu, TCA und Bud durch ihre bessere Wasserlöslichkeit sowie ihren geringeren first pass Effekt im Vergleich zu FP, MF und FF zu erklären. So wird bei TCA und Bud bei der ersten Leberpassage ca. 90 % metabolisiert [26]. BDP stellt hingegen ein Prodrug mit einer relativ geringen Wasserlöslichkeit dar, welches erst im Zielgewebe durch Esterasen, in das im Vergleich zur Muttersubstanz wesentlich aktivere 17-BMP umgewandelt wird. Der aktive Metabolit 17-BMP wird auch verstärkt aus dem GI-Trakt absorbiert [32]. Die weitere Metabolisierung des 17-BMP verläuft

hingegen teilweise extrahepatisch und relativ langsam, was die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Wirkungen im Organismus erhöht [28,33].

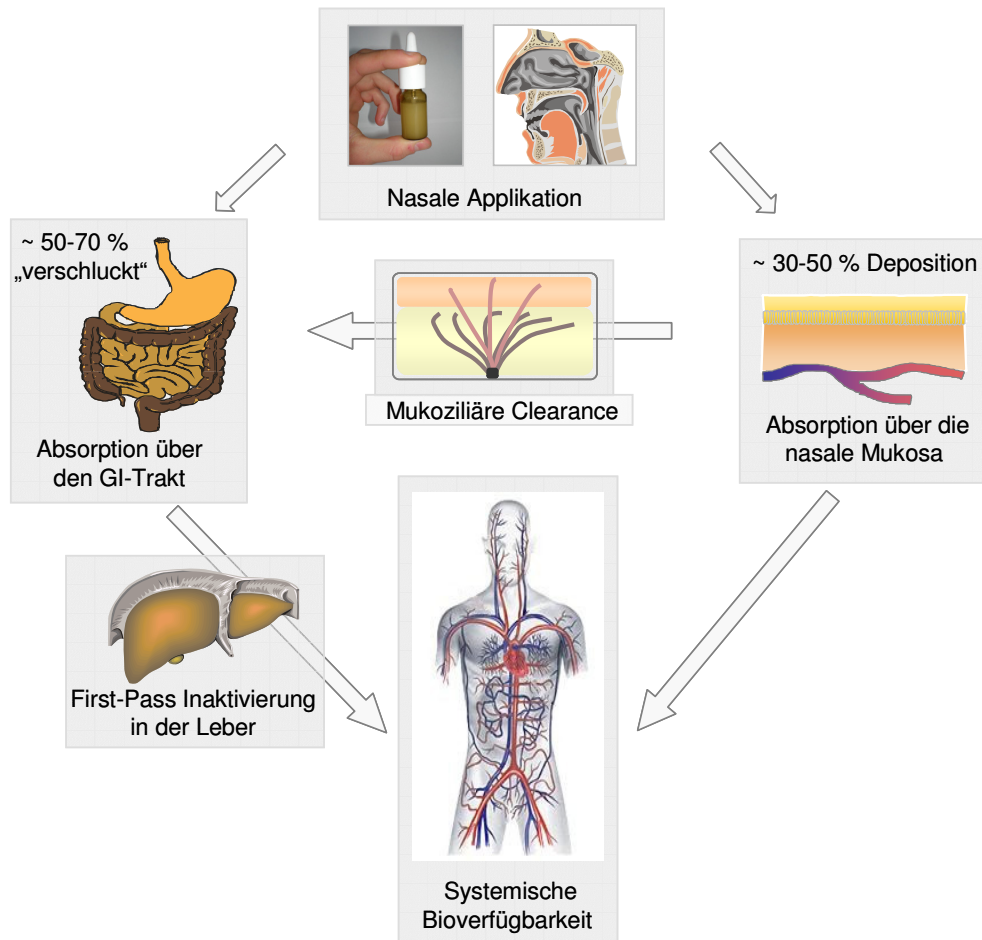


Abbildung 3: Pharmakokinetik einer nasalen Glucocorticoid-Applikation. Nach der Applikation einer wässrigen Glucocorticoid-Suspension werden ~ 30-50 % auf der Nasenschleimhaut deponiert, während ~ 50-70 % verschluckt werden [26]. Die mukoziliäre Clearance transportiert deponierte ungelöste Wirkstoffkristalle in den Rachenraum. Die erste Leberpassage sorgt für eine effektive Inaktivierung des im Gastrointestinaltrakt absorbierten Glucocorticoids und begrenzt die systemische Bioverfügbarkeit. Der Wirkstoffanteil, der über die nasale Mukosa absorbiert wird, gelangt direkt in die systemische Zirkulation (Abbildung modifiziert nach [29]).

Bei den modernen Corticoiden wie FP ($F = < 1\%$ [29,34]), MF ($F = \leq 0.1\%$ [35]) und FF ($F = 0.5\%$ [36]) werden dagegen nach nasaler Applikation einer definierten Dosis nur sehr geringe Plasmakonzentrationen erreicht. So sind bei den genannten Wirkstoffen als Erklärung für die geringe Bioverfügbarkeit ihre geringe Wasserlöslichkeit sowie ihr sehr ausgeprägter first pass Metabolismus zu nennen, der bei FP und MF mit 99 % angegeben wird [37]. Eine geringe nasale Bioverfügbarkeit ist erwünscht, da dadurch die Wahrscheinlichkeit für systemische Nebenwirkungen verringert wird.

Derzeit befindet sich auch noch Dexamethason-dihydrogenphosphat-Dinatrium auf dem Markt, welches mit ca. 90 % eine hohe systemische Verfügbarkeit aufweist und in der Therapie praktisch keine Rolle mehr spielt [38].

In der Regel sorgt die Leber für einen äußerst effizienten Metabolismus von Glucocorticoiden mit Clearance-Raten, die ungefähr dem hepatischen Blutfluss entsprechen. Die hepatische Verstoffwechslung führt schließlich zu pharmakologisch inaktiven Metaboliten, die renal und biliär eliminiert werden [39].

1.3.3 Pharmakodynamische Eigenschaften

Die Therapie mit intranasalen Glucocorticoiden sorgt nicht nur für eine Besserung aller nasalten Symptome der allergischen Rhinitis, auch eine Linderung der okularen Symptome einer Begleitkonjunktivitis, wie sie oft bei einer Pollenallergie auftreten, wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen [40,41].

Aufgrund ihres Wirkmechanismus dauert es einige Stunden, bis ein klinischer Effekt der Corticoide nachgewiesen werden kann. Die volle Wirksamkeit allerdings tritt erst bei regelmäßiger Anwendung über mehrere Tage ein [8]. Der effektive Wirkmechanismus, die lange Wirksamkeit, die dazu führt, dass bei den Wirkstoffen der neuen Generation eine einmal tägliche Anwendung ausreicht sowie die gute Verträglichkeit und Arzneimittelsicherheit haben dazu geführt, dass die intranasalen Glucocorticoide eine Schlüsselrolle in der Therapie der allergischen Rhinitis innehaben.

1.3.3.1 Molekularer Wirkmechanismus

Der genomische Wirkmechanismus wird neben nichtgenomischen Effekten hauptsächlich für die positiven Eigenschaften bei entzündlichen Prozessen von allergischen Erkrankungen verantwortlich gemacht [10]. Die Corticoide diffundieren dabei durch die Zellmembran und binden an den cytoplasmatischen Glucocorticoidrezeptor. Die Affinität der unterschiedlichen

Glucocorticoide zum Glucocorticoidrezeptor unterscheiden sich zum Teil erheblich und legen ihre intrinsische Aktivität fest. So korreliert die relative Rezeptoraffinität mit der antiinflammatorischen Aktivität der jeweiligen Wirkstoffe [42].

Die Bindung des Glucocorticoids an den Rezeptor führt zur Abspaltung zweier Hitzeschockproteine (heat shock proteins) hsp 70 und hsp 90 sowie Immunophilin und zur Rezeptoraktivierung. Die DNA-Bindungsregion des Rezeptors liegt nun frei, es kommt zur Dimerbildung des Steroid-Rezeptorkomplexes und zur Translokation in den Zellkern. Dort erfolgt eine Bindung an bestimmte DNA Bereiche, die für die Regulation der Gentranskription zuständig sind. So kann es zum einen zur Förderung der Gentranskription an sog. „glucocorticoid responsive elements“ (GRE) kommen, was beispielsweise zur Förderung der Synthese von antiinflammatorischen Proteinen wie I κ B, Annexin A1 und IL-10 oder regulatorischen Proteinen beiträgt. Dieser Vorgang wird Transaktivierung genannt [43,44].

Daneben kann der Rezeptorkomplex eine Transrepression herbeiführen. Dies kann einmal durch eine Kompetition mit Koaktivatoren von Transkriptionsfaktoren stattfinden. Daneben kann auch durch direkte Protein-Protein Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie NF κ B (nuclear factor „kappa light chain enhancer“ of activated B-cells) oder AP-1 die Expression proinflammatorischer Proteine vermindert werden. Bei der Bindung des Glucocorticoidrezeptor-Komplexes an „negative glucocorticoid responsive elements“ (nGRE) in der Promotorregion eines entsprechenden Gens kommt es zur direkten Gentranskriptionshemmung bestimmter hormonaktiver Peptide und Enzyme [43,44]. Die Mehrzahl proinflammatorischer Proteine werden allerdings unabhängig vom Vorhandensein eines nGRE durch Glucocorticoide herunterreguliert [45].

Neben den genomischen Effekten auf molekularer Ebene sind nichtgenomische Effekte der Wirkstoffklasse der Glucocorticoide bekannt, die allerdings bei der lokalen Therapie der allergischen Rhinitis aufgrund des entzündlichen Charakters der Erkrankung von vernachlässigbarer Bedeutung sind und deren klinische Relevanz bislang nicht belegt wurde. Dies macht sich bei der Betrachtung des Wirkeintritts zur klinischen Besserung von Symptomen nach intranasaler Applikation von Glucocorticoid-Suspensionen bemerkbar. So kann bei den meisten Patienten frühestens nach etwa fünf bis neun Stunden mit einer signifikanten Besserung von klinischen Symptomen gerechnet werden [8,46]. Den maximalen Effekt der Glucocorticoidwirkung erfahren Patienten mit allergischer Rhinitis, je nach Schwere der Symptomatik, allerdings erst nach regelmäßiger Anwendung über mehrere Tage [8,33]. Tillmann et al. untersuchten einen nichtgenomischen Effekt von Glucocorticoiden in der Therapie der saisonalen allergischen Rhinitis, den sie durch eine Wirkung in sehr kurzer Zeit nach der Applikation postulierten. Allerdings wurde in dieser Studie Betamethason intravenös

verabreicht. Demnach trat bereits nach 10 min eine signifikante Linderung des Juckreizes bei Patienten im Vergleich zur Placebogabe ein [47]. So bleibt dennoch fraglich inwieweit nichtgenomische Effekte zur Symptombesserung von allergischen Rhinitiden nach intranasaler Gabe von Glucocorticoiden beitragen.

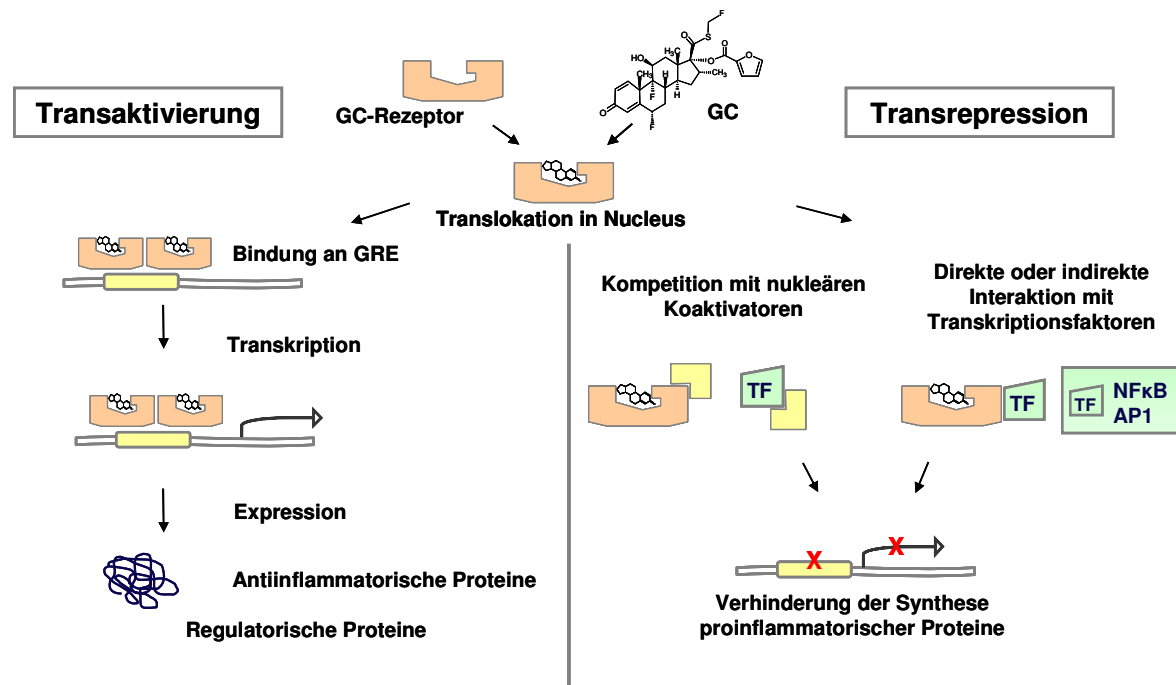


Abbildung 4: Schematische Darstellung des genomischen Wirkmechanismus der Glucocorticoide. Nach Binden des Glucocorticoids (GC) an den GC-Rezeptor kommt es zur Rezeptoraktivierung. Bei der Transaktivierung kommt es nach Homodimerbildung und Translokation in den Nucleus zur Förderung der Synthese antiinflammatorischer und regulatorischer Proteine. Die Transrepression führt hingegen vorwiegend durch Protein-Protein-Interaktionen zu einer verminderten Synthese proinflammatorischer Proteine [45]. (GC – Glucocorticoid, GRE – glucocorticoid responsive element, TF – Transkriptionsfaktor, NFκB – nuclear factor “kappa light chain enhancer” of activated B cells, AP – activator protein) (Abbildung modifiziert nach [44]).

1.3.3.2 Sicherheit intranasaler Glucocorticoide

Die nasale Applikation mit Corticosteroiden führt bei 5-10 % der Patienten zu lokalen Nebenwirkungen, die sich durch eine trockene Schleimhaut oder in einem brennenden und

stechenden Gefühl in der Nase äußert [25]. Bei etwa 5 % der Patienten tritt Nasenbluten auf. Diese Effekte treten bei allen Substanzen im gleichen Maße auf und sind mit dem lokalen Nebenwirkungsprofil von Placeboformulierungen vergleichbar [26]. Die Befürchtung, eine Langzeittherapie mit nasalen Corticoiden könnte eine Atrophie der Schleimhaut hervorrufen, konnte durch eine Reihe von Langzeitstudien auch für die modernen Wirkstoffe widerlegt werden [25,48]. Bedenken gegenüber einem negativen Einfluss von intranasalen Glucocorticoiden auf die mukoziliäre Clearance haben sich in *in vivo* Studien auch in der Langzeittherapie nicht bestätigt [49]. Lediglich *in vitro* Studien legten den Schluss nahe, dass das Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid, welches bei nasalen Corticoidformulierungen häufig Verwendung findet, die Zilienfunktion beeinträchtigt. Dies wurde jedoch bei der *in vivo* Untersuchung mit nasal appliziertem Benzalkoniumchlorid nicht bestätigt. Für diese Datenlage werden zum einen protektive physiologische Faktoren diskutiert, die lediglich in einer *in vivo* Situation vorkommen, zum anderen grundlegende Diskrepanzen bei der Durchführung der *in vitro*- im Vergleich zu den *in vivo*-Studien angeführt [49].

Die Applikation intranasaler Glucocorticoide ermöglicht es, durch relativ geringe Dosen lokal ausreichende Wirkstoffkonzentrationen im Zielgewebe zu erreichen und schon allein durch die topische Anwendung die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte systemische Arzneimittelwirkungen zu minimieren. Dies hängt neben anderen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften mit der hohen hepatischen Inaktivierung bei der ersten Leberpassage zusammen, der den applizierten, aber verschluckten Wirkstoffanteil betrifft. Dennoch muss der Frage nachgegangen werden, ob gerade die hohe Rezeptoraffinität der nasalen Glucocorticoide und die damit verbundene hohe Wirksamkeit die Wahrscheinlichkeit für systemische Nebenwirkungen erhöht.

Die Frage nach Bedenken zur systemischen Sicherheit kann dabei zunächst grundsätzlich bezüglich der systemischen Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe betrachtet werden. So stehen die modernen Wirkstoffe wie FP, MF und FF mit teilweise kaum messbaren Plasmakonzentrationen nach nasaler Applikation von wässrigen Formulierungen den Substanzen TCA, Bud, BDP mit relativ hohen systemischen Bioverfügbarkeiten gegenüber (siehe 1.3.2). Doch selbst geringe Plasmakonzentrationen der Wirkstoffe mit hoher Rezeptoraffinität könnten potentiell Nebenwirkungen hervorrufen, wodurch *in vivo* Untersuchungen der unerwünschten Arzneimittelwirkungen der einzelnen Substanzen zur Beurteilung der Sicherheit der nasalen Glucocorticoide unablässig sind.

Hierbei kann der Einfluss der applizierten Glucocorticoide auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA) untersucht werden, um einen Einfluss auf die körpereigene Cortisolproduktion festzustellen. So ergaben die einmal morgendliche intranasale

Applikation von Normdosen an TCA, Bud, BDP, FP, MF und FF über mehrere Wochen keinen Hinweis auf eine signifikante Beeinflussung der basalen HHNA Funktion [29].

Neben der Beurteilung der Arzneimittelsicherheit bei Erwachsenen spielt gerade eine mögliche Beeinflussung des Wachstums bei einer Anwendung von intranasalen Glucocorticoiden bei Kindern eine wichtige Rolle und stellt einen klinisch relevanten Zusammenhang her. Dabei können neben der Kurzzeitmessung der Länge des Unterschenkels (Knemometrie) zwischen Knie und Ferse auch Messungen der Körpergröße über einen längeren Zeitraum herangezogen werden, um den Einfluss einer Corticoidmedikation auf das Längenwachstum von Kindern festzustellen [29].

So wurde in einer randomisierten, doppelblinden, placebo-kontrollierten Studie mit Kindern, die an ganzjähriger allergischer Rhinitis litten, mit MF über 12 Monate therapiert und bei einer einmal täglichen Applikation von 100 bzw. 200 µg kein Einfluss auf das Wachstum von Kindern beobachtet [50]. Die Sicherheit von FF wurde durch eine knemometrische Untersuchung durch Gradman et al. untersucht, wobei eine zweiwöchige Behandlung mit 110 µg/d keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Unterschenkels im Vergleich zu Placebo hatte [51]. Auch für weitere Wirkstoffe wie TCA (Dosis zur Symptomkontrolle angepasst), Bud (64 µg/d) und FP (200 µg/d) liegen Langzeituntersuchungen über ein Jahr vor, die verglichen mit einer Placebogruppe keinen Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit ergaben, was die Sicherheit dieser intranasalen Glucocorticoide unterstreicht [52-54].

In einer placebo-kontrollierten Studie allerdings wurde bei der Anwendung einer zweimal täglichen Dosis von 168 µg Beclomethasondipropionat über ein Jahr eine statistisch signifikante Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit bei Kindern mit einer Differenz von 0.9 cm an Körpergröße zwischen den Behandlungsgruppen ermittelt [55]. Hier ist anzunehmen, dass pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften, allen voran die hohe systemische Bioverfügbarkeit des intranasal applizierten BDP, als Erklärung für das Studienergebnis anzumerken sind [32]. Daneben ist die eingesetzte relativ hohe Dosis zu nennen, die neben einer morgendlichen eine abendliche Applikation beinhaltet, und zu dieser Wachstumsverzögerung beitrug. Deshalb wird in den Fachinformationen der intranasalen Glucocorticoide gerade bei einer Langzeitanwendung bei Kindern empfohlen, die niedrigste Dosis zur effektiven Kontrolle der Symptome einzusetzen [36]. Außerdem ist die einmal tägliche morgendliche Anwendung aufgrund des körpereigenen zirkadianen Rhythmus der Cortisolausschüttung, die ein Maximum in den frühen Morgenstunden aufzeigt, einer zweimal täglichen Applikation vorzuziehen [29].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik intranasaler Glucocorticoide wie TCA, Bud, BDP, FP, MF und FF stellt einen komplexen Zusammenhang verschiedener Aspekte dar, die einen Einfluss auf die Effektivität und Sicherheit der Therapie der allergischen Rhinitis hat.

Es sollten daher *in vitro* und *ex vivo* Modelle entwickelt und etabliert werden, die die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften intranasaler Glucocorticoid-Suspensionen in einen physiologischen Kontext stellen.

Dabei war der Blick zunächst auf die handelsüblichen Wirkstoffformulierungen gerichtet, wobei der in der Suspension bereits gelöste Glucocorticoidanteil sowie das Volumen eines Sprühstoßes der entsprechenden Dosierungsvorrichtungen bestimmt werden sollte.

Weiter war es das Ziel, die einzelnen pharmakokinetischen Zusammenhänge nach der Wirkstoffapplikation wie die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Arzneiform, die Löslichkeit der Wirkstoffkristalle in Nasensekret, die Bindung der Wirkstoffe an humanes Nasengewebe und die Umverteilung in das Blutkompartiment darzustellen und zu quantifizieren.

Schließlich sollten Modelle entwickelt werden, die durch physiologisch nahe Simulation pharmakokinetische Vorgänge mit pharmakodynamischen Fragestellungen der antiinflammatorischen Aktivität intranasaler Glucocorticoide verknüpfen.

B Allgemeiner Teil

1 Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils handelsüblicher Suspensionen zur intranasalen Applikation

Glucocorticoide zur intranasalen Anwendung werden in der Regel als wässrige Suspensionen eingesetzt. Aufgrund der schweren Wasserlöslichkeit der topischen Corticosteroide wurden diese ursprünglich als Treibgas-Dosieraerosole entwickelt [56]. Die Anwendung dieser Dosiereinheiten führte jedoch aufgrund der hohen linearen Geschwindigkeit des Aerosols an der Öffnung des Dosierkopfes zu einer schlechten Verteilung des Wirkstoffs in der Nasenhöhle, wobei der Wirkstoff hauptsächlich im vorderen nicht zilientragenden Drittel der nasalen Kavität deponiert wurde. So erreichten hierbei nur ca. 20 % der applizierten Arzneistoffmenge die zilientragende Schleimhaut, was, wie Newman et al. feststellen konnten, auch einem erheblichen Anteil des Wirkstoffs zuzuschreiben war, der in der Düse des Applikators zurückblieb [57]. Die hohen Geschwindigkeiten beim Applizieren des Aerosols bedingten zudem eine Schädigung der Nasenschleimhaut, die sich negativ auf das Nebenwirkungsmuster auswirkte. Dabei wurde häufig Nasenbluten (Epistaxis) in der unteren Nasenmuschel und im Locus Kiesselbachi, einem gefäßreichen Gebiet im vorderen unteren Teil der Nasenscheidewand, beobachtet. Diese Treibgasdosieraerosole wurden im Laufe der Jahre auch durch die bekannt gewordene Umweltproblematik mit Fluorchlorkohlenwasserstoffen (FCKW) vor allem durch wässrige Suspensionen als Dosierpumpsprays ersetzt [33,58,59].

Zu einer besseren Verteilung und Deposition in den Zielbereichen der nasalen Kavität und einer geringeren mechanischen Beeinträchtigung der Schleimhaut führt die Applikation von wässrigen Suspensionen mit Dosiersprays. So werden die Arzneistoffe Beclomethasondipropionat, Budesonid, Fluticasonpropionat, Triamcinolonacetonid, Mometasonfuroat und Fluticasonfuroat, deren physikochemische Substanzeigenschaften eine geringe Wasserlöslichkeit [42,60-62] bedingen, als Suspensions-Nasensprays eingesetzt. Die Deposition wässriger nasaler Glucocorticoidformulierungen mittels Pumpsprays findet dabei sowohl auf zilientragendes Flimmerepithel als auch in Bereichen ohne zilientragendes Epithel, zu etwa gleichen Teilen statt [57,63].

Zur Herstellung einer stabilen Suspension werden neben einem geeigneten Partikelspektrum des Wirkstoffs und dem wässrigen Dispergierungsmittel verschiedene Hilfsstoffe benötigt [64], die eine entsprechende Suspensionsgüte gewährleisten (Zusammensetzung der verwendeten Glucocorticoid-Nasensprays siehe 1.1.2 Experimenteller Teil C). Zur Verhinderung von Kristallwachstum und Sedimentation werden viskositätserhöhende Verdickungsmittel wie Cellulosederivate (z.B. Avicel® RC-591,

sprühgetrocknetes Hydrokolloid bestehend aus Mikrokristalliner Cellulose und Carboxymethylcellulose-Natrium) eingesetzt. Diese Hilfsstoffe beeinflussen das Sprühmuster der Pumpsprays und die erzeugte Tröpfchengröße. Außerdem wurde ein direkter Einfluss der Viskosität der Formulierung bezüglich der Deposition in der Nasenhöhle nachgewiesen. Dabei stellten Guo et al. fest, dass eine niedrigviskose Formulierung im Vergleich zu einer höher viskosen Zusammensetzung einer Sprühzubereitung zu einer besseren Verteilung im mittleren und hinteren Bereich einer anatomischen Nachbildung der nasalen Kavität führte, was gleichbedeutend mit der Deposition auf einer größeren Oberfläche war [65]. Neben dem Einsatz der Cellulosederivate als essentielle pharmazeutisch-technologische Komponente zur physikalischen Stabilisierung der Suspension führen diese Hilfsstoffe auch zu einer verlängerten Kontaktzeit der Arzneistoffformulierung mit der Nasenschleimhaut [66]. Eine Verbesserung der Benetzbarkeit der lipophilen Wirkstoffpartikel wird durch Solubilisatoren erreicht. Hier wird meist Polysorbat 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat), ein nichtionisches Tensid, verwendet. Peptisatoren wie Citrat stellen stark geladene Ionen dar, die durch eine gleichsinnige elektrostatische Aufladung für eine weitere Stabilisierung der Zubereitung sorgen. Um die Anfälligkeit der wässrigen Arzneiform gegenüber mikrobiellem Befall zu minimieren, werden Konservierungsmittel wie Benzalkoniumchlorid oder Kaliumsorbat in geeigneter Konzentration eingesetzt. Die Zugabe von Natriumedetat als antioxidativ wirkender Komplexbildner von Metallionen hat sich als vorteilhaft für die chemische Stabilität und Haltbarkeit der Zubereitung erwiesen. Die pH Werte wässriger Glucocorticoid-Suspensionen befinden sich in der Regel im schwach sauren Milieu (pH 4.3-6.4) [67] und werden durch Puffersysteme wie z.B. Citronensäure mit Natriumcitrat-dihydrat (Nasonex[®]) erreicht. Wird die erforderliche Osmolalität durch den in der Suspensionsformulierung enthaltenen Wirkstoff und die weiteren Hilfsstoffe unterschritten, kann sie durch den Zusatz einer geeigneten osmotisch aktiven Substanz auf den gewünschten Wert eingestellt werden. Hierzu wird häufig Glucose in entsprechender Menge zugesetzt.

Von Glucocorticoid-Suspensionen zu unterscheiden, sind intranasal anzuwendende Wirkstoffe wie Dexamethasondihydrogenphosphat-Dinatrium (Solupen[®] N Nasentropfen) und Flunisolid (Syntaris[®] Nasenspray), die in ihren Darreichungsformen gelöst vorliegen. Während Dexamethasondihydrogenphosphat-Dinatrium leicht wasserlöslich ist [68], ergibt sich bei Flunisolid ebenfalls eine relativ geringe Wasserlöslichkeit (140 µg/mL) [42]. Bei Letzterem wird durch die Zugabe der Lösungsvermittler Polyethylenglykol und Propylenglykol in ausreichender Konzentration erreicht, dass die gesamte Arzneistoffmenge einer Dosis in gelöster Form appliziert werden kann.

1.1 Fragestellung

Die Verwendung von wässrigen Glucocorticoid-Suspensionen hat neben der Gewährleistung einer stabilen Galenik einen direkten Einfluss auf die Pharmakokinetik der eingesetzten Steroide am Applikationsort. Die Auslösung eines Sprühstoßes mit einem Glucocorticoid-Nasenspray sorgt für ein Aufbringen der suspendierten Wirkstoffpartikel auf die Nasenschleimhaut. Bevor die applizierten Wirkstoffpartikel von der Oberfläche der Nasenschleimhaut in das Zielgewebe absorbiert werden können und somit den Glucocorticoidrezeptor als Zielstruktur erreichen können, muss eine Auflösung der Arzneistoffe im Nasensekret stattfinden [23,69]. Dieser Vorgang ist dabei neben den Substanzeigenschaften auch durch das geringe Volumen der Schleimhaut bedeckenden Mukusschicht begrenzt. Die Schwerlöslichkeit der nasalen Glucocorticoide, welche zum einen eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung und die Anwendung einer stabilen Suspension darstellt, führt zu der Frage, wie viel Arzneistoff in den verwendeten handelsüblichen Suspensionsformulierungen (siehe 1.1.2. Experimenteller Teil C) bereits gelöst vorliegt. Denn nur dieser Wirkstoffanteil steht nach der Applikation der Dosis sofort zur Absorption ins Zielgewebe bereit. So ist für den bereits gelöst vorliegenden Glucocorticoidanteil denkbar einen schnelleren Effekt im entzündeten Gewebe hervorzurufen, jedoch auch eine unerwünschte schnellere systemische Absorption zu bewirken.

Wichtige Faktoren, die die Löslichkeit eines Arzneistoffes beeinflussen, sind die Temperatur, der Ordnungszustand der Kristalle, die Partikelgröße, die Partikelform, die Partikelaggregation und die Benetzung [70-72]. Neben den Stoffeigenschaften sind bei den vorliegenden Arzneiformen auch Einflüsse durch die Herstellungstechnik und die Hilfsstoffzusammensetzung zu beachten. Bei Suspensionen kommt es zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen gelöster und ungelöster Substanz, was zu einer maximalen Sättigung mit Arzneistoff im Überstand führt. Die Sättigungslöslichkeit c_s ist definiert als die maximale Masse eines Stoffes, die bei einer bestimmten Temperatur und einem bestimmten Lösungsmittel gelöst werden kann [73].

Ziel war es, zum ersten Mal die Glucocorticoidkonzentrationen im Überstand wässriger handelsüblicher nasal anzuwendender Suspensionsformulierungen zu bestimmen. Dies erlaubt eine Beurteilung möglicher Einflussfaktoren auf die Sättigungslöslichkeit der untersuchten Wirkstoffe. Dabei sollte eine Methode entwickelt werden, die es unter Berücksichtigung der physikochemischen Eigenschaften der Substanzen ermöglicht, eine effektive Trennung des gelösten Glucocorticoidanteils von der Suspensionsformulierung vorzunehmen.

1.2 Prinzip der Bestimmung des bereits gelösten Glucocorticoidanteils

1.2.1 Methodenentwicklung

Die Zusammensetzung der Suspensionsformulierungen sowie die durch die Cellulosederivate hervorgerufene hohe Viskosität und komplexe Matrix der Arzneiform lässt eine direkte Bestimmung des gelösten Glucocorticoids im Überstand nicht zu. Die Galenik der Präparate, die den Arzneistoffformulierungen thixotrope Eigenschaften verleihen, verhindert eine schnelle und zuverlässige Sedimentation der ungelösten Partikel durch Zentrifugation.

Eine bislang in der Literatur beschriebene Methode zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Budesonid in Wasser bzw. verschiedenen Modellflüssigkeiten bei 37 °C wurde von Pham et al. beschrieben [62]. Zur Bestimmung der Löslichkeit in der wässrigen Phase wurden Mikrokristalle des Arzneistoffs mit einem mittleren Teilchendurchmesser (MMAD, mass median aerodynamic diameter) von 1 µm in Dialysiereinheiten (MWCO 10000 Da) mit der Testflüssigkeit für 48 h inkubiert und anschließend durch Vermessung einer Probe der äußeren Lösung UV-photometrisch vermessen.

Neben der Gleichgewichtsdialyse, die einen hohen Zeitaufwand mit sich bringt, wird häufig zur Löslichkeitsbestimmung das Prinzip der Filtration verwendet. Dabei wird das zu analysierende Glucocorticoid eine gewisse Zeit bei einer gewünschten Temperatur im Lösungsmittel unter Schütteln inkubiert. Nach Auflösung der Kristalle bis zum Sättigungsgleichgewicht werden die Proben durch Sterilfilter mit Porengrößen zwischen 0.22-0.45 µm geleitet und die sich im Filtrat befindliche Menge an Arzneistoff quantitativ bestimmt [60,61,74].

Bei der Entwicklung der Methode zur Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils wässriger Suspensionsformulierungen waren durch die geschilderte Problemstellung vor allem methodische Eigenschaften wie Effektivität der Substanztrennung, Durchführbarkeit im kleinen Maßstab und Validität der Ergebnisse gefordert. Voraussetzung war hierbei eine vollständige Abtrennung der ungelösten Wirkstoffkristalle und Hilfsstoffe. Deshalb wurde eine zeiteffiziente Filtration der Suspension entweder in Form einer Sterilfiltration mit gängigen Sterilfitereinheiten (0.22 µm Porengröße) oder einer Ultrafiltration mittels Zentrifugation in Erwägung gezogen.

Ein Problem bei der Durchführung der Filtration der viskosen Matrix der Suspensionen stellte dabei ein schnelles Verstopfen der Filtermembran dar. Außerdem musste durch die hohe Lipophilie der eingesetzten Wirkstoffe mit einer nichtspezifischen Bindung der Arzneistoffmoleküle an die Filtrationsmembran gerechnet werden. Die Verwendung von Sterilfitereinheiten stellte sich hierbei als ungeeignet für die vorliegende Fragestellung heraus.

Gründe waren ein Verstopfen der Poren der Filtereinheiten direkt nach Beginn der Filtration der Formulierung, wodurch in der Folge häufig die Sterilfiltermembran durch zu hohe aufgebrachte Drücke zerstört wurde. Aufgrund der großen Membranoberfläche mussten unpraktikabel große Volumina an entsprechendem Handelspräparat eingesetzt werden, um die für die Analytik benötigte Menge an Filtrat zu erhalten. Zudem wurde hierbei eine nicht reproduzierbare nichtspezifische Bindung an das Material des Sterilfilters beobachtet, was wohl ebenso der Großflächigkeit der Filtermembran zuzurechnen ist.

Deshalb wurde die Ultrafiltrationstechnik mit Microcon[®]-Ultrazentrifugaleinheiten in Betracht gezogen und in der Folge eine geeignete Methode entwickelt. Diese führte zu einer effektiven Filtration im kleinen Maßstab, verhinderte ein frühes Verstopfen der Filterporen und ermöglichte eine reproduzierbare Bestimmung der nichtspezifischen Bindung.

1.2.2 Prinzip der Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration handelt es sich um ein druckgetriebenes Membranverfahren, welches in der Biotechnologie zur Abtrennung makromolekularer Substanzen dient und allgemein zur Abtrennung aller nicht echt gelösten Bestandteile (Partikel, Mikroorganismen) eingesetzt wird. Der Trennbereich der Ultrafiltration, d.h. die Größe der abzutrennenden Partikel bzw. Moleküle, liegt ca. zwischen 0.01 und 0.1 μm Partikel- bzw. Molekülgröße bei einer transmembranen Druckdifferenz zwischen 0.5 und 10 bar [75]. Diese Filtrationsmethode steht damit zwischen den Filtrationsverfahren der Mikrofiltration und Filtration einerseits und Nanofiltration und Umkehrosiose andererseits (siehe *Abbildung 5*). Neben dem teilchen- bzw. molekülgrößenabhängigen Rückhalt der Filtrationsmembran beeinflussen auch die Molekülgestalt und Wechselwirkungen zwischen Membran und den zu trennenden Molekülen den Vorgang der Filtration [75].

Das Verfahren der Ultrafiltration basiert auf der porenbasierten Filtration. Ein einfacher poröser Filter mit einer definierten Porengröße sorgt für ein Zurückhalten der Partikel. Die Bildung eines Filterkuchens auf der Membran führt wie bei allen Filtrationsprozessen zur Bildung einer Deckschicht und damit zu einer zusätzlichen Filtrationswirkung. Diese Trenneigenschaften der Ultrafiltration stellten somit eine geeignete Grundlage dar zur Anwendung für die vorliegende Fragestellung [75].

Zum Einsatz kamen Microcon[®]-Ultrafiltrationseinheiten bestehend aus einem Probenreservoir (Polycarbonat) mit Filtrationsmembran (Ultracel YM-10, regenerierte Cellulose) und einem Probenauffanggefäß (Polypropylen) zum Sammeln des Filtrats (siehe *Abbildung 6*).

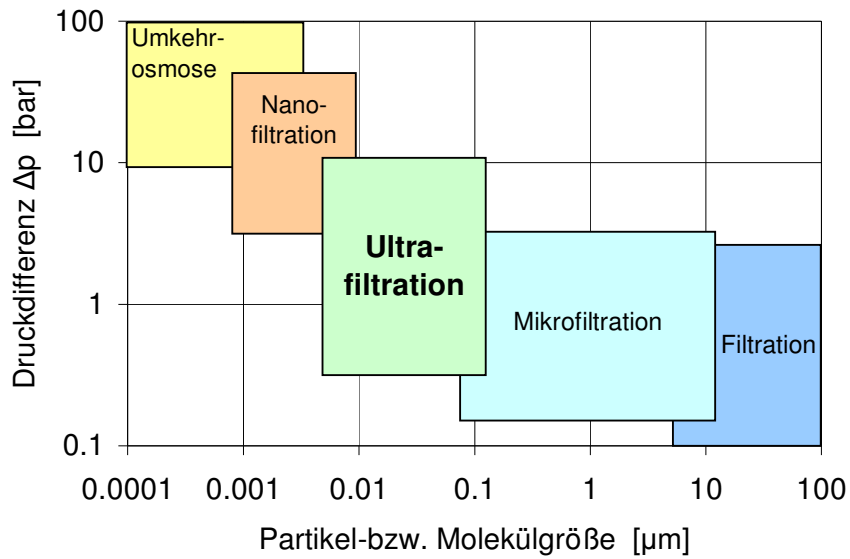


Abbildung 5: Einordnung druckgetriebener Membranverfahren bezüglich des Arbeitsbereiches Druck [bar] und Partikel- bzw. Molekülgröße [μm] (Abbildung modifiziert nach [75]).

Die molekulare Trenngrenze (molecular weight cut-off, MWCO) der verwendeten Einheit betrug 10000 Da. Diese Angabe dient der Charakterisierung der Filtermembran und zeigt die Grenze an, bei der 90 % bzw. 95 % der Moleküle einer bestimmten Molmasse zurückgehalten werden. Der Ultrafiltrationsschritt wird mit Hilfe des durch die Zentrifugalkraft einer Zentrifuge erzeugten Druckes auf die Filtrationsmembran in einer zeiteffizienten Weise ermöglicht.

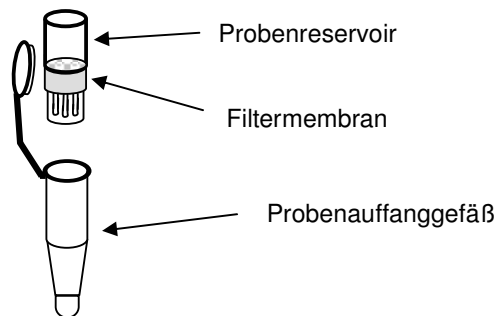


Abbildung 6: Schematische Darstellung der verwendeten Ultrafiltrationseinheit

1.2.3 Durchführung der Ultrafiltration

Durch die Entnahme einer homogenen Arzneistoffformulierung aus der Nasensprayzubereitung (siehe 1.1.3 Experimenteller Teil C) erfolgte die Bereitstellung der jeweiligen Glucocorticoid-Suspension für die folgenden Arbeitsschritte. Dabei waren je Versuchsansatz insgesamt 3 Filtrationsschritte vorgesehen. Die beiden ersten Zentrifugationsschritte dienten der Vorbereitung der Filtermembran und umfassten jeweils die gleiche Menge an Suspension. Dieses Vorgehen führte zunächst sowohl zur Beseitigung des vom Hersteller zur Membranbefeuchtung eingesetzten Glycerols als auch zu einer anteiligen Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen der Cellulosemembran der Ultrafiltrationseinheit mit dem entsprechenden Glucocorticoid und somit einer Verringerung der nichtspezifischen Bindung der lipophilen Substanzen an das Filtermaterial. Außerdem wurde durch dieses Vorgehen die Bildung eines Filterkuchens auf der Filtermembran hervorgerufen und somit eine zusätzliche Filtrationswirkung für den folgenden letzten Arbeitsschritt. Das Filtrat des letzten Zentrifugationsschrittes wurde schließlich direkt für die quantitative Analytik mittels HPLC verwendet. Für jedes Präparat wurden jeweils fünf Bestimmungen durchgeführt.

Um den Anteil des gelösten Arzneistoffs zu bestimmen, der unspezifisch an die Oberfläche der Filtrationsmembran bindet, wurden Standardlösungen zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung (NSB) verwendet. Die Auswahl der Konzentrationen der Standardlösungen in dem jeweiligen Größenbereich erfolgte aufgrund der zu erwartenden unterschiedlichen Sättigungslöslichkeiten der lipophileren Glucocorticoide FF, MF, FP und BDP und der hydrophileren Glucocorticoide Bud und TCA. Für jeden Arzneistoff wurden zur Ermittlung der NSB drei Bestimmungen vorgenommen.

1.3 Ergebnisse

Die nichtspezifische Bindung (NSB) an die Ultrafiltrationsmembran ergab bei den untersuchten Glucocorticoiden wie erwartet wesentliche Unterschiede zwischen den Substanzen Triamcinolonacetonid (TCA) und Budesonid (Bud) auf der einen Seite und Beclomethasondipropionat (BDP), Fluticasonpropionat (FP), Mometasonfuroat (MF) und Fluticasonfuroat (FF) auf der anderen Seite. Die weniger lipophilen Substanzen wie TCA und Bud wiesen mit den eingesetzten Standardlösungen (10 µg/mL) eine NSB von 5 ± 2 % bzw. 6 ± 2 % auf. Die lipophileren Glucocorticoide BDP, FP, MF und FF wurden dagegen prozentual deutlich stärker an die Filtrationseinheiten gebunden, wobei die verwendeten Standardlösungen Konzentrationen von jeweils 0.5 µg/mL Arzneistoff enthielten. Bei BDP betrug die NSB

59 ± 4 %, bei FP 57 ± 5 %, während bei MF und FF eine NSB von 73 ± 1 % bzw. 65 ± 2 % bestimmt wurde (siehe *Abbildung 7*).

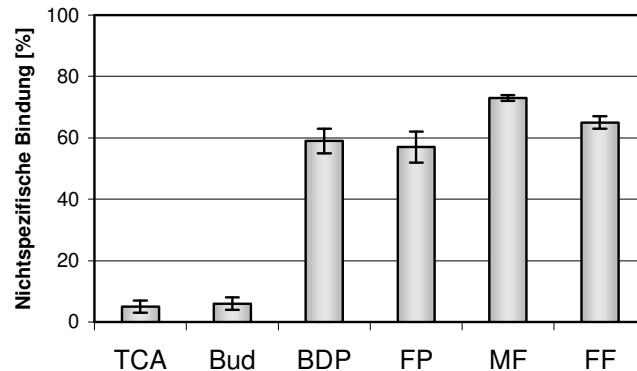


Abbildung 7: Ergebnisse der Ermittlung der nichtspezifischen Bindung (NSB) der untersuchten Glucocorticoide an die Ultrafiltrationseinheiten [Mittelwert ± mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert, n= 3].

Die bei diesem Versuchsaufbau ermittelten prozentualen Werte für die nichtspezifische Bindung dienten dazu, einen Korrekturfaktor zu ermitteln, um somit die mit Hilfe der verwendeten Filtrationsmethode ermittelten Werte der Sättigungskonzentrationen der intranasalen Corticoide zu korrigieren (siehe *Tabelle 1*).

Intranasal applizierte wässrige Glucocorticoidformulierungen stellen Arzneiformen komplexer galenischer Zusammensetzung dar. Die darin enthaltenen Wirkstoffpartikel zeichnen sich bezüglich ihrer physikochemischen Eigenschaften besonders durch ihren lipophilen bzw. hochlipophilen Charakter und eine damit verbundene geringe Wasserlöslichkeit aus [42]. Die lipophilen Wirkstoffeigenschaften bestimmen hiernach auch grundsätzlich das Ausmaß der Sättigungslöslichkeit der Corticoide im Überstand der untersuchten wässrigen Suspensionen. So wurden erwartungsgemäß die höchsten Konzentrationen an gelöstem Wirkstoff bei den weniger lipophilen TCA und Bud ermittelt (siehe *Tabelle 1*). Die mit Hilfe der bestimmten NSB korrigierte TCA Konzentration im Überstand betrug $28.2 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ (bei Raumtemperatur (RT)) und ist somit vergleichbar mit bereits veröffentlichten Daten zur Wasserlöslichkeit bei 37 °C [42,60]. Im Gegensatz dazu ist die ermittelte korrigierte Konzentration von Bud mit $55.9 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$ (bei RT) im Vergleich zu bereits bekannten Daten zur Wasserlöslichkeit erhöht. Eine Erklärung für den deutlichen Anstieg der Sättigungslöslichkeit ist möglicherweise in der Zusammensetzung der Arzneistoffformulierung hinsichtlich der Verwendung bestimmter

Hilfsstoffe zu suchen.

Die im Vergleich zu TCA und Bud lipophileren Corticosteroide BDP, FF, FP und MF zeigen eine etwa um den Faktor 500-1000 geringere Sättigungslöslichkeit. Bedient man sich zur Korrektur der gemessenen Konzentrationen wiederum der ermittelten Korrekturfaktoren der NSB für die jeweilige Substanz, so ergeben sich Werte für die Sättigungskonzentrationen, die in guter Übereinstimmung stehen mit bereits veröffentlichten Daten zur Wasserlöslichkeit bei 37 °C. Während FP und BDP korrigierte Sättigungskonzentrationen von $0.111 \pm 0.010 \mu\text{g/mL}$, bzw. $0.133 \pm 0.012 \mu\text{g/mL}$ (bei RT) aufwiesen, lag die Konzentration für MF mit $0.060 \pm 0.006 \mu\text{g/mL}$ (bei RT) wie erwartet deutlich unterhalb von $0.100 \mu\text{g/mL}$ (siehe *Tabelle 1*). Für FF konnte mit $0.055 \pm 0.004 \mu\text{g/mL}$ (bei RT) erstmalig eine Sättigungskonzentration im Wässrigen bestimmt werden, wobei sich der ermittelte Wert wiederum deutlich unterhalb von $0.100 \mu\text{g/mL}$ befand, und somit vergleichbar mit der Konzentration des MF war.

Tabelle 1: Glucocorticoidkonzentrationen in den wässrigen Überständen handelsüblicher Arzneistoffsuspensionen zur intranasalen Applikation (bei Raumtemperatur). Dargestellt sind die Konzentrationen mit und ohne Korrektur für die nichtspezifische Bindung (NSB) am Filtermaterial [Mittelwerte \pm Standardabweichung, n= 5]. Die Werte für die NSB stellen den Mittelwert aus drei Messungen dar. Verglichen werden die ermittelten Glucocorticoidkonzentrationen mit in der Literatur bekannten Daten für die Sättigungslöslichkeit in Wasser bei 37 °C.

Arzneistoff	FAM	NSB (%)	Konz. ($\mu\text{g/ml}$) (nicht korrigiert)	Konz. ($\mu\text{g/ml}$) (korrigiert)	Löslichkeit ($\mu\text{g/ml}$; 37 °C)
Triamcinolon-acetonid	Nasacort®	5	26.9 ± 0.5	28.2 ± 0.5	25.5 [60] 21.0 [42]
Budesonid	Budes®	6	52.4 ± 1.7	55.9 ± 1.9	16.0 [42] 14.0 [61] 20.9 [62]
Fluticason-propionat	Flutide® Nasal	57	0.048 ± 0.004	0.111 ± 0.010	0.14 [42] <0.1 [61]
Beclomethason-dipropionat	ratio Allerg®	59	0.054 ± 0.005	0.133 ± 0.012	0.13 [42]
Mometason-furoat	Nasonex®	73	0.016 ± 0.002	0.060 ± 0.006	<0.1 [61]
Fluticason-furoat	Avamys®	65	0.019 ± 0.001	0.055 ± 0.004	n.v.

1.4 Diskussion

1.4.1 Nichtspezifische Bindung

Die Lipophilie der Arzneistoffe ist ein entscheidender Faktor, der das Ausmaß, der im Wässrigen gelösten Glucocorticoide an die Oberfläche der Cellulosemembran der Filtrationseinheiten zu adsorbieren, bestimmt. Taylor et al. berichteten bereits über Adsorptionseffekte von Corticosteroiden an Microcon[®] YM-10 Filtrationseinheiten und brachten sie in einen Zusammenhang mit ihrer Lipophilie [76].

Bei den eigenen Untersuchungen ist ebenfalls mit zunehmender Lipophilie der Substanz eine Zunahme der NSB zu erkennen. Vergleicht man die strukturell untereinander nah verwandten Glucocorticoide FP, MF und FF bezüglich ihrer NSB und bringt diese in Korrelation mit ihrem jeweiligen log P-Wert (dekadischer Logarithmus des n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten), welcher ein Maß für die Lipophilie eines Stoffes ist, so ergibt sich ein linearer Zusammenhang (siehe *Tabelle 2* bzw. *Abbildung 8*).

Tabelle 2: log P-Werte (nach ACD/Labs Software V8.14) und Werte der nichtspezifischen Bindung (NSB) der untersuchten Glucocorticoide aus den eigenen Untersuchungen [Mittelwert \pm mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert, n= 3].

Glucocorticoid	log P	NSB [%]
Triamcinolonacetonid	2.5	5 \pm 2
Budesonid	3.14	6 \pm 2
Fluticasonpropionat	3.73	57 \pm 5
Fluticasonfuroat	4.01	65 \pm 2
Mometasonfuroat	4.27	73 \pm 1
Beclomethasondipropionat	4.59	59 \pm 4

Bei BDP setzt sich der Trend mit zunehmendem log P-Wert, auch eine Zunahme der nichtspezifischen Bindung an die Filtrationsmembran zu zeigen, zwar nicht linear fort, dennoch liegt die NSB des BDP in einem ähnlichen Bereich im Vergleich zu FP, MF und FF.

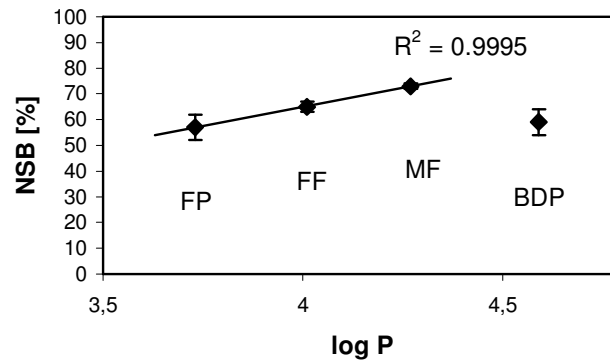


Abbildung 8: Korrelation zwischen der nichtspezifischen Bindung (NSB) von Fluticasonpropionat (FP), Fluticasonfuroat (FF), Mometasonfuroat (MF) und Beclomethason-17,21-dipropionat (BDP) und ihren berechneten log P-Werten (nach ACD/Labs Software V8.14). Das Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.9995$ wurde für den Zusammenhang zwischen FP, MF und FF (ohne BDP) ermittelt.

Betrachtet man die Molekülstrukturen der untersuchten Glucocorticoide, so weist BDP im Gegensatz zu FP, MF und FF an Position 21 eine zusätzliche Esterfunktion auf. Diese strukturelle Besonderheit des BDP im Vergleich zu FP, MF und FF ist eine mögliche Erklärung für diese Abweichung. Die Sonderrolle, die BDP unter den untersuchten Arzneistoffen einnimmt, spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass es selbst nur eine geringe Affinität zum Glucocorticoidrezeptor besitzt. Nach Absorption in das Nasengewebe kann dort eine Esterspaltung an Position 21 durch unspezifische Esterasen erfolgen und so das sehr viel potentere Beclomethason-17-monopropionat als eigentliche Wirkform hervorbringen [22].

1.4.2 Diskussion der entwickelten Methode und Bedeutung des bereits gelösten Glucocorticoidanteils

Es wurde erfolgreich eine Methode entwickelt, mit der die Glucocorticoidkonzentrationen in den wässrigen Überständen handelsüblicher Suspensionsformulierungen zur intranasalen Applikation bestimmt werden konnten. Die verwendete Ultrafiltrationsmethode stellte dabei eine reproduzierbare Filtrationstechnik dar, die es ermöglichte, komplexe Matrices, wie sie in nasalen Suspensionsformulierungen vorliegen, von ihrem partikulären Anteil zu trennen, um somit erstmals die Sättigungskonzentrationen nasaler Glucocorticoide im wässrigen Überstand von Handelspräparaten zu ermitteln. Als Problem in diesem Zusammenhang zeigte sich die nichtspezifische Bindung (NSB) der Wirkstoffe an die Filtrationsmembran. Diese Eigenschaft

der lipophilen Corticosteroide wurde in den Methoden, die bereits in der Literatur zur Löslichkeitsbestimmung in Wasser bei 37 °C beschrieben sind [60,61,74], im Hinblick einer möglichen Beeinflussung der Ergebnisse nicht erwähnt (siehe 1.2.1). Der mit Hilfe der eingesetzten Standardlösungen ermittelte Korrekturfaktor der NSB zur Berechnung der korrigierten Konzentration stellte sich dabei als eine sinnvolle Möglichkeit dar, der NSB der Substanzen an die Filtereinheiten Rechnung zu tragen. Diese Vorgehensweise wurde durch die gute Vergleichbarkeit der selbst bestimmten korrigierten Sättigungskonzentrationen mit den bereits in der Literatur bekannten Daten zur Wasserlöslichkeit der verschiedenen Glucocorticoide und die ermittelte Korrelation der Lipophilie in Form des log P-Werts mit der NSB an das verwendete Filtermaterial belegt.

Der in der Arzneistoffformulierung gelöste Glucocorticoidanteil steht, wie bereits erwähnt, direkt nach Applikation der Arzneistoffformulierung bereit zur Diffusion über die Nasenschleimhaut ins therapeutische Zielgewebe und kann somit pharmakologisch wirksam werden. Dieser Wirkstoffanteil kann als Initialdosis der Arzneistoffdosierung betrachtet werden und hat möglicherweise einen Einfluss auf die Zeitspanne bis zum Wirkeintritt. Grundsätzlich ist bei intranasalen Glucocorticoiden gerade bei saisonaler allergischer Rhinitis zu bemerken, dass es bei regelmäßiger Benutzung des Sprays ein paar Tage dauert, bis die volle Wirkung eintritt [33]. Dennoch stellt sich die Frage, wie schnell die untersuchten Substanzen wirken, nachdem die Applikation der Arzneiform in der Nasenhöhle erfolgt ist. Dabei gibt es nur wenige Studien, die einen direkten Vergleich verschiedener intranasaler Glucocorticoide bezüglich des Zeitraums zwischen Applikation und beginnender klinischer Symptomlinderung vornehmen. Day et al. verglichen wässrige Formulierungen von Budesonid mit Fluticasonpropionat hinsichtlich des Wirkeintritts gemessen an einem kombinierten Symptomscore (nasale Obstruktion, Nasenfluss, Niesreiz) bei Patienten mit ganzjähriger allergischer Rhinitis. Dabei zeigte sich bei Patienten der Budesonidgruppe (Tagesdosis (TD) 256 µg) eine signifikante Verbesserung der Symptomatik 36 h nach Applikation im Vergleich zur Placebogruppe, während bei Patienten, die FP (TD 200 µg) anwendeten, erst nach 60 h eine signifikante Verbesserung auftrat, wobei wiederum mit der mit Placebo behandelten Gruppe verglichen wurde [77]. Dabei ist bemerkenswert, dass selbst bei der Anwendung des Placebopräparates innerhalb des Studienzeitraumes eine Symptombesserung eintrat, was mit einem Spüleffekt durch die eingesetzte Pufferlösung in der nasalen Kavität erklärt werden kann.

Weitere Studien zur Erfassung des Wirkeintritts wurden bei Allergikern mit saisonalen Beschwerden durchgeführt [46,78-81]. Die Zeiträume von der Applikation bis zur Symptombesserung betragen für TCA (Einmaldosis (ED) 220 µg) 12 h [79], für Bud (ED 256 µg) 5 h [46], für MF (ED 200 µg) 12 h [78], für FF (ED 110 µg) 8 h [80], wobei jeweils der Wirkeintritt

gegenüber einem Placebopräparat mit einer wirkstofffreien Pufferlösung bestimmt wurde. Bei den in diesen Studien untersuchten Suspensionsformulierungen handelte es sich um Präparate die, was die galenische Zusammensetzung betrifft, den in den eigenen Experimenten verwendeten Arzneiformen weitestgehend entsprachen. Da diese Studien keinen direkten Vergleich zwischen verschiedenen Arzneistoffen vornahmen und auch Unterschiede in der Durchführung der Studien erkennbar sind, sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen untereinander nur schwer vergleichbar. Dennoch bleibt festzuhalten, dass eine mögliche Erklärung für den rascheren Wirkeintritt von Budesonid-Nasenspray im Vergleich zu Fluticason-Nasenspray, wie sie von Day et al. postuliert wurde, durch einen höheren bereits gelösten Glucocorticoid-Anteil bei der Budesonid-Formulierung, wie in den eigenen Untersuchungen ermittelt wurde, hervorgerufen werden könnte. Neben dem gelösten Wirkstoffanteil kann auch die Auflösungsgeschwindigkeit der Kristalle für einen schnellen Wirkeintritt relevant sein. So untersuchten Högger et al. die Auflösungsgeschwindigkeit verschiedener Glucocorticoidkristalle in menschlicher Bronchialflüssigkeit und ermittelten dabei bei Bud eine 80 mal schnellere Auflösung im Vergleich zu FP [74].

Obwohl die um das 500-1000-fach höheren Sättigungskonzentrationen von TCA und Bud im Vergleich zu den lipophileren BDP, FP, MF und FF für höhere Initialdosen stehen, und somit ein schnellerer Wirkeintritt postuliert werden könnte, ist andererseits auch eine schnellere Absorption über die Nasenschleimhaut möglich. So sind neben dem bereits gelösten Wirkstoffanteil auch die rasche Auflösungsgeschwindigkeit der hydrophileren Glucocorticoide zwar verantwortlich für einen schnellen Konzentrationsanstieg im Nasengewebe, jedoch bedingen diese Eigenschaften auch eine schnelle Clearance der applizierten Dosis, die sich auf der Oberfläche der Nasenschleimhaut befindet, und damit eine geringere Depotwirkung. Außerdem dürfte die schnelle Verfügbarkeit des Arzneistoffs in der Zelle durch den Umstand, dass genomische Effekte der Glucocorticoide mit einer Verzögerung von mehreren Stunden auftreten, weniger relevant sein, verglichen mit einer raschen Beseitigung des Wirkstoffs aus dem Zielgewebe. Die genomische Beeinflussung der Transkription und ein messbarer Effekt auf Proteinebene durch Glucocorticoide sind dabei nach einer zeitlichen Latenz von mindestens 30 min nach Rezeptorbindung festzustellen. Bis sich dies jedoch auf den Zellstoffwechsel, entzündetes Nasengewebe und schließlich auf eine klinisch signifikante Symptombesserung des Patienten auswirkt, vergehen bis zu 12 h, wobei erst nach mehreren Tagen der maximale Effekt festzustellen ist [82-84].

Bei den lipophileren Arzneistoffen hingegen sind durch einen geringen Anteil an bereits gelöstem Arzneistoff und durch eine langsame Auflösungsgeschwindigkeit eine längere Verweilzeit auf der nasalen Mukosa und damit eine bessere Depotwirkung der applizierten

Dosis anzunehmen. So konnten Bonsmann et al. nach nasaler Applikation einer wässrigen Fluticasonpropionatformulierung im Nasensekret der Patienten über 20 h hinweg Wirkstoffkonzentrationen nachweisen [69]. Daraus lässt sich eine Depotbildung des FP auf der nasalen Mukosa ableiten. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit des lipophilen Glucocorticoids liegt einerseits ein geringer bereits gelöster Wirkstoffanteil vor, andererseits kommt es zu einer langsamen Auflösung der Kristalle im Nasensekret und einer verlängerten Freisetzung aus der Arzneiform auf der Nasenschleimhaut in die relevanten Zielgewebe.

1.4.3 Einflussfaktoren der Sättigungslöslichkeit

Die Beurteilung der ermittelten Sättigungskonzentrationen beruht hauptsächlich auf Grundlage der Wasserlöslichkeit der untersuchten Glucocorticoide. Aufgrund der durchweg wässrigen Basis der verwendeten Präparate ist diese Herangehensweise gerechtfertigt. Es ist jedoch zu beachten, dass weitere Faktoren neben dem Dispersionsmittel der Suspensionen einen Einfluss auf die Löslichkeit haben können. So ist aus dem Bereich der Nanotechnologie bekannt, dass bei einer Verkleinerung der Partikelgröße auf ein bestimmtes Maß das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen so groß ist, dass die Sättigungslöslichkeit steigen kann [85,86]. Die für dieses Phänomen verantwortliche Gesetzmäßigkeit wird durch die Kelvin- [87] bzw. Ostwald-Freundlich Gleichungen [88,89] beschrieben. Während die Kelvin Gleichung als physikalische Grundlage den Dampfdruck als Funktion des Krümmungsradius von Flüssigkeitströpfchen beschreibt, stellt die Ostwald-Freundlich Gleichung einen Zusammenhang zwischen Sättigungslöslichkeit und Partikelgröße her.

Ostwald-Freundlich Gleichung:

$$\log \frac{c_{s,r}}{c_{s,\infty}} = \frac{2 \gamma V_m}{2,303 RT \rho r}$$

$c_{s,r}$ Löslichkeit (Sättigungskonzentration) feiner Partikel mit dem Radius r

$c_{s,\infty}$ Löslichkeit (Sättigungskonzentration) relativ grober Pulverpartikel

γ Grenzflächenspannung

V_m Molares Volumen des Partikels

T Absolute Temperatur

ρ Dichte des Feststoffs

R Allgemeine Gaskonstante

r Partikelradius

So kommt es durch eine vergrößerte Oberfläche der Partikel sowohl zu einer vergrößerten Angriffsfläche des Lösungsmittels an der Feststoffgrenzfläche als auch einer Verkleinerung der Dicke der Diffusionsschicht. Allerdings ist festzuhalten, dass eine Verkleinerung der Partikelgröße von mindestens unter 2 μm nötig ist, damit sich die Sättigungslöslichkeit nach der beschriebenen Gesetzmäßigkeit steigern kann [90].

Die Anforderungen an das Teilchen- bzw. Tröpfchengrößenspektrum bei intranasalen Suspensionen sind weit weniger hoch wie bei inhalativen Arzneiformen [91]. Während bei Aerosolen zur inhalativen Anwendung Teilchen- bzw. Tröpfchengrößen von 0.5 bis 5 μm , möglichst von 2 bis 3 μm gefordert sind, damit einerseits eine Deposition im peripheren Lungengewebe erreicht wird und andererseits ein Wiederausatmen des Anteils an inhalierter Dosis verhindert wird, werden in der Nasenhöhle bevorzugt Partikel bzw. Tröpfchen von 5-7 μm deponiert [92]. Von dem Tröpfchengrößenspektrum, welches hauptsächlich durch den Sprühkopf des Applikationsbehältnisses bestimmt wird, ist das eigentliche Partikelgrößenspektrum der Wirkstoffkristalle zu unterscheiden, das entscheidend für die Sättigungslöslichkeit der Glucocorticoide, wie auch die Auflösungsgeschwindigkeit im Nasensekret ist. So untersuchten Doub et al. verschiedene Chargen mikronisierter BDP-Kristalle mit Hilfe der Raman-Spektroskopie. Diese spektroskopische Methode ermöglicht es eine Partikelgrößencharakterisierung der Inhaltsstoffe bei wässrigen nasalen Suspensionsformulierungen vorzunehmen [93]. Dabei war ein erheblicher Anteil der Wirkstoffkristalle kleiner als 2 μm , in manchen Chargen sogar kleiner als 1 μm . Aus eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Glucocorticoidkristallen von Fluticasonpropionat einer nasalen Suspensionsformulierung (Flutide[®] Nasetten) wurde ein Teilchengrößenspektrum von ca. 0.5-7 μm erfasst (siehe 3.6 Experimenteller Teil C), wobei ebenfalls eine gewisse Partikelfraktion der Wirkstoffkristalle einen Durchmesser besaßen, der kleiner als 1-2 μm war (siehe *Abbildung 9*). So ist durchaus denkbar, dass die Partikelgröße die Sättigungslöslichkeit der vorliegenden Glucocorticoid-Suspensionen bei entsprechendem Teilchengrößenspektrum beeinflussen kann.

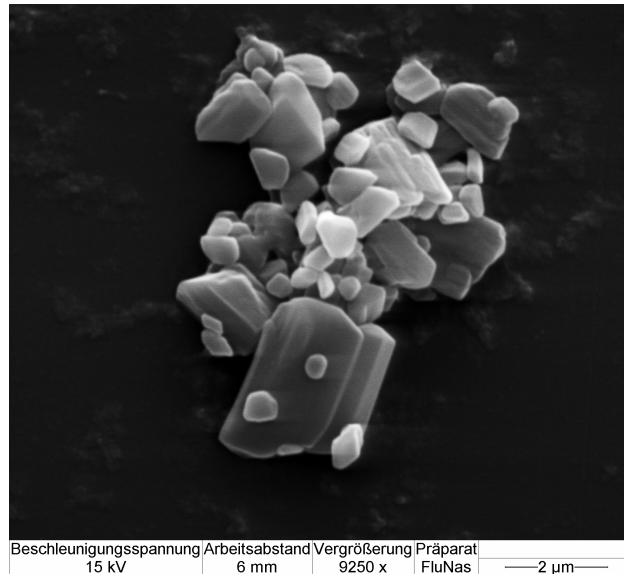


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Flutide[®] Nasetten. Das Teilchengrößenspektrum der Fluticasonpropionatkristalle betrug ca. 0.5-7 μm.

Neben der Partikelgröße als möglicher Einflussfaktor liegen bei den untersuchten Formulierungen zahlreiche Hilfsstoffe vor, die ihrerseits in Wechselwirkung mit den Wirkstoffkristallen treten können und somit verändernd auf die Löslichkeit einwirken können. So sorgen Tenside wie Polysorbat 80 dafür, dass sich hydrophobe Substanzen in Wasser besser dispergieren lassen. Durch ihren Einsatz kommt es zu einer Verbesserung der Benetzung der Teilchen und einer Herabsetzung der Grenzflächenspannung zwischen flüssiger und fester Phase. Durch die verbesserte Benetzbarkeit wird eine Aggregation der Partikel weitestgehend verhindert und eine Solubilisierung der Teilchen ermöglicht. So ermittelten Jacobs et al. die Sättigungslöslichkeiten von Budesonid als schwerlöslicher Substanz in auskristallisierter Form, in mikronisierter Form und als Nanosuspension mit jeweils definierter Partikelgrößenverteilung in Wasser bei Zusatz von 0.033 % Tween[®] 80 (Polysorbat 80) bei 25 °C. Die Sättigungslöslichkeit der auskristallisierten Substanz betrug hierbei 30 μg/mL unter den gewählten Bedingungen. Während es zu einem Anstieg der Sättigungslöslichkeit bei der mikronisierten Form durch den Tensidzusatz auf 38 μg/mL kam, lag die Konzentration für die Nanosuspension sogar bei 52 μg/mL, jeweils bei 25 °C [94]. So ist aus diesen Untersuchungen ersichtlich, dass sich die Kombination aus einer Verkleinerung der Partikelgröße, wie es bei mikronisierten Partikeln mit einem erhöhten Feinanteil (Partikelgrößen < 2 μm) vorliegt, und der Verbesserung der Benetzbarkeit der lipophilen Wirkstoffpartikel durch einen definierten

Tensidzusatz, in einer Erhöhung der Sättigungslöslichkeit bemerkbar macht. Der Effekt des Tensids besteht dabei in einer ausreichenden Benetzung der feinen Partikel durch eine Herabsetzung der Grenzflächenspannung an der Grenzfläche fest/flüssig und einer damit verbundenen Verhinderung der Agglomeratbildung.

Den größten Teil der Matrix der Suspensionsformulierungen machen die Cellulosederivate aus. Diese stellen Dispergierhilfsstoffe dar, die sich durch Bildung von Sorbathüllen an den Feststoffoberflächen auszeichnen, somit sterisch eine Aggregation der Partikel behindern und dabei auch die Viskosität der Formulierung erhöhen. Howard et al. fanden heraus, dass diese Hilfsstoffe einen Einfluss auf die Auflösungsgeschwindigkeit der Wirkstoffpartikel von Steroidsuspensionen haben [95]. So kam es bei einer Suspension aus Prednisolonacetat in Wasser bei Zusatz von Celluloseethern wie Carboxymethylcellulose-Na (Carmellose-Na) oder Hydroxypropylmethylcellulose zu einer Verlangsamung der Auflösungsgeschwindigkeit. Von einer veränderten Sättigungslöslichkeit durch Cellulosederivate wurde jedoch nicht berichtet.

Außer den Tensiden und den Celluloseethern sind weitere Hilfsstoffe mit oberflächenaktiven Eigenschaften in den untersuchten Suspensionen vorhanden. Dabei handelt es sich um die zur Konservierung der wässrigen Arzneiformen eingesetzten Benzalkoniumchlorid und Kaliumsorbat. Die für einen Schutz gegen mikrobiellen Befall benötigte Konzentration beträgt für Benzalkoniumchlorid 0.01-0.02 %. Kaliumsorbat wird 0.2 %ig eingesetzt, was einer ca. zehnfach höheren Konzentration entspricht [96]. Das untersuchte Budes® Nasenspray enthält als Konservierungsmittel Kaliumsorbat und nicht wie alle anderen untersuchten Glucocorticoid-Suspensionen Benzalkoniumchlorid. Kaliumsorbat wird aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit eingesetzt, wobei wirksames konservierendes Agens dabei die im leicht sauren Milieu vorliegende Sorbinsäure ist. Auffallend ist der deutlich erhöhte gelöste Glucocorticoidanteil an Budesonid im wässrigen Überstand des Budes® Nasenspray im Vergleich zu Literaturwerten der Sättigungslöslichkeit des Wirkstoffes in Wasser bei 37 °C (siehe 1.3 Ergebnisse, siehe Tabelle 1). In einer Untersuchung von Bak et al. wird von einer Löslichkeitsverbesserung einer schwerlöslichen Substanz namens AMG 517 berichtet, die in einer wässrigen Suspension zusammen mit Sorbinsäure zur Konservierung vorliegt. Es konnte in der wässrigen Formulierung eine 1:1 Kokristallbildung des Arzneistoffs mit Sorbinsäure nachgewiesen werden, die u.a. auf zwei Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen ist und die für eine verbesserte Löslichkeit verantwortlich ist [215]. So könnte auch Sorbinsäure ($pK_s = 4.76$) in der untersuchten Suspension mit Budesonid (siehe Abbildung 10) die Sättigungslöslichkeit beeinflussen. So ist im wässrigen Milieu die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Säurefunktion der Sorbinsäure und der α -

Hydroxyketonstruktur (Position 20,21) des Budesonids wahrscheinlich und somit eine Beeinflussung der Sättigungslöslichkeit denkbar.

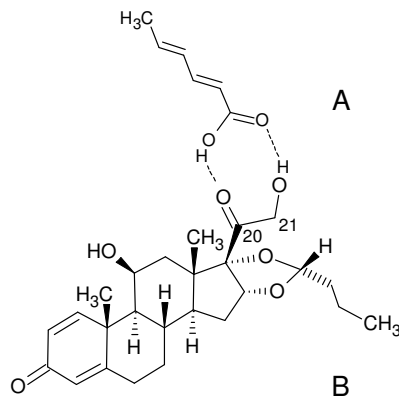


Abbildung 10: Mögliche Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den in der Suspensionszubereitung Budes®-Nasenspray vorliegenden Substanzen Budesonid (B) und Sorbinsäure (A; $pK_s = 4.76$)

2 Bestimmung des Sprühstoßvolumens handelsüblicher Glucocorticoid-Suspensionen zur intranasalen Applikation

Die intranasale Applikation von Glucocorticoid-Suspensionen führt bei einer korrekten Anwendung zu einer ausreichenden Deposition der Wirkstoffkristalle auf der Schleimhaut der Nasenhöhle. Das Ausmaß und die Lokalisation der Verteilung in den Zielbereichen der nasalen Kavität wird zum einen von der richtigen Anwendungstechnik des Nasensprays durch den Patienten und den anatomischen und physiologischen Gegebenheiten in der Nasenhöhle, zum anderen von den physikalischen Eigenschaften der eingesetzten Dosiersprays bestimmt [58,63]. Die für die nasale Applikation von Corticosteroiden verwendeten Applikationssysteme sind Dosiersprühflaschen, die aus einer Glas- oder Polyethylenflasche bestehen, auf die eine Kolbenpumpe mit einer Düse und einem Nasenapplikator montiert ist. Durch das manuelle Betätigen des Pumpmechanismus wird eine exakt dosierte Menge der Suspension über ein Steigrohr angesaugt und fein zerstäubt. Zum Druckausgleich strömt durch eine entsprechende Öffnung, in der Regel unterhalb des Nasenadapters, Außenluft ein. Diese Applikationssysteme ermöglichen eine hohe Dosiergenauigkeit des Suspensionsvolumens und führen zu einem typischen Sprühmuster. Dabei sind neben der Art der verwendeten Pumpe, dem Öffnungswinkel der Düse und der erzeugten Tröpfchengröße, auch Viskosität, thixotropes Verhalten und Oberflächenspannung der wässrigen Zubereitung entscheidend für das Ausmaß und die Lokalisation der in der Nasenhöhle deponierten Dosis [97]. Das Volumen eines Sprühstoßes zur nasalen Anwendung ist durch das jeweilige Applikationssystem fest vorgegeben und liegt gewöhnlich zwischen 25 und 200 μL [97]. Die Abgabe eines Sprühstoßes mit gewünschter Dispersität erfordert jedoch eine ausreichend ausgeübte Fingerkraft auf das entsprechende Applikationssystem. Dabei muss je nach Präparat eine Kraft zwischen 15 und 50 Newton aufgebracht werden [98].

Neben einer ausreichenden Verteilung der Wirkstoffsuspension auf der Nasenschleimhaut ist das Volumen eines Sprühstoßes ausschlaggebend für die sensorischen Eigenschaften einer nasalen Arzneistoffformulierung. Die Empfindungen im Nasen-Rachenraum, die nach nasaler Applikation von einem Patienten wahrgenommen werden, sind außer einem schnellen Wirkungseintritt, der einfachen Handhabung des Applikationssystems und einer geringen Wahrscheinlichkeit systemischer und lokaler Nebenwirkungen mitentscheidend für die Compliance des Anwendenden [99]. So sind eine Reihe von klinischen Studien bekannt, die die sensorischen Charakteristika von nasalen Glucocorticoid-

Suspensionen untersuchten [100-102]. Dabei wurden die Präferenzen der Patienten bezüglich eines Duftes oder Geschmacks, einem Feuchtigkeitsgefühl auf den Schleimhäuten und unerwünschtem Ausfluss der Suspension sowohl aus der Nase, als auch in den Rachenraum nach Applikation verschiedener Arzneistoffformulierungen ermittelt. Neben dem Volumen eines Sprühstoßes wurde gezeigt, dass die Hilfsstoffzusammensetzung der Corticoidsuspension für die Empfindungen der Patienten eine ebenso wichtige Rolle spielen. So wird von Shah et al. als Erklärung für einen Einfluss auf die Sensorik von Patienten das zur Konservierung eingesetzte Benzalkoniumchlorid mit seinem bitteren Geschmack oder das blumig duftende Phenylethanol aufgeführt [100].

2.1 Fragestellung

Die unterschiedlichen Applikationssysteme, die bei der Anwendung intranasaler Glucocorticoide verwendet werden, sorgen für ein konstantes Dosieren des jeweiligen Wirkstoffs über die gesamte Anwendungsdauer. So stellt sich die Frage, inwiefern sich die Applikationsvolumina verschiedener handelsüblicher nasaler Glucocorticoidformulierungen unterscheiden. Die jeweilige Menge an applizierter Wirkstoffsuspension ist neben der Hilfsstoffzusammensetzung und dem Depositionsmuster entscheidend für das Verweilen der Substanzen auf der nasalen Mukosa. Dabei ist zum einen festzuhalten, dass ein direktes Ausfließen der Wirkstoffsuspension durch ein entsprechend großes Applikationsvolumen in den Rachenraum stattfinden kann und zur Beeinflussung der Sensorik von Patienten führen kann, zum anderen ist die mukoziliäre Clearance, die vermehrt im hinteren Teil der Nasenhöhle stattfindet, dafür verantwortlich, dass Arzneistoffformulierung von der Schleimhaut entfernt wird.

Insofern ist eingängig, dass ein geringeres Applikationsvolumen zu einem geringeren Ausfluss der Wirkstoffformulierung aus dem Nasenraum führen sollte und somit Missempfindungen, die zu einer verminderten Compliance des Patienten führen, vermindern sollte. Allerdings führt ein geringes Applikationsvolumen zu einer größeren Arzneistoffdeposition in den vorderen, nicht zilentragenden Epithelbereichen der Nasenhöhle, wodurch das Risiko lokaler Nebenwirkungen wie Epistaxis steigen könnte [99].

Schließlich ergibt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen den eigens ermittelten Applikationsvolumina und den in Studien erfassten Präferenzen bezüglich der sensorischen Eigenschaften der Formulierungen für bestimmte Nasensprays hergestellt werden kann. Das Augenmerk ist hierbei auf die die Sensorik beeinflussenden Eigenschaften nach Anwendung eines Sprühstoßes zu richten, die durch das applizierte Volumen vermutet werden.

2.2 Prinzip der Bestimmung der Sprühstoßvolumina von Applikationssystemen nasaler Glucocorticoid-Suspensionen

Die Bestimmung der Sprühstoßvolumina diverser Nasensprays mit Corticoidformulierungen erfolgte durch Ermittlung des Wirkstoffgehalts eines definierten Suspensionsvolumens (50 µL). Somit konnte anhand der Angaben des pharmazeutischen Herstellers bezüglich des Arzneistoffgehaltes eines Sprühstoßes das Applikationsvolumen berechnet werden (siehe 2.3 Experimenteller Teil C).

2.3 Ergebnisse

Das ermittelte Applikationsvolumen der Präparate Nasacort® (TCA) und Budes® (Bud) war mit 60 ± 0.4 µL bzw. 69 ± 0.9 µL pro Sprühstoß relativ gering. Während die Dosiervorrichtungen der Fertigarzneimittel Flutide® Nasal (FP) mit 147 ± 1.7 µL, ratio Allerg® (BDP) mit 94 ± 1.5 µL und Nasonex® (MF) mit 102 ± 1.9 µL zu einem deutlich größeren Volumen pro Sprühstoß führten. Von allen getesteten Präparaten zeigte Avamys® (FF) mit 56 ± 1.2 µL das geringste Applikationsvolumen pro Sprühstoß (siehe *Tabelle 3*).

Je nach empfohlener Häufigkeit und Wiederholung eines Sprühstoßes pro Nasenloch für eine entsprechende Dosis ergaben sich unterschiedliche Applikationsvolumina für die einzelnen Präparate. Die nach der Packungsbeilage empfohlenen Dosierungen für die Erhaltungstherapie der allergischen Rhinitis führten bei Nasacort® (TCA) zu 120 µL und bei Budes® (Bud) zu 138 µL Applikationsvolumen pro Nasenloch aus den beschriebenen Fertigarzneimitteln. Die Präparate Flutide® Nasal (FP), ratio Allerg® (BDP) und Nasonex® (MF) ergaben mit 294 µL, 188 µL und 204 µL deutlich höhere applizierte Volumina pro Nasenloch und grenzten sich somit von den vorgenannten ab. Die Therapie der allergischen Rhinitis mit Avamys® (FF) erfolgt mit zwei Sprühstoßen pro Nasenloch, was im Experiment aus der Dosiereinheit des Präparates lediglich ein Applikationsvolumen von 112 µL ergab. Dies stellte somit das geringste Volumen dar, welches unter den verglichenen Präparaten ermittelt wurde (siehe *Tabelle 3*).

Tabelle 3: Dosierungen und ermittelte Applikationsvolumina pro Sprühstoß von handelsüblichen nasalen Glucocorticoidformulierungen

Arzneistoff	FAM	Dosis* pro Sprühstoß [µg]	Volumen† pro Sprühstoß [µL]	Sprühstöße‡ pro Nasenloch	Volumen† pro Applikation [µL]
Triamcinolon-acetonid	Nasacort®	55	60 ± 0.4	<u>2 q.d.</u> 1 q.d.	<u>120</u> 60
Budesonid	Budes®	50	69 ± 0.9	4 q.d. <u>2 q.d.</u> 2 b.i.d. 1 b.i.d.	276 <u>138</u> 138 69
Fluticason-propionat	Flutide® Nasal	50	147 ± 1.7	2 b.i.d. <u>2 q.d.</u>	294 <u>294</u>
Beclomethason-dipropionat	ratio Allerg®	50	94 ± 1.5	<u>2 b.i.d.</u>	<u>188</u>
Mometason-furoat	Nasonex®	50	102 ± 1.9	4 q.d. <u>2 q.d.</u>	408 <u>204</u>
Fluticason-furoat	Avamys®	27.5	56 ± 1.2	<u>2 q.d.</u> 1 q.d.	<u>112</u> 56

* Dosis pro Sprühstoß aus der Packungsbeilage

† ermittelt aus eigenen Versuchen [Mittelwert ± Standardabweichung; n= 5]

‡ Tägliche Dosierungsangaben in den Packungsbeilagen für die Behandlung der allergischen Rhinitis; die empfohlene Dosierungsangabe für die Erhaltungstherapie und das zugehörige Volumen pro Applikation sind jeweils unterstrichen

2.4 Diskussion

2.4.1 Applikationsvolumen und orale Bioverfügbarkeit

Das Volumen einer Applikation auf die nasale Mukosa sollte 100 µL [97] bis 150 µL [92] pro Nasenloch nicht überschreiten. Bei Applikationsvolumina, die über die Grenze von 150 µL hinausgehen, kann angenommen werden, dass eine für die nasale Oberfläche, die zur Deposition eines Sprühstoßes zur Verfügung steht, übermäßige Menge an flüssiger Arzneiform aufgebracht wird und es dadurch zu einem Ausfluss der Formulierung sowohl aus den Nasenöffnungen als auch in den Rachenraum mit anschließendem Verschlucken kommt.

So liegt das applizierte Volumen für eine Erhaltungstherapie der allergischen Rhinitis bei Bud mit 138 µL, TCA mit 120 µL und FF mit 112 µL in dem empfohlenen Rahmen. Bei den Substanzen FP mit 294 µL, BDP mit 188 µL und MF mit 204 µL wird das als sinnvoll erachtete Volumen überschritten und es ist verstärkt damit zu rechnen, dass nach Anwendung dieser Substanzmengen vermehrt Arzneistoffformulierung in den Rachenraum der Patienten austritt und so ein Missempfinden beim Anwendenden hervorrufen kann.

Der Wirkstoffanteil, der, sei es durch direkten Ausfluss oder die mukoziliäre Clearance, verschluckt wird, liegt bei intranasalen Glucocorticoiden je nach applizierter Dosis bei ca. 50-70 % [26,29]. Dieser steht nicht zur Absorption und schließlich für eine antiinflammatorische Wirkung im Zielgewebe bereit und muss sich einer kritischen Betrachtung bezüglich seines weiteren Schicksals im Magen-Darm-Trakt und im Organismus unterziehen. Die orale Bioverfügbarkeit, die neben der systemischen Bioverfügbarkeit nach nasaler Applikation als Maß für eine Beurteilung der Sicherheit eines intranasalen Glucocorticoids ausschließlich im Hinblick auf den verschluckten Anteil herangezogen werden kann, liegt bei den lipophileren Substanzen < 1 % für FP [29,103,104], < 1 % für MF [25,48,104] und 1 % bzw. 1.6 % für FF [105,106], in Folge ihres schnellen und ausgeprägten first-pass Metabolismus [23] in geringen vergleichbaren Größenordnungen. Die hydrophileren Wirkstoffe wie Bud mit 11 % [29], TCA mit 10.6 % [29], bzw. 23 % [104] oraler Bioverfügbarkeit und vor allem BDP mit 41 % [29] führen zu einem merklichen Anstieg der Plasmakonzentration nach oraler Gabe. Gerade bei den Substanzen, die sich durch eine verhältnismäßig hohe orale Bioverfügbarkeit auszeichnen, muss es das Ziel sein, einen geringen Ausfluss der Wirkstoffformulierung in den Rachenraum zu erreichen. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass der Wirkstoffanteil, der in der Nase deponiert wird und ca. 30-50 % der applizierten Dosis ausmacht, schließlich über die Nasenschleimhaut absorbiert werden kann und aufgrund des Umgehens des first-pass Effektes zu einem Anstieg der Plasmakonzentration, gerade bei den hydrophileren Wirkstoffen zu einem nicht unerheblichen Ausmaß beitragen kann.

Voraussetzung für eine sinnvolle topische Therapie mit nasalen Glucocorticoiden ist neben einer geeigneten Formulierung, die für eine verlängerte Retentionszeit sorgt, ein Applikationsvolumen, welches zum einen zu einer ausreichenden Verteilung in den Zielbereichen der nasalen Kavität führt, zum anderen jedoch einen minimalen Austritt in den Rachen bzw. Ausfluss aus der Nase ermöglicht. Der verschluckte Wirkstoffanteil geht für die lokale Therapie gänzlich verloren, kann zu unerwünschten Plasmaspiegeln führen und lediglich der auf der nasalen Mukosa zur Absorption bereitstehende Arzneistoff ist von therapeutischem Interesse.

2.4.2 Zusammenhang zwischen Applikationsvolumen, Verteilung und Clearance

Das Applikationsvolumen einer nasalen Arzneiform spielt, neben anatomischen, physiologischen und koordinativen Fähigkeiten des Patienten und dem durch den Öffnungswinkel der Sprühhvorrichtung bestimmten Sprühmuster, eine Rolle bei der Verteilung des Arzneistoffs auf der nasalen Mukosa [97]. Die Verteilung in der nasalen Kavität wiederum hat einen direkten Einfluss auf die Clearance nasal applizierter Formulierungen von der Schleimhaut.

Grundsätzlich kann bei nasal applizierten Arzneiformen zwischen drei verschiedenen Phasen der Clearance unterschieden werden [107]. So kommt es in der ersten Phase direkt nach Applikation gerade bei größeren applizierten Volumina zur bereits beschriebenen schnellen Clearance durch Verschlucken bzw. Ausfluss in den Rachenraum. Die folgende zweite Phase, welche 15-30 min nach Applikation erfolgt, stellt die Entfernung der Wirkstoffformulierung mittels mukoziliärer Clearance von den Bereichen der nasalen Kavität dar, die die mit Zilien bedeckte Mukosaoberfläche erreicht haben. Der Vorgang der mukoziliären Clearance von Wirkstoffpartikeln ist abhängig von der Verteilung der applizierten Formulierung in der nasalen Kavität und damit auch vom Applikationsvolumen.

Newman et al. stellten fest, dass 100 µL appliziertes Wirkstoffvolumen in ein Nasenloch, im Vergleich zu 2 x 50 µL, zur Deposition in einem insgesamt größeren Schleimhautareal führte und hierbei auch zu einem größeren Anteil im hinteren Bereich der Nasenhöhle. Es erreichte ein größerer Dosisanteil die mit Zilien besetzte Schleimhaut und führte schließlich auch zu einer schnelleren Clearance des Wirkstoffs von der Schleimhautoberfläche. Hierbei wurden für das 100 µL Sprühvolumen $46.5 \% \pm 4.4 \%$ Wirkstoffretention nach 30 min ermittelt, verglichen mit $57.1 \% \pm 4.5 \%$ zurückbleibendem Anteil für die zweimalige Applikation von 50 µL Volumen [108]. Somit wäre auch die dritte Phase erwähnt. Der Arzneistoff, der vermehrt in dem vorderen Teil der Nase und damit in den Bereichen deponiert wird, die wenig bis keine zilientragenden Zellen besitzen, verweilt dort angesichts der fehlenden mukoziliären Clearance für einige Stunden. So ist auch bekannt, dass die mukoziliäre Clearancerate von mittels Nasensprühvorrichtungen applizierten Wirkstoffen wesentlich geringer ist als die von Nasentropfen [109], was daran liegt, dass bei der Anwendung von Nasentropfen im Vergleich zu Nasensprays ein größerer Anteil in die mit Zilien besetzten Bereiche der Nasenhöhle gelangt [110].

Verschiedene Applikationsvolumina führen also zu einer unterschiedlichen Verteilung in den Schleimhautarealen der Nasenhöhle und sind somit relevant für die Clearance des auf der Mukosaoberfläche deponierten Anteils an Wirkstoffsuspension.

2.4.3 Patientenpräferenz und Applikationsvolumen

Die Behandlung der Symptome der allergischen Rhinitis mit intranasalen Glucocorticoiden stellt eine äußerst effektive Pharmakotherapie dar. Allerdings wird dabei gerade in den ersten Tagen der Behandlung durch den verzögerten Wirkeintritt der nasalen Corticosteroide bis zum Erreichen des maximalen Effektes die so wichtige regelmäßige Anwendung durch den Patienten auf eine harte Probe gestellt [23,33]. Deshalb ist die Verbesserung der Compliance des Patienten bei dieser topischen Arzneiform von besonderer Bedeutung und die Anforderungen an das Arzneimittel insgesamt besonders hoch [102]. Die Akzeptanz der Patienten bezüglich des Fertigarzneimittels und die Compliance hängen ab von der klinischen Wirksamkeit und damit dem Rückgang der Symptome, von der Verträglichkeit, der Handhabung und Anwendung des Applikatorsystems der nasalen Arzneiform und nicht zuletzt den sensorischen Eigenschaften der Wirkstoffformulierung [101,102,111,112].

Mahadevia et al. fanden heraus, dass eine inverse Korrelation besteht zwischen dem Intensitätslevel von sechs verschiedenen sensorischen Charakteristika und dem Bevorzugen eines Präparates vom Patienten. So führte beispielsweise ein vermehrter Austritt von applizierter Wirkstoffsuspension in den Rachenraum zu einer verringerten Patientenpräferenz. Eine Reihe von klinischen Studien ermittelte mit Fragebögen die bevorzugte Anwendung verschiedener Präparate mit nasalen Glucocorticoidformulierungen bezüglich des Ausfließens aus der Nasenhöhle, sowohl aus der Nasenöffnung als auch in den Rachenraum [100,113]. Ein solcher Vorgang nach der Applikation wird von den Patienten als störend und unangenehm empfunden und kann zu einer Verringerung der Compliance beitragen [102]. Das Applikationsvolumen kann hierbei bei dem beschriebenen Austritt von Wirkstoffsuspension aus dem Zielorgan neben der Viskosität der Formulierung entscheidend sein [100]. Meltzer et al. untersuchten Veramyst® (Fluticasonfuroat) und ein Fluticasonpropionat-haltiges Präparat in Form von jeweils wässriger Suspensionen und stellten dabei fest, dass 43 % der Patienten bei dem FF-haltigen Präparat gegenüber 27 % beim FP-haltigen Präparat über einen geringeren Austritt aus der Nase in den Rachen berichteten.

Ebenso verhielt es sich bezüglich des Kriteriums Austritt der Wirkstoffsuspension aus den Nasenlöchern. Patienten bevorzugten Veramyst® (49 %) gegenüber dem FP-Präparat (19 %) und berichteten über verringerten Ausfluss aus der Nase. Die Autoren schlossen auch hier auf das im Vergleich zu anderen sich auf dem Markt befindlichen Präparaten geringe Applikationsvolumen, das pro Sprühstoß von der FF-Dosiervorrichtung abgegeben wird als dem ausschlaggebenden Grund für das bessere Abschneiden bei den Patienten bzgl. der geschilderten sensorischen Eigenschaften [114]. Diese Schilderung deckt sich mit den selbst ermittelten Daten, die bei Avamys® im Vergleich zu Flutide® Nasal ein deutlich geringeres

Applikationsvolumen pro Sprühstoß ergaben.

Stokes et al. verglichen wässrige Suspensionen von FP (Flonase®), MF (Nasonex®) und TCA (Nasacort®) bezüglich der Patientenpräferenz nach Applikation von 200 µg (FP, MF) bzw. 220 µg (TCA) Wirkstoff. Bei dem Kriterium Ausfluss der Formulierung aus der Nase nach Applikation unterschieden sich die drei Präparate nicht, wie es die eigens ermittelten Applikationsvolumina vermuten ließen, allerdings war die Anwendung von Nasacort® im Vergleich zu Flonase® und auch Nasonex® mit einem signifikant geringeren Geschmack, Geruch oder einem Trockenheitsgefühl im Nasen-Rachenraum verbunden. Nasacort® führte im Gesamteindruck zu einem besseren Ergebnis bei den Patienten und ließ eine bessere Compliance erwarten [101].

Eine mögliche und wahrscheinliche Erklärung für das gleiche Abschneiden der Präparate bezüglich des Austritts der applizierten Suspension aus den Zielbereichen der nasalen Kavität ist im rheologischen Verhalten der Formulierungen zu finden. Sharpe et al. untersuchten die Thixotropie und Viskosität der vorgenannten Präparate unter Scherbeanspruchungen, wie sie bei Anwendung durch einen Patienten laut Gebrauchsanweisung erwartet wird. Dabei zeigte Nasonex® die höchste initiale sowie terminale Viskosität, gefolgt von Flonase® und schließlich Nasacort®. Die Rangordnung bezüglich der Thixotropie war identisch. Nasonex® und Flonase® zeigten eine höhere Thixotropie als Nasacort®. Sowohl eine hohe terminale Viskosität, als auch eine hohe Thixotropie können einer nasalen Formulierung zu einer verlängerten Retention auf der nasalen Schleimhaut verhelfen und somit einen unerwünschten frühzeitigen Austritt der Formulierung aus der Nase verhindern [115]. So ist denkbar, dass der Einfluss eines größeren applizierten Volumens pro Sprühstoß des MF bzw. FP-Präparates im Vergleich zum TCA Präparat, welches in den eigenen Versuchen ermittelt wurde, auf den Austritt der Suspensionsformulierung aus der Nasenhöhle durch entsprechende rheologische Charakteristika in Form einer höheren Viskosität nach Applikation auf der nasalen Oberfläche kompensiert werden kann.

Es lässt sich schließlich festhalten, dass das Applikationsvolumen pro Sprühstoß ein wichtiges Merkmal darstellt, das bei der Entwicklung einer wässrigen Suspension zur nasalen Glucocorticoid-Behandlung beachtet werden muss und neben den rheologischen Eigenschaften der Formulierung und dem Sprühmuster der Dosiervorrichtung einen entscheidenden Einfluss auf das Empfinden des Patienten nach erfolgter Anwendung hat. Darüber hinaus kann das Sprühstoßvolumen die für den Therapieerfolg so wichtige Compliance des Patienten prägen.

3 Bestimmung der Löslichkeit intranasaler Glucocorticoid-Suspensionen in Puffer und künstlichem Nasensekret

Das Auslösen eines Sprühstoßes einer nasalen Glucocorticoid-Suspension mit Hilfe der Dosiervorrichtung sorgt bei korrekter Ausführung durch den Patienten für eine ausreichende Verteilung des Applikationsvolumens in den Zielarealen der nasalen Kavität. Die Größe der Tröpfchen, die durch die Applikationsdüse erzeugt werden, ist dabei entscheidend für das Erreichen der Schleimhautbereiche. So führt eine Tröpfchengröße von 10-20 µm [116] zur überwiegenden Deposition auf der nasalen Mukosa, während zu große Tropfen bereits im Nasenvorhof impaktieren, zu kleine Tropfen hingegen die Nasenhaupthöhle mit der Atemluft passieren. Der Dosisanteil, der auf der Schleimhaut deponiert wird, besteht nun zum einen aus bereits gelöstem Wirkstoff, zum anderen aus ungelösten Arzneistoffkristallen. Der Galenik der Arzneiform als einer wässrigen Glucocorticoid-Suspension obliegt, dass lediglich ein von den Substanzeigenschaften abhängiger geringerer Wirkstoffanteil dabei bereits gelöst vorliegt. Die bereits gelöst vorliegenden Moleküle sind direkt nach der Applikation in der Lage durch die mukosale Membran zu diffundieren.

Der größte Teil der applizierten Dosis allerdings liegt bei den vorliegenden Arzneiformen zunächst ungelöst in Form von Kristallen auf der nasalen Mukosa vor. Dieser Wirkstoffanteil muss sich zunächst im Nasensekret lösen, um in das Zielgewebe absorbiert werden zu können. Die Schleimhaut der Nase ist überzogen von einer Mukusschicht, die aus einem zähflüssigen, seromukösen Sekret besteht, welches von epithelialen Becherzellen und submukosalen Drüsenzellen produziert wird. Mukus hat einen leicht sauren pH Wert und besteht zum größten Teil aus Wasser (95 %). Neben geringen Mengen an Mineralsalzen (1 %), Lipiden (< 1 %) und freien Proteinen (1 %), wobei hier vor allem Albumin zu nennen ist, sind weitere wichtige Komponenten des Nasensekrets Mucine (2-5 %) [2,117,118]. Mucine stellen makromolekulare Glykoproteine dar, die für die viskoelastischen Eigenschaften des nasalen Sekrets verantwortlich sind. Sie bestehen zu 10-30 % aus Peptiden, die O-glykosidisch an Oligosaccharidketten gebunden sind, die 70-80 % der Glykoproteine ausmachen [119,120]. Häufig sind im Proteinkern die Aminosäuren Threonin, Serin, Prolin sowie an den Proteinenden cysteinreiche Sequenzen zu finden [121]. Man unterscheidet bei dem nasalen Mukus zwei Schichten, die ein Austrocknen der Schleimhaut verhindern. Die Solphase als die untere Schicht zeichnet sich durch eine geringe Viskosität aus und besitzt eine Schichtdicke, die ein wenig kleiner ist als die Länge einer ausgefahrenen Zilie (5-10 µm [122]). Die obere Schicht

stellt die viskosere Gelphase dar (0.5-5 μm) [123], auf deren Oberfläche nasal deponierte Partikel fixiert werden (siehe *Abbildung 11, A*). Der jeweilige Charakter dieser Schichten ermöglicht eine freie Beweglichkeit der Flimmerhärchen, welche für die synchronisierte Aktivität der Zilien bei der rachenwärts gerichteten Wellenbewegung unumgänglich ist und so die Transportfunktion ermöglicht (siehe *Abbildung 11, B*). Dies führt zu einer Reinigung der Mukosaoberfläche von Substanzpartikeln. Die mittlere Frequenz des Zilienschlags beträgt bei menschlichen nasalen Flimmerhärchen 10 Hz [124]. Die Kombination aus nasalem Mukus entsprechender Viskosität und funktionsfähigem Flimmerepithel mit metachronem Bewegungsablauf führt zu einer effektiven mukoziliären Clearance.

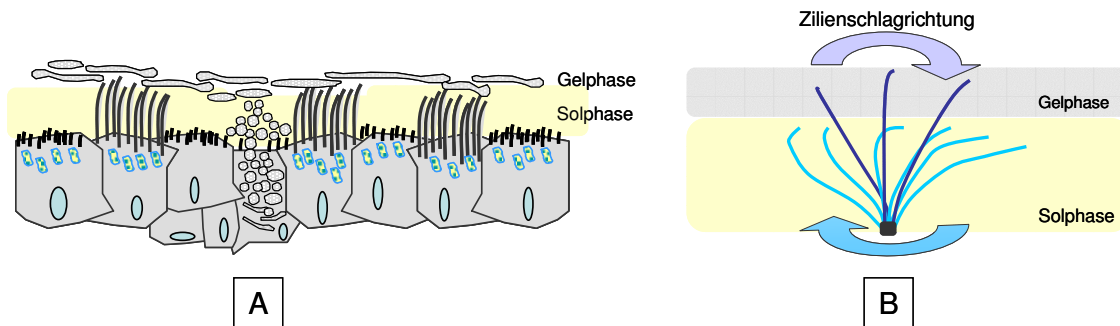


Abbildung 11: A: Schematische Darstellung der nasalen Mukosa: Zilienlose Epithelzellen, die Mikro villi an ihrer Oberfläche besitzen und mit Zilien besetzte Zellen, die für die mukoziliäre Clearance verantwortlich sind, kommen vor. In der Mitte ist eine Becherzelle zu sehen, die im Gegensatz zu seromukösen Drüsen des angrenzenden Bindegewebes (nicht dargestellt) einen geringeren Beitrag zur Produktion des nasalen Mukus leisten (Abbildung modifiziert nach [125]). B: Schematische Darstellung des Zilienschlags: die ausgefahrene Zilie reicht dank ihrer Länge in die Gelphase und kann im Verbund mit allen Zilien durch die metachrone Wellenbewegung die obere Schicht in Richtung Rachen transportieren (Geschwindigkeit der mukoziliären Clearance: 2-25 mm/min [126]). Der Rückschlag der Zilien wird ermöglicht durch ihre Beweglichkeit in der wenig viskosen Solphase (Abbildung modifiziert nach [5]).

3.1 Fragestellung

Die Effektivität der Absorption der nasal applizierten Glucocorticoid-Suspension hängt neben dem Permeabilitätskoeffizienten des gelösten Wirkstoffs und den mukoadhäsiven Eigenschaften der Formulierung von der Auflösungsgeschwindigkeit der Kristalle im Nasensekret auf der Mukosaoberfläche ab. Die mukoziliäre Clearance sorgt für einen effektiven Abtransport deponierter Partikel von der Schleimhaut in den Bereichen der Nasenhöhle, die zilienbesetzte Epithelzellen besitzen. Die Verweilzeit der dort deponierten Wirkstoffpartikel wird auf 20 bis 30 min geschätzt [5]. Der lipophile Charakter der Wirkstoffe lässt darauf schließen, dass die Löslichkeit im nasalen Mukus, der aufgrund seines hohen wässrigen Anteils weitestgehend hydrophile Eigenschaften besitzt, eher gering ist. Allerdings liegt im Nasensekret eine annähernd isotonische Zusammensetzung vor [117,127,128] und der Gesamtproteinanteil, der vom Gesundheitszustand des Patienten [129], von der Methode des gesammelten Sekrets und der natürlichen interindividuellen Variabilität abhängt, wurde mit 8 mg/dL angenommen [118,130,131]. So stellt sich die Frage, ob der Proteinanteil im nasalen Sekret einen Einfluss auf die Löslichkeit der applizierten Corticosteroide hat und möglicherweise die physiologischen Verhältnisse bei der alleinigen Betrachtung der Löslichkeit der Substanzen in Wasser zu kurz kommen.

3.2 Prinzip der Bestimmung

3.2.1 Methodenentwicklung

Die Bestimmung der Löslichkeit handelsüblicher Suspensionen zur intranasalen Glucocorticoid-Behandlung in nasalem Mukus erforderte die Entwicklung einer Methode zur Abtrennung der gelösten von den ungelösten Substanzpartikeln. So wird von Pham et al. neben der Gleichgewichtsdialyse zur Bestimmung der Löslichkeit von Budesonid-Mikrokristallen in Wasser auch die Methode der Ultrazentrifugation zur Löslichkeitsbestimmung schwerlöslicher Substanzen in Survanta™, einer Modellflüssigkeit für Lungensurfactant, beschrieben [62]. Ebenso stellte auch in den eigenen Überlegungen die Zentrifugation einer Suspension mit einer hohen g-Zahl und der anschließenden Analyse einer Probe des Überstands die Grundlage der entwickelten Methode dar.

Der Wunsch, die Löslichkeit im Nasensekret zu ermitteln, verbunden mit dem Faktum der begrenzten Verfügbarkeit und aufwendigen Gewinnung von menschlichem nasalem Mukus, führte zur Entwicklung eines künstlichen Nasensekrets (KNS), mit dem Anspruch der

physiologischen Spezimen möglichst nahe zu kommen, wobei das Augenmerk der Fragestellung schuldend auf der Proteinzusammensetzung des humanen Mukus lag. So bestehend aus den Grundlagen der Hauptproteinkomponente Mucin, ergänzt um Albumin sowie isotonischer Pufferlösung (pH 6.5), stellten das KNS neben der isotonischen Pufferlösung (PBS, pH 6.5) alleine die zu untersuchenden Lösungsmittel für die Ermittlung der Löslichkeit der Arzneistoffsuspensionen dar.

3.2.2 Durchführung der Inkubation und Zentrifugation

Die Glucocorticoid-Suspensionen wurden mit dem künstlichen Nasensekret nach physiologischen Verhältnissen inkubiert (siehe 3.3 Experimenteller Teil C). Die Menge der applizierten Wirkstoffformulierungen wurde dabei so gewählt, dass die Löslichkeitsgrenze der Substanzen im Nasensekret in jedem Falle überschritten wurde und die Glucocorticoidkristalle im Überschuss vorhanden waren. Ähnlich verhält es sich bei der Anwendung der empfohlenen Dosierungen der untersuchten Glucocorticoide beim Patienten. Gemessen an der applizierten und deponierten Dosis kann nur ein gewisser Anteil im schließlich gelösten Zustand in die Zielbereiche des entzündeten Gewebes diffundieren, da die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit der lipophilen Wirkstoffe im nasalen Sekret die limitierenden Faktoren darstellen. Die einmal gelösten Wirkstoffmoleküle diffundieren umgehend in die Schleimhautbereiche. Entscheidend für das Ausmaß des gelösten Wirkstoffanteils nach der Applikation und die Lösungsgeschwindigkeit der Glucocorticoidkristalle im nasalen Mukus sind dabei mehrere Faktoren. Zunächst ist zu bemerken, dass das Volumen an Nasensekret, das die nasale Oberfläche bedeckt, sehr gering ist. Die physikochemischen Eigenschaften der Substanzen, allen voran die Löslichkeit im Wässrigen, sind bei den untersuchten Glucocorticoiden zu unterscheiden. Die Galenik der Formulierung und die Morphologie und Größe der Wirkstoffkristalle ist entscheidend für den Auflösungsprozess. Schließlich stellt die mukoziliäre Clearance durch den Abtransport der deponierten Kristalle von der Schleimhaut der Möglichkeit der Auflösung von Kristallen eine rein zeitliche Begrenzung entgegen.

Eine Ermittlung des gelösten Wirkstoffanteils der Formulierungen in der isotonischen Pufferlösung wurde ebenso durchgeführt und diente als Vergleich. Die Temperatur der nasalen Oberfläche liegt im Mittel bei 31 °C [132] und stellte somit die geeignete Versuchstemperatur für die Löslichkeitsversuche dar. Als Inkubationszeiten wurden 30 min und 5 h gewählt. Die kürzere Inkubation von 30 min sollte den Zeitraum charakterisieren, der den deponierten ungelösten Arzneistoffkristallen auf der nasalen Schleimhaut in den hinteren Bereichen der Nasenhöhle aufgrund der mukoziliären Clearance zur Verfügung steht, um in Lösung zu gehen und

schließlich durch die Epithelbarriere in das Nasengewebe zu diffundieren. Der zweite Zeitraum von 5 h wurde zum einen ausgewählt, um auch den gelösten Wirkstoffanteil der Kristalle zu erfassen, die in den vorderen Schleimhautbereichen der nasalen Kavität deponiert werden und dadurch nicht von der mukoziliären Clearance erfasst werden. Zum anderen sollte dies allgemein einen Hinweis darauf geben, ob sich eine längere Inkubationszeit auf die gelöste Wirkstoffmenge im Vergleich zur halbstündigen Messung auswirkt.

Das nach der Inkubation erfolgte zweifache Zentrifugieren der Suspension mit hoher g-Zahl gewährleistete eine effektive Sedimentation der ungelösten Glucocorticoidkristalle und schließlich die Möglichkeit aus dem Überstand eine Probe zur Bestimmung des gelösten Wirkstoffanteils zu erhalten.

3.3 Ergebnisse

Die ermittelten Konzentrationen der gelösten Glucocorticoide in PBS und KNS unterschieden sich erwartungsgemäß zwischen den eher hydrophiler einzustufenden TCA und Bud und den lipophileren FP, MF, FF und BDP zunächst grundsätzlich beträchtlich. So übertrafen die Konzentrationen von TCA und Bud die lipophileren Substanzen um den Faktor > 100. Der Unterschied der Konzentrationen an gelöstem Glucocorticoid beim Vergleich der untersuchten Zeitpunkte 30 min und 5 h in dem jeweiligen Lösungsmittel PBS bzw. KNS fiel dagegen sehr gering aus.

Die höchsten Konzentrationen wurden für TCA gemessen, wobei nach 30 min bei TCA $28.3 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ in PBS und $26.0 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ in KNS ermittelt wurden. Nach 5 h waren die Konzentrationen im Überstand mit $28.8 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ in PBS und $28.4 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ in KNS nur unmerklich gestiegen (siehe *Abbildung 12*). Ein Einfluss der Löslichkeit durch Proteine im KNS konnte bei diesem Wirkstoff nicht bemerkt werden. Für Bud lagen die gemessenen Konzentrationen nach 30 min mit $18.1 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ in PBS und $20.3 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ in KNS, wie zuvor erwartet, etwas unterhalb der Werte von TCA. Wiederum waren die Konzentrationen im Überstand nach 5 h mit $18.4 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ in PBS und $19.9 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$ in KNS mit den halbstündig erfassten Werten gut vergleichbar und die längere Inkubationszeit führte zu keinem Konzentrationsanstieg (siehe *Abbildung 12*). Im Gegensatz zu TCA ist jedoch bei Bud ein geringer Anstieg an gelöstem Wirkstoff im Überstand zu beiden Zeitpunkten durch das KNS im Vergleich zu PBS feststellbar.

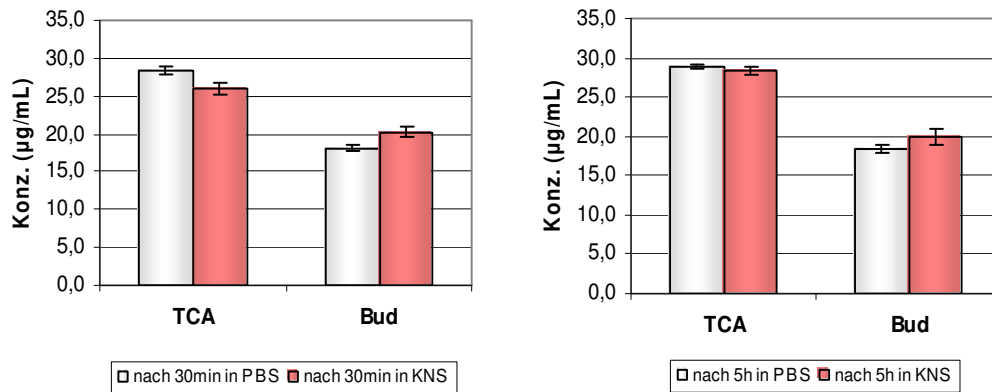


Abbildung 12: Ergebnisse des gelösten Wirkstoffanteils von TCA (Nasacort®) und Bud (Budes®) aus handelsüblichen intranasalen Zubereitungen in PBS-Puffer (PBS) und künstlichem Nasensekret (KNS) nach 30 min und nach 5 h Inkubationszeit [Mittelwert ± Standardabweichung; n= 5].

Bei den lipophileren Substanzen wurde die gelöste Menge an Glucocorticoid durch das KNS durchweg erhöht. So wurden für FP nach 30 min Inkubation in PBS eine Konzentration von 57 ± 4 ng/mL ermittelt, während sich in KNS nach derselben Zeit eine Konzentration von 124 ± 4 ng/mL ergab. Nach 5 h kam es sowohl in PBS mit 55 ± 4 ng/mL als auch in KNS mit 129 ± 5 ng/mL zu einer zur halbstündigen Messung vergleichbaren Konzentration (siehe *Abbildung 13*). Bei MF kam es beim Vergleich der gemessenen Konzentrationen von PBS und KNS zur größten Steigerung an gelöstem Glucocorticoid. So war nach 30 min im KNS mit einer Konzentration von 154 ± 4 ng/mL über dreimal mehr MF in Lösung gegangen als in PBS, wobei 48 ± 6 ng/mL an gelöstem Wirkstoff in Puffer ermittelt wurden. Nach der fünfstündigen Inkubationszeit lag die Konzentration in PBS bei 39 ± 3 ng/mL, in KNS bei 168 ± 6 ng/mL (siehe *Abbildung 13*).

Bei FF kam es, so man die Substanzen FP, MF und FF mit der größten antiinflammatorischen Potenz vergleicht, zu den höchsten Konzentrationen im KNS zu beiden Messzeitpunkten. So wurde nach 30 min in KNS 190 ± 8 ng/mL, in PBS dagegen 69 ± 2 ng/mL erfasst. Die Konzentrationen nach der fünfstündigen Inkubation betragen für FF 63 ± 2 ng/mL in PBS und 196 ± 6 ng/mL in KNS, womit es auch bei FF zu einer etwa dreifachen Steigerung an gelöstem Wirkstoff beim Vergleich der gemessenen Konzentrationen in PBS und KNS gekommen ist (siehe *Abbildung 13*). Bei BDP kam es unter allen untersuchten Glucocorticoiden zu den höchsten gelösten Konzentrationen im KNS. Der in PBS nach halbstündiger Inkubation ermittelten Konzentration mit 105 ± 4 ng/mL standen 213 ± 4 ng/mL im KNS gegenüber. Nach

5 h wurden in PBS 107 ± 4 ng/mL BDP gemessen, während die Konzentration im KNS 229 ± 2 ng/mL betrug. Dies ergab für BDP eine um den Faktor zwei höhere Konzentration im KNS im Vergleich zu PBS (siehe *Abbildung 13*).

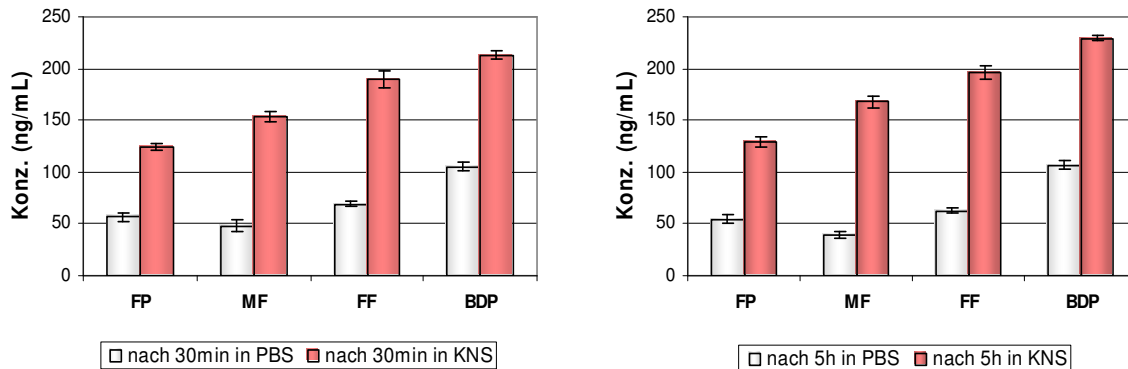


Abbildung 13: Ergebnisse des gelösten Wirkstoffanteils von FP (Flutide® Nasal), MF (Nasacort®), FF (Avamys®) und BDP (ratio Allerg®) aus handelsüblichen intranasalen Zubereitungen in PBS-Puffer (PBS) und KNS nach 30 min und nach 5 h Inkubationszeit [Mittelwert \pm Standardabweichung; n= 5].

3.4 Diskussion

3.4.1 Einfluss des Nasensekrets auf die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit von intranasalen Glucocorticoiden

Die physikochemischen Eigenschaften der nasal applizierten Glucocorticoide sind verantwortlich für ihre Lipophilie und geringe Wasserlöslichkeit. So sind auch von den untersuchten Wirkstoffen bereits Literaturwerte der Löslichkeiten in Wasser bekannt (siehe 1.3, *Tabelle 1*). Diese dienen allgemein als Diskussionsgrundlage für die pharmakokinetischen Vorgänge der Auflösung und Lösungsgeschwindigkeit der applizierten Kristalle eines inhalativen oder intranasalen Glucocorticoids auf der respiratorischen Schleimhaut. Angesichts des überwiegend wässrigen Charakters des Nasensekrets ist diese Herangehensweise durchaus gerechtfertigt. Dennoch ist der Einfluss der nasalen Proteine, allen voran der Hauptproteinkomponente Mucin, auf die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit gerade bei den modernen nasalen Glucocorticoiden von interessanter Bedeutung.

Eine langsame Auflösung applizierter Wirkstoffpartikel auf der nasalen Mukosa, wie sie

bei den lipophileren untersuchten Corticoiden anzunehmen ist, ist zunächst als positive Eigenschaft zu vermerken, da damit eine verlängerte nasale Kontaktzeit verbunden ist und eine Depotwirkung der Arzneiform erreicht werden könnte [133]. So berichten Bonsmann et al. über den Nachweis von Fluticasonpropionat nach nasaler Applikation von 2 x 50 µg über einen Zeitraum von 20 h im Nasensekret. Dabei wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation Patienten mit Hilfe von Wattetupfern eine Probe von Nasensekret entnommen und analysiert [69]. Dieser Wirkstoffnachweis im Sekret über Stunden ist einerseits durch den Anteil an appliziertem Corticoid zu erklären, der in dem vorderen Teil der Nasenhöhle deponiert wurde, und damit in Schleimhautarealen stattgefunden hat, die nicht von der mukoziliären Clearance betroffen sind [134,135]. Andererseits ist die langsame Auflösungs geschwindigkeit des Wirkstoffs im Mukus zu nennen, die für FP bereits im Bronchialsekret ermittelt wurde [42], was neben den Arzneistoffeigenschaften auch der physiologisch bedingten gering vorhandenen Sekretmenge nasaler wie bronchialer Natur zuzuschreiben ist. Außerdem ist der mögliche Einfluss der bioadhäsiven Eigenschaften der viskositätserhöhenden Hilfsstoffe, wie etwa der Cellulosederivate auf die mukoziliäre Clearance zu nennen. So gibt es gerade für die systemische Anwendung über die nasale Applikation von Arzneistoffen das Bestreben, die Kontaktzeit zur nasalen Mukosa zu verlängern.

Harris et al. stellten dabei fest, dass die Zugabe von Methylcellulose zu einer nasalen Formulierung mit Desmopressin eine Verlängerung der nasalen Clearancerate zur Folge hatte [66,136]. Eine andere Untersuchung zur topischen Anwendung einer Pulverformulierung mit Beclomethasondipropionat als Wirkstoff und Hydroxypropylcellulose wies ein Verbleib der Arzneiform von sechs Stunden auf der nasalen Mukosa nach und führte dies auf die bioadhäsiven Eigenschaften des Cellulosederivates zurück [122]. So kann auch bei den untersuchten Glucocorticoidpräparaten ein Einfluss der nasalen Kontaktzeit der Formulierung von den bioadhäsiven und die Viskosität beeinflussenden Eigenschaften angenommen werden.

Der Prozess der Auflösung stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar, der bei der Absorption nasal applizierter Suspensionen in das Zielgewebe beachtet werden muss. Die Lösungsgeschwindigkeit ist dabei maßgeblich von der Oberfläche des Feststoffes, der Dicke der Diffusionsschicht und dem Transport durch diese Schicht sowie der Sättigungslöslichkeit der Substanz abhängig. Die der Lösungsgeschwindigkeit zugrundeliegende Gesetzmäßigkeit ist die von Nernst und Brunner abgeleitete Beziehung, die sich aus der Noyes-Whitney Gleichung in Verbindung mit dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz ergibt [89]:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{D A}{h V} \times (c_s - c_t)$$

dc/dt	Lösungsgeschwindigkeit
D	Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs in der Diffusionsschicht
A	Oberfläche des Feststoffs
h	Dicke der Diffusionsschicht
V	Volumen der Lösung
c _s	Löslichkeit (Sättigungskonzentration des Stoffes im Lösungsmittel)
c _t	Konzentration des Arzneistoffs zur Zeit t

Die Lösungsgeschwindigkeit ist somit zur Oberfläche des Feststoffs, zum Diffusionskoeffizienten sowie zum Konzentrationsgefälle in der Diffusionsschicht direkt proportional. Der Konzentrationsgradient ($c_s - c_t$), als die Differenz zwischen der Konzentration einer gesättigten Lösung und der tatsächlichen Konzentration im Lösungsmittel, nimmt für schwerlösliche Arzneistoffe allerdings einen so geringen Zahlenwert an, dass die benetzbare Oberfläche der Partikel die eigentlich maßgebliche Einflussgröße wird.

So ist beim Auflösungsprozess von Suspensionen schwerlöslicher Glucocorticoide mit einem bestimmten Partikelspektrum anzunehmen, dass zunächst die kleineren Kristalle ($< 1 \mu\text{m}$) verstärkt, aufgrund des größeren Lösungsdrucks in Lösung gehen (siehe Ostwald-Freundlich Gleichung, 1.4.3.). Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus eigenen Experimenten (siehe 3.6, Experimenteller Teil C), in denen Fluticasonpropionatkristalle in einer Mucindispersion für unterschiedliche Zeiträume inkubiert wurden, lassen dabei diesen Vorgang erahnen. Das beobachtete Partikelgrößenspektrum lässt vermuten, dass sich über einen entsprechenden Inkubationszeitraum kleinere Kristalle bevorzugt auflösen und es zur Verkleinerung der Oberfläche der Partikel durch Abrundung kommt. Die Auflösung größerer Kristalle findet in geringerem Ausmaß und zeitlich verzögert statt (siehe *Abbildung 14*). So gewährleisten die unterschiedlichen Partikelgrößen in Form der kleinen Kristalle eine schnellere Auflösung und damit die Möglichkeit einer frühzeitigen Diffusion der gelösten Moleküle, während gerade die größeren Kristalle auf der Mukosaoberfläche ein Wirkstoffdepot bilden, welches durch einen langsameren Freisetzungsprozess aus der Arzneiform zusätzlich auch eine zeitlich nachgelagerte Wirkstoffabsorption in die Zielareale der nasalen Schleimhaut ermöglicht.

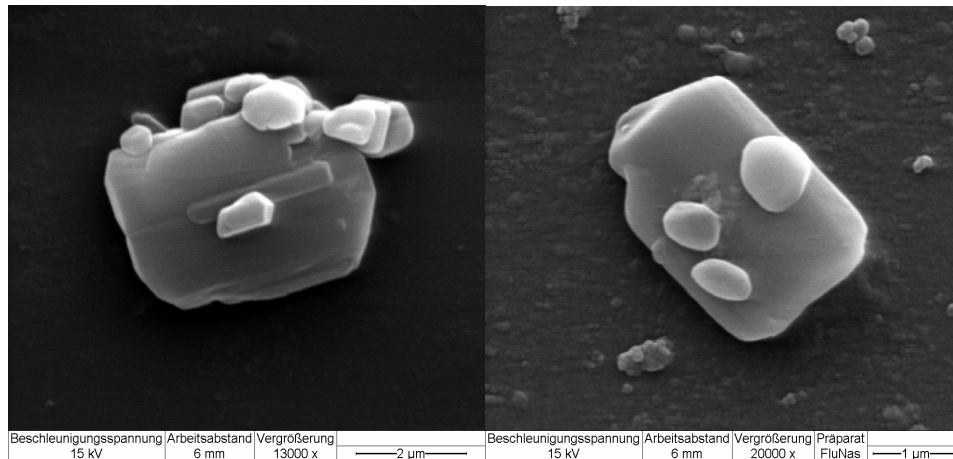


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Fluticasonpropionatkristallen aus Flutide® Nasetten nach 5 min Inkubation (links) bzw. nach 16 h Inkubation (rechts) in einer Mucindispersion.

Schließlich ist jedoch zu vermerken, dass in weiten Bereichen der Schleimhaut, in denen Glucocorticoidkristalle nach nasaler Applikation deponiert werden, die mukoziliäre Clearance für eine relativ schnelle Entfernung von Partikeln sorgt. Dies führt gerade bei Wirkstoffen mit geringer Löslichkeit und langsamer Auflösungsgeschwindigkeit zum schnellen Abtransport des ungelösten Wirkstoffanteils in den Rachenraum.

Die Beurteilung des Einflusses der im Nasensekret vorhandenen Proteine wie Mucin auf die Löslichkeit und Auflösungskinetik von Corticoiden und damit auf die beschriebenen physiologischen Vorgänge wurde durch das Experiment angestoßen. Es wurde zum ersten Mal eine Methode entwickelt, die es erlaubt, eine Aussage über den Einfluss von Proteinen eines selbst entwickelten künstlichen Nasensekrets (KNS) auf die Auflösung von Kristallen handelsüblicher intranasaler Glucocorticoid-Suspensionen zu machen. Die Zusammensetzung des Nasensekrets lässt den Schluss nahe, dass durch eine Bindung von Wirkstoffmolekülen an die Hauptprotein Komponente Mucin das Ausmaß an gelöster Substanz beeinflusst werden kann. Damit wurde die Betrachtungsweise bezüglich der Aspekte bei der Auflösung von nasalen Glucocorticoiden über die rein wässrigen Bedingungen hinaus erweitert, hin zu einer physiologisch naheliegenden Situation, wie sie durch das KNS simuliert wird.

So wurde bei den untersuchten Substanzen festgestellt, dass gerade bei Glucocorticoiden mit geringer Wasserlöslichkeit Proteine wie Mucin, welches im Nasensekret vorhanden war, zu einer deutlichen Steigerung an gelöstem Wirkstoff geführt haben. Trägt man

die Steigerung an gelöstem Wirkstoff in KNS im Vergleich zu PBS-Puffer gegen die Lipophilie der Substanzen, die in Form des log P-Wertes ausgedrückt werden kann (siehe 1.4.1, Tabelle 2), auf, so erhält man für die Substanzen TCA, Bud, FP, MF und FF einen linearen Zusammenhang (siehe Abbildung 15).

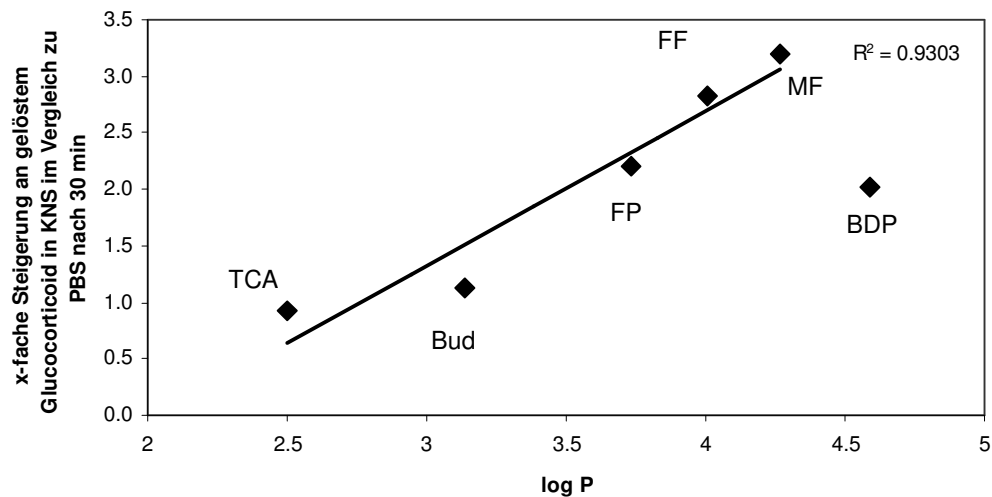


Abbildung 15: Korrelation zwischen der x-fachen Steigerung an gelöstem Glucocorticoid in KNS im Vergleich zu PBS nach 30 min von Triamcinolonacetonid (TCA), Budesonid (Bud), Fluticasonpropionat (FP), Fluticasonfuroat (FF), Mometasonfuroat (MF) und Beclomethason-17,21-dipropionat (BDP) und ihren berechneten log P-Werten (nach ACD/Labs Software, siehe 1.5 Experimenteller Teil C). Das Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.9303$ wurde für den Zusammenhang zwischen TCA, Bud, FP, MF und FF (ohne BDP) ermittelt.

Der Trend mit zunehmendem log P-Wert, auch eine vielfache Steigerung an gelöstem Glucocorticoid in KNS im Vergleich zu PBS-Puffer zu zeigen, setzt sich bei BDP zwar nicht linear fort, dennoch liegt die ermittelte halbstündige Steigerung an gelöstem Wirkstoffanteil des BDP in einem ähnlichen Bereich wie FP. So ist die Abweichung des BDP von dem beobachteten Zusammenhang zwischen der Steigerung an gelöstem Glucocorticoid und dem log P-Wert der anderen untersuchten Glucocorticoide möglicherweise einmal mehr mit dessen Diesterstruktur und somit von FP, MF und FF verschiedenen Strukturmerkmalen zu erklären, die für die Lipophilie und auch für die Bindung von Corticoidmolekülen an Mucin verantwortlich gemacht werden können. So wird BDP im Gegensatz zu den anderen genannten Wirkstoffen als Prodrug appliziert und erst im Zielgewebe durch Esterasen in Beclomethason-17-propionat, als aktiver Metabolit umgewandelt.

Somit bleibt festzuhalten, dass der Proteinanteil im Mukus einen Einfluss auf die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit von nasal applizierten Glucocorticoiden besitzt. Eine alleinige Betrachtung der Wasserlöslichkeit der Substanzen wird dem physiologischen Lösungsvorgang lipophiler Corticoide auf der Nasenschleimhaut offensichtlich nicht gerecht. Die verbesserte Löslichkeit nasal applizierter schwerlöslicher Glucocorticoide wie MF und FF im Nasensekret, durch eine Bindung der Moleküle an Mukus-Proteine ist eine Erklärung für deren ausreichende Penetration in die nasale Schleimhaut und dem Erreichen des entzündeten Zielgewebes trotz einer geringen Wasserlöslichkeit und der mukoziliären Clearance.

3.4.2 Überlegungen zu den molekularen Vorgängen der Mucin-Glucocorticoid-Wechselwirkung

Mucus ist charakterisiert als ein schwaches dreidimensionales Netzwerk, welches aufgrund seiner physikalischen Verknüpfungen, quervernetzenden Disulfidbrücken und sekundären chemischen, ionischen Bindungen entsteht. Als Hauptproteinkomponente besteht er aus linearen, hydratisierten Mucinmolekülen, die dem Konstrukt die nötige Flexibilität verleihen [116,117]. Die isotone Mukusschicht ist durch seine Pufferfunktion mit einem leicht sauren pH-Wert von ca. 6.5 gekennzeichnet [5,137]. Eigenschaften wie freie OH-Gruppen, Oligosaccharidseitenketten, negativ geladene Gruppen, die stark hydratisierte Gel-Matrix und die linearen, flexiblen und zufallsvernetzten Glykoproteine mit einem mittleren Molekulargewicht > 200 kDa führen zu der Fähigkeit, unspezifische Sekundärbindungen einzugehen [116,117,121]. Diese Charakteristika zeigen auf, dass im Mucin hydrophobe Bereiche entstehen, die eine Interaktion mit lipophilen Arzneistoffen wahrscheinlich machen [119].

So wurde versucht, durch den Einsatz von lyophilisiertem Mucin bei der Entwicklung des künstlichen Nasensekrets diesem eine dem nativen Mukus ähnliche Zustandsform zu geben. Allerdings muss angenommen werden, dass durch die für die Zentrifugationsvorgänge unumgängliche Aufarbeitung der Mucindispersion, gerade bezüglich der Molekularmasse der vorliegenden Glykoproteine, lediglich eine Näherung an die physiologischen Verhältnisse gelungen sein konnte. Es ist bekannt, dass rekonstituiertes, lyophilisiertes Mucin, wie es bei den Versuchen verwendet wurde, Untereinheiten von nativem Mucin beinhalten, welche durch den Lyophilisationsvorgang und enzymatischen Abbau zustande kommen. Bhat et al. untersuchten durch Zentrifugation aufgereinigtes rekonstituiertes gastrales Mucin und fanden dabei eine hochmolekulare Fraktion ($\sim 4 \times 10^5$ Da) sowie zwei niedermolekulare Fraktionen mit Molmassen von 1800 Da und 4000 Da in höheren Konzentrationen [138]. Die Aufarbeitung der Mucindispersion, wie sie bei der Aufreinigung mit Hilfe der Zentrifugation in den eigenen

Experimenten stattgefunden hat, lässt ebenso auf einen hohen Anteil an niedermolekularen Glykoproteinfraktionen schließen.

Die Fähigkeit von Mucin, unspezifische Bindungen mit Arzneistoffmolekülen einzugehen, wurde in verschiedenen Veröffentlichungen erwähnt. So wurde von Komiya et al. postuliert, dass es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Ergotalkaloiden und Mukus im Darm von Ratten kommt [139]. Wesentlich interessanter in diesem Zusammenhang sind Untersuchungen zur Diffusion von Arzneistoffen in Mukus. So fanden Matthes et al. heraus, dass die Diffusion von neutralen Arzneistoffen in Intestinalmucus und ihre Lipophilie eine signifikante inverse Korrelation aufzeigten [140,141]. Hierbei wurden u.a. auch die Glucocorticoide Hydrocortison, Dexamethason und Triamconolonacetonid untersucht. Die Autoren machten hydrophobe Wechselwirkungen der Arzneistoffe mit dem nicht glykosilierten Teil des Mucins bzw. die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxylgruppen der Glykoproteine für das Faktum verantwortlich, dass es zu einer nicht-spezifischen Bindung mit den Substanzen gekommen war. Die geschilderten Untersuchungen wurden dabei meist herangezogen, um die Glykoprotein-Arzneistoffwechselwirkung als eine mögliche Ursache für eine limitierte Diffusionsgeschwindigkeit gerade lipophiler Substanzen durch den Mukus und eine damit verbundene verlangsamte bzw. verringerte Absorption in das Darmepithel zu erklären.

So liegt es nahe, die erhöhte Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit der lipophilen nasalen Glucocorticoide im Nasensekret durch Mucusproteine, wie sie in den eigenen Untersuchungen festgestellt wurden, mit der Fähigkeit der Wirkstoffmoleküle sich in hydrophobe Mucinbereiche einzulagern, zu begründen. Durch die erhöhte Bereitschaft mit den Glykoproteinen eine unspezifische Bindung einzugehen, diffundieren die gelösten Moleküle schneller und in größerem Ausmaß von der Oberfläche der deponierten Arzneistoffkristalle weg, was somit im Auflösungsprozess zu einem steileren Konzentrationsgradienten führt.

Schließlich stellt sich die Frage, ob eine erhöhte Bindung der nasalen Glucocorticoide an Mucusproteine durch eine verminderte Diffusionsgeschwindigkeit im Nasensekret einen Einfluss auf die nasale Absorption der Substanzen besitzt, ähnlich wie es für lipophile Wirkstoffe im Gastrointestinaltrakt beschrieben wurde. So ist die Zusammensetzung des Mukus zwar in seinen Hauptbestandteilen auf allen menschlichen Schleimhäuten identisch [119], allerdings unterscheidet sich die Dicke der Mukusschicht von Organ zu Organ beträchtlich. Ist der Mukuslayer im menschlichen Magen mit 200-550 µm und im Darm mit 50-450 µm, so ist die nasale Schichtdicke des Mukus mit 5-10 µm demgegenüber als sehr dünn einzuordnen [5,119]. Dieser geringe Diffusionsweg in der respiratorischen Schleimhaut für einmal gelöste nasal applizierte Glucocorticoide macht einen Einfluss der unspezifischen Bindung an Mucusproteine

als Diffusionsbarriere unwahrscheinlich. Ebenso kann vermutet werden, dass die Zilienschläge, wie sie durch die Flimmerhärchen der nasalen Mukosa zustande kommen, die Diffusion gelöster Glucocorticoidmoleküle fördert.

Somit ist anzunehmen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur Absorption in das Zielgewebe bei der Applikation lipophiler, intranasaler Glucocorticoid-Suspensionen der Auflösungsprozess der sich auf der Schleimhaut befindlichen Kristalle ist. Dabei wird die Löslichkeit und die Lösungsgeschwindigkeit, vor allem der lipophileren Substanzen, durch die hydrophobe Wechselwirkung der Moleküle mit Bereichen der Glykoproteinfraktion des nasalen Mukus positiv beeinflusst. Einmal gelöste Moleküle können schließlich durch die geringe Diffusionsbarriere und die hohen Permeabilitätskoeffizienten der Substanzen schnell das entzündete Zielgewebe erreichen.

4 Bindung intranasal angewendeter Glucocorticoide an humanes Nasengewebe

Die nasale Anwendung von Glucocorticoiden mit dem primären Ziel der Behandlung einer lokalen Entzündungsreaktion, die durch eine allergisch bedingte Grunderkrankung hervorgerufen wird, hat den Vorteil der Erzeugung hoher Arzneistoffkonzentrationen am Applikationsort und damit auch im Zielgewebe. So kommt es durch die galenische Entwicklung der wässrigen Glucocorticoid-Suspensionen und durch die physikochemischen Eigenschaften der Wirkstoffe zunächst zu einem Wirkstoffdepot auf der nasalen Mukosa. Lediglich der gelöste Wirkstoff ist allerdings in der Lage, von der Oberfläche der nasalen Mukosa in epitheliale und subepitheliale Gewebereiche der respiratorischen Schleimhaut zu diffundieren. Die respiratorische Schleimhaut, welche die Nasenhaupthöhle auskleidet, weist eine Dicke von 0.3-5 mm auf [5] und erstreckt sich auf einer Fläche von 120-150 cm² [2,3,142]. Bei der Geschwindigkeit, die nasale Epithelbarriere zu überwinden, ist die Lipophilie im Vergleich mehrerer Substanzen ein entscheidender Parameter. Lin et al. ermittelten einen linearen Zusammenhang zwischen der Lipophilie in Form des Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten und dem Permeabilitätskoeffizienten verschiedener antiallergischer Wirkstoffe an menschlichen nasalen Epithelzellen [143]. Die Diffusion der Glucocorticoide von dem mehrreihigen Flimmerepithel in tiefere Schleimhautbereiche wie die angrenzende Basalmembran und die darunterliegende Lamina propria mit ihren Bindegewebszellen sorgt für eine ausreichende Verteilung der Wirkstoffe auch in tieferliegende Gewebeschichten.

Die Penetration von topisch applizierten Corticosteroiden durch menschliches Nasengewebe sorgt für eine hohe lokale Konzentration mit dem Effekt, die eigentliche Zielstruktur, den intrazellulären, cytosolischen Glucocorticoidrezeptor schnell zu erreichen. Vergleicht man die Gewebekonzentration von Fluticasonpropionat in der Lunge nach inhalativer Gabe von 1000 µg, welche in einer Studie von McDowall et al. mit 15-22 ng/g in zentralen Lungensegmenten ermittelt wurde, mit der Gewebekonzentration desselben Wirkstoffs einer nasalen Dosis von 100 µg pro Nasenloch, die bei Bonsmann et al. einen Wert von 100-200 ng/g ergab, so zeigt sich die aufgrund der wesentlich kleineren Mukosaoberfläche des Zielorgans Nase als relativ hoch einzustufende Dosis [144]. Es ist also davon auszugehen, dass bei der Applikation der üblichen Dosierungen die Gewebekonzentration in der Nase im Vergleich zur Lunge als wesentlich höher einzuschätzen ist. Außerdem kamen Miller-Larsson zu dem Schluss, dass es bereits in der Lunge bei klinisch relevanten Dosierungen von Glucocorticoiden

zu einer Sättigung der Glucocorticoidrezeptoren kommt [145,146]. Dies führt dazu, da man in Bereichen der respiratorischen Gewebe von ähnlichen Rezeptorzahlen ausgehen kann, dass eine Sättigung der Glucocorticoidrezeptoren in den Zielzellen nach nasaler Applikation einer üblichen Glucocorticoiderhaltungsdosis nicht ausgeschlossen werden kann und die Frage aufgeworfen werden muss, was mit dem anderen absorbierten Wirkstoffanteil im Gewebe passiert, welcher nicht mit den gesättigten Glucocorticoidrezeptoren spezifisch und hochaffin wechselwirken kann.

Gerade die Tatsache, dass die meisten Glucocorticoide zur nasalen Anwendung lediglich einmal täglich appliziert werden müssen, um eine ausreichende Symptomkontrolle zu erreichen, führt zu der Annahme, dass deren klinische Effizienz und Wirkungsdauer auch von dem Ausmaß der unspezifischen Bindung der Substanzen an Zellstrukturen herrührt [147]. Durch eine verlängerte Präsenz von Corticoidmolekülen im Nasengewebe bildet sich ein Wirkstoffdepot in den Zielarealen, womit ein verbessertes Erreichen des Glucocorticoidrezeptors auch zu einem späteren Zeitpunkt nach Applikation gewährleistet werden kann [25].

Das Ausmaß der Gewebefindung nasal applizierter Glucocorticoide muss allerdings auch im Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten unerwünschter Wirkungen betrachtet werden. So ist eine hohe Bindung an das Nasengewebe für eine langsame Umverteilung in die systemische Zirkulation erwünscht, womit eine geringe Plasmakonzentration verbunden ist und die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Wirkungen verringert wird [23]. Die Umverteilung der Wirkstoffe in das Blutkompartiment ist demnach auch abhängig von der Durchblutung der nasalen Schleimhaut und den tieferliegenden Gewebeschichten. Die Vaskularisierung der respiratorischen Schleimhaut ist subepithelial in Form eines Kapillarnetzes ausgebildet und in den mittleren und tieferen Schleimhautschichten vor allem durch Kapazitätsgefäße geprägt [5]. Während die Kapillargefäße den mukosalen Blutfluss regulieren, sowie neben der Versorgung der Schleimhaut mit Nährstoffen und Sauerstoff auch für den Austritt von Plasma verantwortlich sind, sind die Kapazitätsgefäße bezüglich der Durchblutung stark variabel und für die Regulation des Volumens der Nasenhaupthöhle und den nasalen Zyklus durch An- und Abswellen der Schleimhaut wichtig.

4.1 Fragestellung

Die physikochemischen Merkmale der nasalen Glucocorticoide sind mitbestimmend für ihre pharmakokinetischen Eigenschaften. So spielt die Lipophilie der Substanzen, neben dem bereits erwähnten Einfluss der Permeabilität durch die Epithelbarriere und die Schichten der Schleimhaut, auch eine entscheidende Rolle bei der unspezifischen Bindung an

respiratorisches Gewebe. So wurden eine Reihe von Untersuchungen zur Bindung von Glucocorticoiden an humanes Lungengewebe durchgeführt, die einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Gewebefindung der Wirkstoffe und ihrer Lipophilie hergestellt haben [148,149]. Diese Korrelation ist neben dem Lungengewebe auch bei Haut- und Nasengewebe festgestellt worden [150]. Neben der Lipophilie als Ursache für eine längere Verweildauer in respiratorischem Gewebe wird eine reversible Bindung von verschiedenen Wirkstoffen wie Budesonid an Fettsäuren über eine Esterverknüpfung postuliert [147].

Der Nachweis von intranasalen Glucocorticoiden im Nasengewebe von Patienten in Form einer Biopsieentnahme nach nasaler Applikation wässriger Suspensionen ist bislang nur in wenigen Studien vorgenommen worden [69,147]. Dabei wurden meist nur wenige Wirkstoffe miteinander verglichen oder lediglich Einzeluntersuchungen zu Glucocorticoiden veröffentlicht. Dies erschwert einen direkten Vergleich mehrerer unterschiedlicher Wirkstoffe bezüglich ihrer Gewebefindung anhand von *in vivo* Studien.

Und auch zur *in vitro* Bindung an humanes nasales Gewebe von Glucocorticoiden der neueren Generation, im Vergleich zu in der Therapie bereits bewährten Wirkstoffen, sind wenige Untersuchungen vorhanden. So sollte ein Vergleich des Gewebefindungsverhaltens der Substanzen Budesonid und Triamcinolonacetonid, bekannt als weniger lipophile Substanzen, und den lipophileren Fluticasonpropionat, Mometasonfuroat und Fluticasonfuroat durchgeführt werden. Mit Hilfe von *in vitro* Untersuchungen sollte die Bindung der Glucocorticoide an humanes nasales Gewebe untersucht werden. Zusätzlich sollte die Freisetzung der Wirkstoffe aus der Gewebefindung in Humanplasma ermittelt werden, um die Umverteilung in das Blutkompartiment zu simulieren.

4.2 Prinzip der Bestimmung

Zur Bestimmung der Bindung an Nasengewebe wurde fein geschnittenes humanes nasales Gewebe aus einem Pool mit glucocorticoidhaltigem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer bei 37 °C inkubiert (siehe 4.3 Experimenteller Teil C). Nach einstündiger Inkubationszeit war die maximale Bindung an das Gewebe erreicht, sodass dem Puffer Proben entnommen wurden.

Das mit dem jeweiligen Glucocorticoid gesättigte Gewebe wurde nun nach einem Waschvorgang in auf 37 °C vortemperiertes Humanplasma überführt und gleichmäßig geschüttelt (siehe 4.4 Experimenteller Teil C). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden der Gewebesuspension Plasmaproben entnommen, um die Freisetzung aus der Gewebefindung in das Blutkompartiment zu bestimmen. Das entsprechende Volumen an entnommenem Plasma wurde nach jeder Probennahme ersetzt.

4.3 Ergebnisse

Die Bindung der nasal angewandten Glucocorticoide unterschied sich zwischen den lipophileren Substanzen FF, FP und MF auf der einen Seite und den hydrophileren Wirkstoffen Bud und TCA auf der anderen Seite beträchtlich. Die Inkubation von humanem Nasengewebe in einer Glucocorticoid enthaltenden Pufferlösung bei 37 °C über 1 h stellt die maximale Sättigung des Gewebes mit Wirkstoff dar. So betrug die Bindung von Fluticasonfuroat an humanes Nasengewebe 3.54 ± 0.13 ng/mg Gewebe und stellte somit die höchste gemessene Gewebekonzentration dar. Die Adsorption von MF an das Gewebe war mit 2.96 ± 0.12 ng/mg etwas geringer als für FF. Die Gewebekonzentration des FP vor der Inkubation in Humanplasma wurde mit 2.83 ± 0.23 ng/mg in einer vergleichbaren Größenordnung wie für MF ermittelt und erreichte somit ebenfalls nicht die maximale Gewebekonzentration des FF. Im Gegensatz zu den eben erwähnten lipophileren Glucocorticoiden wurden für Bud mit 1.01 ± 0.27 ng/mg und für TCA mit 0.60 ± 0.15 ng/mg erwartungsgemäß geringere Gewebekonzentrationen nach dem Adsorptionsexperiment gemessen (siehe *Abbildung 16*).

Die Überführung des gesättigten Gewebes in auf 37 °C temperiertes Humanplasma stellte die Möglichkeit dar, die Desorption der Wirkstoffe von den Gewebestrukturen in das für die Umverteilung physiologisch relevante Blutkompartiment zu simulieren. So konnten nach halbstündiger Plasmainkubation für FF mit 1.52 ± 0.33 ng/mg die höchste Gewebekonzentration ermittelt werden. Für FP wurden 1.34 ± 0.13 ng/mg und für MF 0.98 ± 0.15 ng/mg zu diesem Zeitpunkt gemessen. Die hydrophileren Substanzen folgten den Vorgenannten für Bud mit 0.48 ± 0.24 ng/mg und für TCA mit 0.34 ± 0.15 ng/mg (siehe *Abbildung 16*).

Nach 60 min Inkubationszeit in Humanplasma wurden für FP mit 1.01 ± 0.08 ng/mg und FF mit 0.95 ± 0.22 ng/mg ähnlich hohe Konzentrationen im Gewebe ermittelt. MF dagegen zeigte mit 0.65 ± 0.05 ng/mg, Bud mit 0.39 ± 0.23 ng/mg und TCA mit 0.33 ± 0.15 ng/mg geringere Gewebekonzentrationen auf (siehe *Abbildung 16*).

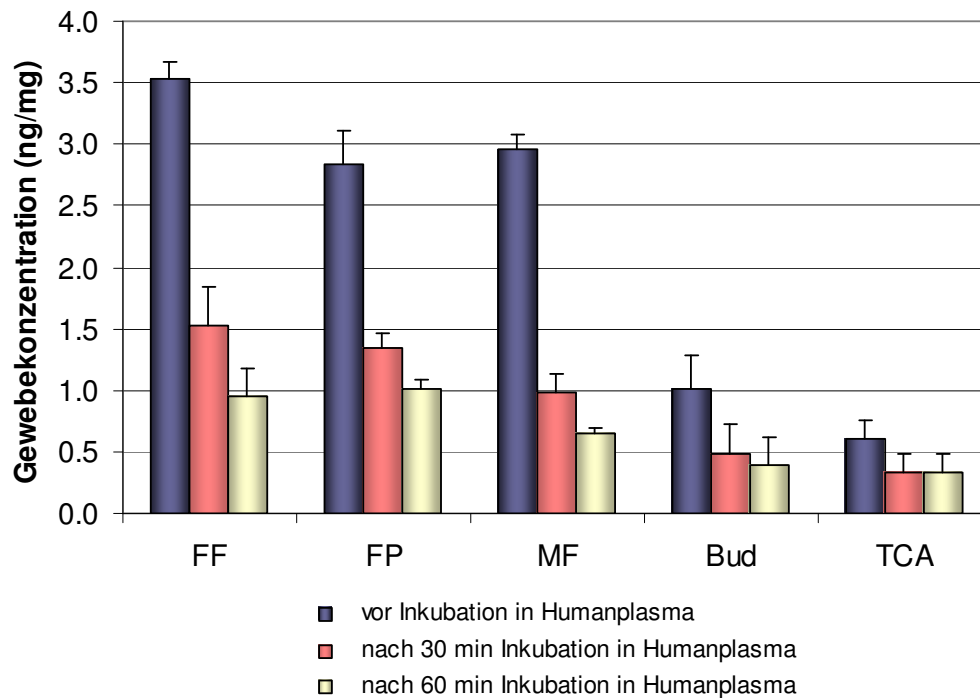


Abbildung 16: Vergleich der Bindung von Fluticasonfuroat (FF), Fluticasonpropionat (FP), Mometasonfuroat (MF), Budesonid (Bud) und Triamcinolonacetonid (TCA) an humanes Nasengewebe. Die jeweils linke Säule stellt die Gewebekonzentration des mit Wirkstoff gesättigten Gewebes nach einstündiger Inkubation in wirkstoffhaltiger Pufferlösung vor der Inkubation in Humanplasma dar. Die jeweils mittlere und rechte Säule zeigt die Gewebekonzentration nach 30- und 60-minütiger Inkubation des gesättigten Gewebes in Humanplasma bei 37 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier Experimenten für FF, FP und MF bzw. von drei Experimenten für Bud und TCA.

Eine weitere Möglichkeit, die Ergebnisse der Gewebekonzentration darzustellen und die Unterschiede der untersuchten Glucocorticoide aufzuzeigen, ist die Fläche unter der Gewebekonzentrations-Zeit-Kurve als Integral (AUC) zu berechnen. So ergab die AUC über eine Stunde nach der Inkubation in Humanplasma für FF mit $104.8 \pm 13.5 \text{ ng/mg} \cdot \text{min}$ den größten Wert. Darauf folgten FP mit $90.7 \pm 8.6 \text{ ng/mg} \cdot \text{min}$ und MF mit $73.6 \pm 4.9 \text{ ng/mg} \cdot \text{min}$ als weitere Vertreter der lipophileren und hochpotenten nasalen Corticosteroide. Die hydrophileren Substanzen Bud mit $32.5 \pm 14.4 \text{ ng/mg} \cdot \text{min}$ und TCA mit $22.0 \pm 8.4 \text{ ng/mg} \cdot \text{min}$ zeigten auch hier, wie erwartet, deutlich geringere Flächen unter den Gewebekonzentrations-Zeit-Kurven über die untersuchte Stunde der Desorption in Humanplasma (siehe *Abbildung 17*).

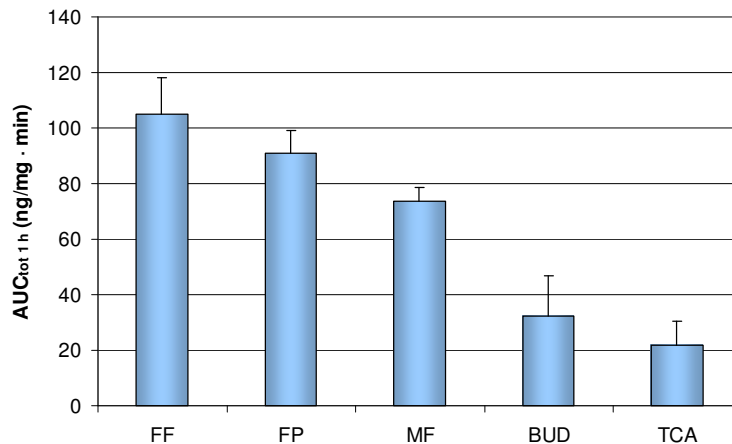


Abbildung 17: Vergleich der Fläche unter der Gewebe-Konzentrations-Zeit-Kurve über eine Stunde für Fluticasonfuroat (FF), Fluticasonpropionat (FP), Mometasonfuroat (MF), Budesonid (Bud) und Triamcinolonacetonid (TCA). Die Säulen stellen die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier Experimenten für FF, FP und MF bzw. von drei Experimenten für Bud und TCA dar.

4.4 Diskussion

4.4.1 Gewebefindung im Zusammenhang mit physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Glucocorticoide

Das Ziel einer Therapie mit intranasalen Glucocorticoiden ist, im entzündeten Zielgewebe eine hohe Wirkstoffkonzentration zu erreichen. Dies kann durch eine topische Applikation der Wirkstoffformulierung gewährleistet werden. Es kommt somit zu einer hohen Effektivität der eingesetzten Dosis, da im Verhältnis zu einer systemischen Therapie lokal mit wesentlich weniger Wirkstoff therapiert werden muss. Für das Erreichen des intrazellulären Glucocorticoidrezeptors als Zielstruktur sind auf Seiten des Wirkstoffs eine Reihe von Eigenschaften bedeutsam. So sind die Löslichkeit der Substanzen in der Arzneiform und die Auflösungsgeschwindigkeit der Kristalle im Nasensekret zunächst wichtig, um gelösten Arzneistoff auf der Mukosa für die Absorption bereitzustellen. Daneben sind die Permeabilität der gelösten Substanz durch die Epithelbarriere sowie die Retention im Zielgewebe zu nennen. Wichtig für das pharmakokinetische Verhalten der unterschiedlichen Glucocorticoide in diesem Zusammenhang ist die physikochemische Eigenschaft der Lipophilie der einzelnen Substanzen.

Es ist bekannt, dass die Lipophilie der nasalen Glucocorticoide als eine bedeutende

Eigenschaft der Substanzen anzusehen ist, die sowohl für die Bindung an den cytosolischen Glucocorticoidrezeptor relevant ist, welche experimentell durch die relative Rezeptoraffinität der jeweiligen Substanzen ermittelt werden kann wie auch für die unspezifische Bindung der Arzneistoffe an Gewebestrukturen [151]. So konnte eine hohe Korrelation zwischen der in den eigenen Versuchen ermittelten Bindung der Substanzen an Nasengewebe und den bereits literaturbekannten jeweiligen relativen Rezeptoraffinitäten hergestellt werden, die sich in Form eines Korrelationskoeffizienten von 0.971 ausdrückt [148,152,153] (siehe *Abbildung 18*). Dieser Zusammenhang zeigt zum einen, dass der experimentelle Versuchsaufbau in Form der durchgeführten *in vitro* Untersuchung eine gute Möglichkeit darstellt, die Unterschiede zwischen den Substanzen aufzuzeigen und eine Voraussage für die *in vivo* Verhältnisse zuzulassen, zum anderen untermauert er die Plausibilität der Ergebnisse in Verbindung mit bereits bekannten Erkenntnissen.

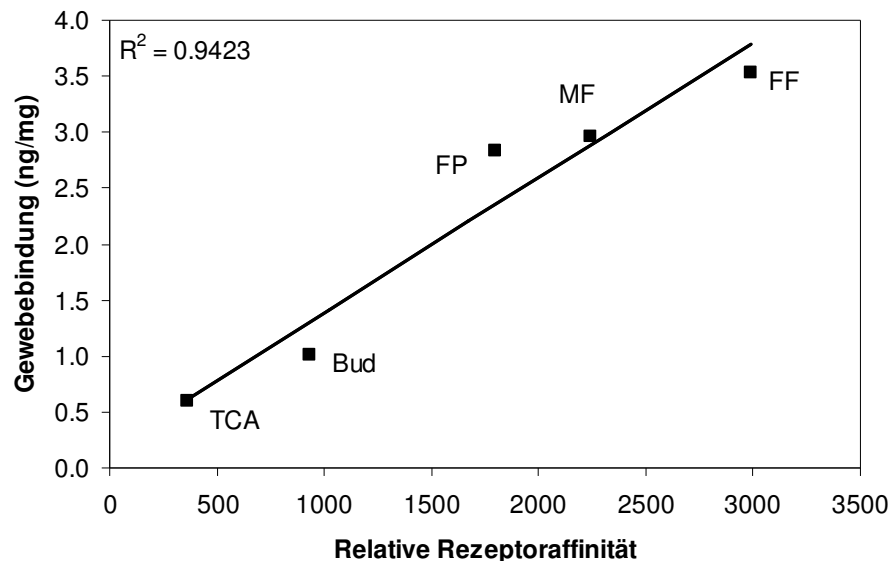


Abbildung 18: Korrelation zwischen der ermittelten Bindung der Substanzen an humanes Nasengewebe und der relativen Affinität des jeweiligen Glucocorticoids zum humanen Glucocorticoidrezeptor [148,153-155]. Der Korrelationskoeffizient wurde mit $r = 0.971$ bestimmt. Prüfung des Korrelationskoeffizienten r auf Signifikanz ergab $p < 0.01$ (Zweiseitiger Test, $n = 5$) [156].

So haben bereits Esmailpour et al. Untersuchungen zur *in vitro* Gewebepbindung nasaler Glucocorticoide vorgenommen. Neben Flunisolid und Beclomethason-17-propionat wurden dabei auch Bud und FP, die neben TCA, MF und FF auch in den selbst durchgeführten Experimenten verglichen wurden, untersucht. Wenn auch in den eigenen Untersuchungen nach einer Stunde Freisetzung im Vergleich zu den Ergebnissen von Esmailpour et al. insgesamt weniger Arzneistoff im Gewebe zurückgeblieben ist, so ist dennoch beiden Studien gemein, dass schließlich mehr als zweimal so hohe Gewebekonzentrationen von FP im Vergleich zu Bud am Ende vorlagen [151].

Außerdem wurde von Salter et al. das Retentionsverhalten verschiedener nasaler Glucocorticoide an einen Monolayer einer humanen Lungenepithelzelllinie untersucht. So kam es dabei zur stärksten Assoziation an die Zellen von FF, gefolgt von MF und FP. Bud zeigte hingegen im Vergleich der vier Arzneistoffe die geringste Bindung an den Zellmonolayer. Die Bestimmung des Fluxes der Substanzen aus dem Monolayer bestätigte das Verhalten der Substanzen. Hierbei kam es bei Budesonid zur größten Flussrate in das Zellkulturmedium. Es folgten FP, MF und FF mit jeweils geringerem Flux aus dem Monolayer in das umgebende Medium [157].

Grundsätzlich ist der deutliche Unterschied in der Gewebepbindung zwischen den weniger lipophilen Substanzen Bud und TCA sowie den lipophileren Substanzen FP, MF und FF in den Experimenten zu benennen. FF zeigte dabei als sehr lipophile Substanz die größte maximale Bindung an humanes Nasengewebe *in vitro*. Fasst man die Gewebekonzentrationen vor der Inkubation in Humanplasma sowie die Daten zur Freisetzung der gewebegebundenen Wirkstoffe in Humanplasma in Form der AUC über eine Stunde zusammen, so kann folgende Klassifizierung zur Bindung an humanes nasales Gewebe vorgenommen werden: FF > FP > MF > Bud > TCA.

Das Verteilungsvolumen im steady state (V_{dss}) reflektiert als pharmakokinetischer Parameter die Verteilung zwischen dem Blutkompartiment und dem Gewebe, nach einer intravenösen Gabe eines Arzneistoffs, nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts. Die Verteilungsvolumina der untersuchten Wirkstoffe können deshalb einen Hinweis auf ihre unspezifische Gewebepbindung geben. So sind bei den weniger lipophilen Substanzen für TCA ein V_{dss} von 1.4 l/kg [158], sowie für Bud ein V_{dss} von 2.6 l/kg [159] literaturbekannt. Die lipophileren FP ($V_{dss}= 4.5$ l/kg [160]), MF ($V_{dss}= 4.3$ l/kg [161]) und FF ($V_{dss}= 5.2$ [162] bzw. $V_{dss}= 9.2$ [106]) zeigen im Vergleich zu den vorgenannten Bud und TCA deutlich höhere Verteilungsvolumina, was plausibel einhergeht mit den in den eigenen Versuchen ermittelten höheren Gewebepaffinitäten.

4.4.2 Bedeutung der Gewebbindung

Die Bindung an das Gewebe stellt für den Wirkstoff zu einem späteren Zeitpunkt nach Applikation eine Möglichkeit dar, von den unspezifischen Bindungsstellen im Gewebeverbund zu der spezifischen Bindungsstelle, dem Glucocorticoidrezeptor, zu diffundieren und somit durch das je nach Gewebeeaffinität erreichte Depot, eine erneute Rezeptorbesetzung zu ermöglichen.

Betrachtet man die Ergebnisse einer *in vivo* Studie, bei der sich nach intranasaler Applikation einer wässrigen Wirkstoffsuspension von 2 x 50 µg Fluticasonpropionat die Gewebekonzentration von zunächst 100-200 ng/g im Verlauf über 24 h auf schließlich 13-18 ng/g verringerte, so erkennt man die lange Nachweisbarkeit von Wirkstoff im Zielgewebe [69]. Dies ist neben der hohen Gewebbindung auch dem auf der nasalen Mukosa befindlichen ungelösten Wirkstoffanteil zuzuschreiben, der eine langsame Freisetzung des Arzneistoffs aus der Arzneiform ermöglicht. Hierbei ist zu bemerken, dass vermutlich lediglich die vorderen Bereiche der Nasenhöhle, die nicht von der mukoziliären Clearance betroffen sind, als Depot für den auf der Mukosa deponierten Wirkstoff dienen können. Die Untersuchung zeigte außerdem, dass zwar wenige Stunden nach der Applikation hohe Gewebekonzentrationen vorliegen, aber im weiteren Verlauf die im Zielgewebe befindliche Menge an Wirkstoff, wie erwartet, deutlich abnahm. So ist gerade viele Stunden nach Applikation, wenn also die Gewebekonzentration deutlich reduziert ist und eine Rezeptorsättigung deshalb unwahrscheinlich ist, anzunehmen, dass die Gewebbindung der Substanzen von Bedeutung ist. So kann erwartet werden, dass bei Substanzen mit hoher Gewebbindung, in Verbindung mit einer langsamen Auflösungs geschwindigkeit der Kristalle über einen langen Zeitraum, nennenswerte Wirkstoffkonzentrationen im Gewebe vorhanden sind, die eine pharmakologische Wirkung durch Erreichen des Glucocorticoidrezeptors ermöglichen. Im Gegensatz dazu ist bei Wirkstoffen, die aufgrund ihrer höheren Wasserlöslichkeit zu einer raschen Auflösung der deponierten Arzneistoffkristalle auf der nasalen Mukosa führen, anzunehmen, dass nach der Applikation durch ihre geringere Gewebbindung eine schnelle Absorption des nasal deponierten Wirkstoffanteils in die systemische Zirkulation erfolgt.

Neben der Bedeutung für die pharmakologische Effektivität des in das Zielgewebe absorbierten Wirkstoffanteils kann die Gewebbindung im Zusammenhang mit der Sicherheit der intranasalen Glucocorticoide diskutiert werden. Glucocorticoide, die topisch appliziert werden, gelangen aufgrund der lokalen Anwendung zu einem geringen Anteil in die systemische Zirkulation. Ein Teil der applizierten Dosis wird durch die mukoziliäre Clearance verschluckt und je nach Wirkstoff mehr oder weniger präsystemisch über die Leber eliminiert. Der Wirkstoffanteil allerdings, der nach Applikation und Auflösung der Kristalle auf der Schleimhaut im Nasengewebe aufgenommen wird, gelangt nach der Umverteilung aus dem

Gewebe in das Blutkompartiment und somit unter Umgehung des first pass Effekts in die systemische Zirkulation [23,25]. Liegt eine geringe Gewebefixierung vor, ist eine schnelle Umverteilung des Wirkstoffs möglich, wodurch ein unerwünschter Anstieg der Plasmakonzentration denkbar wäre. Umgekehrt sorgt eine hohe Gewebefixierung für eine langsame Freisetzung des gebundenen Wirkstoffs in die systemische Zirkulation mit erwünschten geringen Plasmakonzentrationen. Neben der Höhe der Plasmakonzentrationen nach nasaler Applikation sind auch die pharmakodynamischen Eigenschaften der zum Vergleich stehenden Wirkstoffe bezüglich ihrer Sicherheit mitzubeachten. So ist bei nasalen Glucocorticoiden mit ihren relativ geringen Plasmakonzentrationen nach nasaler Applikation dennoch deren theoretisch größeres Potenzial für unerwünschte systemische Arzneimittelwirkungen im Hinterkopf zu behalten.

Durch ihre pharmakodynamischen Effekte beeinflussen die Wirkstoffe gleichzeitig ihre eigene Pharmakokinetik. So ist bekannt, dass intranasale Glucocorticoide zu einer Reduktion der Schleimhautdurchblutung führen. Außerdem wird die Durchlässigkeit der Plasmamembranen, die als eine Folge der Entzündungsreaktion auftritt, vermindert [33]. So sorgt die membranstabilisierende und antiinflammatorische Wirkung der Glucocorticoide zu geringeren Konzentrationen an Albumin und Bradykinin im Nasensekret, was dem antiexsudativen Effekt der Wirkstoffe zuzurechnen ist [163]. Folglich kommt es dadurch zu einer Verminderung des entzündlichen Ödems in der Nasenschleimhaut, die nasale Obstruktion nimmt ab und eine verbesserte Nasenatmung des Patienten wird ermöglicht. Schließlich ist denkbar, dass gerade bei mehrtägiger Therapie mit intranasalen Glucocorticoiden durch einen durchblutungsmindernden Effekt in der Nase eine Retention im Zielgewebe zusätzlich gefördert wird.

4.4.3 Relevanz der Gewebefixierung

Um die Relevanz des Konzepts der Depotbildung im Gewebe zu erörtern, muss in diesem Zusammenhang die *in vitro* ermittelte Dauer der Rezeptorbindung herangezogen werden. So wurden von Valotis et al. bei *in vitro* Untersuchungen zur Rezeptoraffinität die Halbwertszeiten der Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexe von MF und FP für beide Arzneistoffe mit etwa 10 h ermittelt. Im Vergleich dazu wurde die Dissoziation für Bud aus dem Rezeptorkomplex mit einer Halbwertszeit von 4.6 h bestimmt [154]. Diese Daten sind neben der Assoziation an den Rezeptor wichtig für die Beurteilung der relativen Rezeptoraffinität (RRA) und damit der Potenz der Wirkstoffe. Je höher die RRA ist, desto mehr Rezeptoren sind besetzt, beim Vergleich einer entsprechenden Wirkstoffkonzentration der unterschiedlichen Glucocorticoide im Zielgewebe.

Ist also die vorhandene Wirkstoffkonzentration so gering, dass nicht alle Rezeptoren besetzt sind, so sorgt eine höhere RRA für einen stärkeren pharmakologischen Effekt.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass es bei der Betrachtung der aktuellen Studienlage bislang keine Anzeichen gibt, dass sich die intranasalen Glucocorticoide bezüglich ihrer klinischen Wirksamkeit unterscheiden [25,164,165]. Dies ist einerseits der effektiven lokalen Therapie und der Eignung aller untersuchten Glucocorticoide für die Indikation der allergischen Rhinitis aufgrund ihrer starken antiinflammatorischen Wirkung zuzuschreiben, andererseits ist die eingangs geschilderte hohe zu erwartende Gewebekonzentration zu nennen, die aufgrund der bei den einzelnen Wirkstoffen empfohlenen Dosierungen für die Initial- und Erhaltungstherapie zustande kommen. So ist denkbar, dass die hohen Gewebekonzentrationen kurze Zeit nach der Applikation zu einer nahezu vollständigen Rezeptorbindung führen und dadurch die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Unterschiede der einzelnen Substanzen an Relevanz bezüglich der klinischen Wirksamkeit verlieren.

5 Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch gewebegebundene intranasale Glucocorticoide

Die pharmakodynamischen Eigenschaften der intranasalen Glucocorticoide sind fast ausschließlich auf ihre genomischen Effekte zurückzuführen. Dem Erreichen des Glucocorticoidrezeptors, als der cytosolischen Zielstruktur, die nach der Bindung des Wirkstoffs in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor fungiert, geht eine passive Diffusion des Wirkstoffs durch die Zellmembran voran. Ein Teil der corticoiden Wirkungen ist auch auf direkte Protein-Wechselwirkungen zwischen dem GC-Rezeptorkomplex und Transkriptionsfaktoren proinflammatorischer Gene zurückzuführen [166]. Der Glucocorticoidrezeptor, der für die zahlreichen antiinflammatorischen Wirkungen verantwortlich ist, kommt in fast allen menschlichen Geweben vor und wurde auch in mukosalen Epithelzellen, submukosalen Drüsen und Entzündungszellen der Nasenschleimhaut nachgewiesen [166,167]. Allerdings hängen mit dem ubiquitären Vorkommen des Rezeptors im menschlichen Körper auch die möglichen unerwünschten systemischen Glucocorticoidwirkungen zusammen, deren Auftreten jedoch durch die topische Anwendung, je nach Wirkstoff und Dosierung, als wenig wahrscheinlich eingestuft werden kann [29,48].

Die Affinitäten der synthetischen Glucocorticoide zum Glucocorticoidrezeptor variieren teilweise stark und korrelieren gut mit der pharmakologischen Aktivität der unterschiedlichen Substanzen [133]. So sind auf molekularer Ebene zahlreiche pharmakodynamische Effekte der nasalen Glucocorticoide beschrieben, die für die Behandlung der allergischen Rhinitis relevant sind. *In vivo* Studien zeigten nach nasaler Allergenprovokation zum einen bei präventiver Behandlung mit intranasalem Fluticasonpropionat, zum anderen nach Einmalanwendung von Budesonid eine Abnahme von IL-5 und IL-13 Konzentrationen, sowohl in Gewebebiopsieproben als auch in nasaler Lavage [168-170]. Neben IL-5, welches durch die Stimulation von Eosinophilen eine zentrale Rolle im Krankheitsgeschehen der allergischen Rhinitis spielt, und IL-13, welches in der Spätphasenreaktion der allergischen Reaktion zur Obstruktion der Nase beiträgt, gibt es eine Reihe weiterer Cytokine, die für die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion verantwortlich sind [33,171]. So ist für IL-8 bekannt, dass es die Chemotaxis und die Aktivierung von Neutrophilen fördert. In *in vitro* Untersuchungen ist bereits nachgewiesen worden, dass Glucocorticoide die Freisetzung von IL-8 aus Epithelzellen reduziert [172,173].

5.1 Fragestellung

Die Möglichkeit, einen pharmakologischen Effekt durch Rezeptoraktivierung seitens des Glucocorticoids auszuüben, ist von der freien Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe abhängig. Weiter ist einleuchtend, dass eine hohe Glucocorticoidkonzentration im Nasengewebe die Wahrscheinlichkeit für die Besetzung der Rezeptoren erhöht. Auf der anderen Seite ist die Rezeptoraffinität der Wirkstoffe wichtig für die Rezeptorbesetzung und die daraus resultierenden pharmakodynamischen Effekte.

Die Bestimmung der *in vitro* Gewebbindung von Glucocorticoiden für die inhalative, wie nasale Applikation, ermöglicht es die Gewebaffinität der Wirkstoffe bei der Adsorption und der Freisetzung in Humanplasma im zeitlichen Verlauf einzuschätzen und lassen somit eine Aussage über die *in vivo* zu erwartende Pharmakokinetik zu.

Die pharmakodynamischen Unterschiede der einzelnen Corticosteroide können sowohl durch die Bestimmung der relativen Rezeptoraffinitäten erfasst werden als auch durch pharmakologische Untersuchungen verschiedener Signaltransduktionswege der Entzündungsreaktion am Tiermodell oder in der Zellkultur *in vitro* aufgezeigt werden [157].

Die Herausforderung bestand nun darin einen Versuchsaufbau zu etablieren, der die Pharmakokinetik nasaler Glucocorticoide mit der Pharmakodynamik in einem *in vitro* Experiment verbindet. Dabei wurde die Affinität der Wirkstoffe zu humanem Nasengewebe als Aspekt herangezogen, der nach der topischen Applikation für eine Wirkstoffretention in den Zielarealen der Nase führt und das pharmakokinetische Verhalten der Substanzen in den Versuchsaufbau miteinbringt.

Um einen pharmakodynamischen Effekt des im Gewebe gebundenen Wirkstoffanteils zu erfassen, wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, mit dem mit Hilfe einer künstlich erzeugten Entzündungsreaktion die pharmakologischen Eigenschaften der Wirkstoffe nachgewiesen werden können. Hierzu wurde die humane Lungenepithelzelllinie A549 verwendet, die aufgrund ihres respiratorischen Ursprungs zur Untersuchung von Fragestellungen zum antiinflammatorischen Verhalten nasaler Glucocorticoide geeignet ist [24,157]. Als Entzündungsmarker diente IL-8, welches zum einen von den A549 Zellen in ausreichender Menge nach entsprechender Stimulation produziert wurde, zum anderen bei Allergenexposition von Patienten *in vivo* verstärkt exprimiert wird [174,175].

So stellte sich die Frage, inwiefern mit dem gewählten Versuchsaufbau eine Hemmung der IL-8 Freisetzung durch die Inkubation mit glucocorticoidhaltigen humanen nasalen Gewebeproben, die einer Auswaschphase in Humanplasma ausgesetzt wurden, nachgewiesen werden konnte. Neben der Gewebeinkubation sollten auch die Plasmaproben der

Freisetzungsversuche der einzelnen Corticoide in dem entwickelten Zellkulturmodell auf pharmakologische Unterschiede untersucht werden.

5.2 Prinzip der Bestimmung

Zur Bestimmung der Hemmung der IL-8 Freisetzung aus A549 Zellen durch intranasale Glucocorticoide *in vitro* wurden Zellkulturversuche durchgeführt (siehe 5.3, 5.4 und 5.5 Experimenteller Teil C). Dabei wurden A549 Lungenepithelzellen am Boden eines Zellkulturgefäßes kultiviert (siehe *Abbildung 19*).

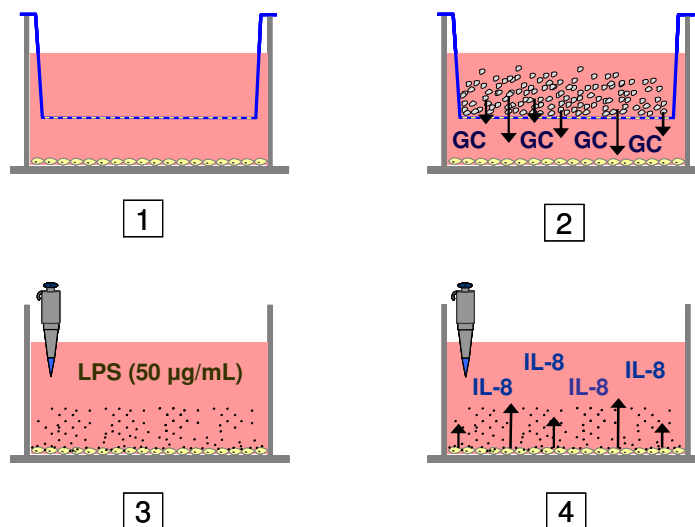


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Versuche zur Bestimmung der Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen: 1.) Kultivieren von A549 Lungenepithelzellen zur Bildung eines subkonfluenten Monolayers am Boden des Zellkulturgefäßes unter Anwesenheit eines hängenden Zellkultureinsatzes; 2.) Einbringen des Wirkstoff enthaltenden nasalen Gewebes in den apikalen Teil des Zellkulturgefäßes und Inkubation; 3.) Entfernen des Gewebes nach achtstündiger Inkubation und Stimulation der Zellen mit 50 µg/mL LPS (Lipopolysaccharid); 4.) Entnahme von Zellkulturproben nach 24 h Stimulation zur quantitativen Analyse der IL-8 Konzentration mittels ELISA (GC - Glucocorticoid).

Als humane Spezimen für eine Inkubation mit den Zellen kamen das humane Nasengewebe zum Einsatz, welches in den Versuchen zum Gewebefestbindungsverhalten der Glucocorticoide nach erfolgter Wirkstoffsättigung einer siebenstündigen Auswaschphase in

Humanplasma unterzogen wurde. Außerdem wurde das Humanplasma der Freisetzungsversuche nach der Auswaschphase mit demselben Versuchsaufbau auf eine IL-8 Hemmung untersucht. Nach der Kultivierung der Lungenepithelzellen bis zur Subkonfluenz wurde das jeweilige Gewebe der verschiedenen Wirkstoffe in die Oberseite des Zellkulturgefäßes eingebracht. Eine Abtrennung des Gewebes von der Zellkultur wurde mittels hängender Zellkultureinsätze (Millicell®-Zellkultureinsätze) erreicht (siehe *Abbildung 19*). Dies hatte zum einen den Vorteil, dass es zu keinem direkten Kontakt zwischen den Gewebestücken und dem Zellmonolayer kam, zum anderen konnte das Gewebe nach achtstündiger Inkubation wieder entfernt werden. Somit konnte über den Versuchsverlauf hinweg, die Intaktheit der Zellen mikroskopisch beurteilt werden und schließlich ein Nachweis der Zellviabilität der Einzelversuche ermöglicht werden. Für die Inkubation der Plasmaproben wurden keine hängenden Zellkultureinsätze benötigt und die Inkubationszeit auf 3 h verkürzt. Nach erfolgter Inkubation der humanen Spezimen wurden die Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) mit einer Konzentration an 50 µg/mL über 24 h stimuliert. Anschließend wurden Proben aus dem Überstand der Zellkultur gewonnen und schließlich mittels Sandwich-ELISA bestimmt (siehe *Abbildung 19*).

Um die Zellviabilität nachzuweisen, wurde nach den Versuchen nach Trypsinbehandlung eine Zellzählung mittels Trypanblaufärbung vorgenommen.

Zur Untersuchung der nichtspezifischen Bindung der Glucocorticoide an die verwendeten Zellkulturmaterialien bzw. der Stabilität der Glucocorticoide im Zellkulturmedium wurden Kontrollproben der jeweiligen Wirkstoffe im identischen Versuchsaufbau über 8 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend quantifiziert.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 IL-8 Hemmung aus Gewebebindung

Durch die Stimulation mit LPS über 24 Stunden kam es bei den A549 Zellen zur Sekretion von 498 ± 34 pg/mL IL-8 (siehe *Abbildung 20*). Dieser Wert stellt den maximalen Entzündungswert der Kontrollen in dem verwendeten Versuchsaufbau dar. Die humanen nasalen Gewebeproben, welche nach den Bindungsversuchen einem siebenstündigen Auswaschen in Humanplasma ausgesetzt wurden, wurden mit den Lungenepithelzellen vorinkubiert. Die im Gewebe zurückbleibenden Mengen an entsprechendem Glucocorticoid wurden hierbei in das Zellkulturmedium freigesetzt und sorgten bei allen untersuchten Wirkstoffen für eine Hemmung der IL-8 Freisetzung aus A549 Zellen.

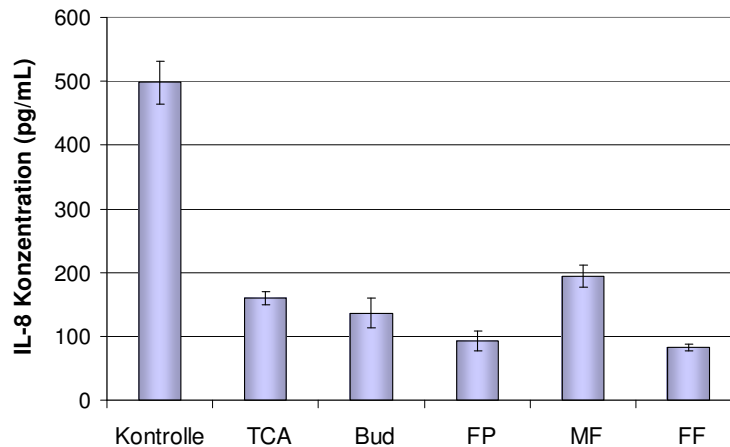


Abbildung 20: Hemmung der IL-8 Sekretion von A549 Lungenepithelzellen durch die Inkubation von humanen nasalen Gewebeproben, welche nach der Wirkstoffadsorption einem siebenstündigen Auswaschen in Humanplasma unterzogen wurden. Die Lungenepithelzellen wurden mit LPS (50 µg/mL) stimuliert. Die IL-8 Konzentration im Zellkulturmedium wurde mittels ELISA bestimmt. Die Säulen stellen die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei (TCA, Bud, FP), bzw. vier (MF, FF) bzw. sechs (Kontrolle) Proben dar.

So ergab die Inkubation mit Gewebeproben mit TCA eine IL-8 Konzentration von 159 ± 10 pg/mL (siehe *Abbildung 20*). Bei den Bud enthaltenden Gewebeproben kam es im Verlauf der 24-stündigen Stimulation nach der Inkubation zur Sekretion von 137 ± 24 pg/mL IL-8 (siehe *Abbildung 20*). Die lipophileren Substanzen FP und FF bewirkten mit IL-8 Konzentrationen von 93 ± 15 pg/mL bzw. 82 ± 5 pg/mL eine geringere Cytokinsekretion als die hydrophileren TCA und Bud. Abweichend von dem ähnlich potenten Wirkstoff FF kam es bei den Gewebeproben mit MF zu einer geringeren Entzündungshemmung und zur Sekretion von 195 ± 17 pg/mL an IL-8 in den Zellkulturüberstand (siehe *Abbildung 20*).

Die erfolgte Bestimmung der Zellviabilität nach der Durchführung der Versuche ergab eine identische Zellzahl für jedes Experiment (siehe 5.1.1, Tabellarischer Anhang D).

5.3.2 IL-8 Hemmung aus Plasmaproben

Die Plasmaproben der unterschiedlichen Glucocorticoide aus den Freisetzungsversuchen nach der mehrstündigen Auswaschphase wurden ebenfalls im Zellkulturversuch auf die Hemmung der IL-8 Sekretion untersucht. Hierbei kam es bei den Kontrollproben ohne Glucocorticoid zu

einer IL-8 Konzentration von 260 ± 14 pg/mL (siehe *Abbildung 21*). Dies stellte wiederum den maximalen Entzündungswert im durchgeführten Versuchsaufbau dar. Die Inkubation der Lungenepithelzellen mit den Plasmaproben ergab eine Hemmung der IL-8 Sekretion in den Zellkulturüberstand bei allen untersuchten Wirkstoffen. Die untersuchten Glucocorticoide unterschieden sich jedoch im entzündungshemmenden Verhalten in den durchgeführten Zellkulturversuchen. So kam es bei den Plasmaproben aus den Gewebefreisetzungsversuchen mit TCA zu einer IL-8 Konzentration von 217 ± 14 pg/mL (siehe *Abbildung 21*). Bei den Plasmaproben des Bud kam es zu einer stärkeren Hemmung der IL-8 Sekretion mit 129 ± 14 pg/mL (siehe *Abbildung 21*). Die untersuchten lipophileren Glucocorticoide FP, MF und FF, die sich gegenüber den Hydrophileren TCA und Bud sowohl durch ihre höhere antiinflammatorische Potenz als auch durch eine höhere Bindung der Wirkstoffe an Nasengewebe auszeichnen, und folglich zu höheren Plasmakonzentrationen bei den Freisetzungsversuchen führten, sorgten, wie erwartet, für die stärkste Hemmung der IL-8 Freisetzung. So kam es bei FP, MF und FF zu IL-8 Konzentrationen, die sich mit 78 ± 9 pg/mL, 70 ± 6 pg/mL und 69 ± 10 pg/mL alle in einer ähnlichen Größenordnung darstellten (siehe *Abbildung 21*).

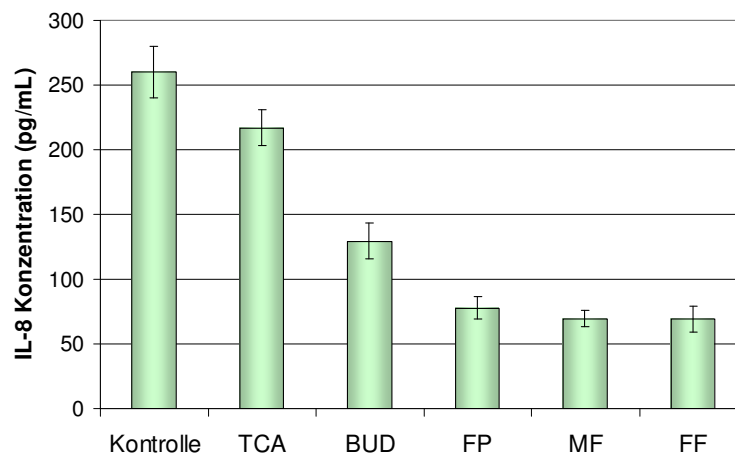


Abbildung 21: Hemmung der IL-8 Sekretion von A549 Zellen durch die Inkubation von humanen Plasmaproben, welche durch ein siebenstündiges Auswaschen von wirkstoffgesättigtem Gewebe in Humanplasma gewonnen wurden. Die Lungenepithelzellen wurden mit LPS (50 µg/mL) stimuliert. Die IL-8 Konzentration im Zellkulturmedium wurde mittels ELISA bestimmt. Die Säulen stellen die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei (TCA, Bud), bzw. vier (FP, MF, FF, Kontrolle) Proben dar.

5.3.3 Stabilität der Substanzen und nichtspezifische Bindung an Zellkulturmaterialien

Um eine nichtspezifische Bindung bzw. die Stabilität der untersuchten Substanzen im entwickelten Versuchsaufbau zu ermitteln, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Die achtstündige Inkubationszeit der Kontrollproben, welche der Vorinkubationszeit der Gewebeprouben entsprach, wurde zur Beurteilung des Substanzverhaltens im Experiment herangezogen. So ergaben sich bei TCA mit 80 ng/mL Wirkstoffkonzentration zu Beginn der Inkubation und 81 ± 3 ng/mL nach der Inkubation keine Hinweise auf eine Instabilität bzw. nichtspezifische Bindung an das Zellkulturmaterial (siehe *Abbildung 22*). Die Inkubationen von Bud, FP und FF führten nach 76, 76, und 77 ng/mL zu Beginn der Inkubation zu Wirkstoffkonzentrationen von 76 ± 2 , 74 ± 1 und 72 ± 3 ng/mL nach acht Stunden (siehe *Abbildung 22*). Dies ließ ebenfalls den Schluss zu, die genannten Substanzen als stabil über den Inkubationszeitraum zu bewerten und gleichzeitig eine nichtspezifische Bindung an Zellkulturmaterialien auszuschließen. Bei MF wurden als Kontrollproben 74 ng/mL eingesetzt, wobei nach der Inkubation lediglich eine Wirkstoffkonzentration von 51 ± 1 ng/mL im Zellkulturmedium ermittelt werden konnte. Dies ist gleichbedeutend mit einer etwa 30 %igen Abnahme der MF-Konzentration im Zellkulturmedium. Außerdem wurde die Bildung von 9,11-Epoxy-MF beobachtet, welches eine Instabilität über den achtstündigen Inkubationszeitraum nachweisen konnte.

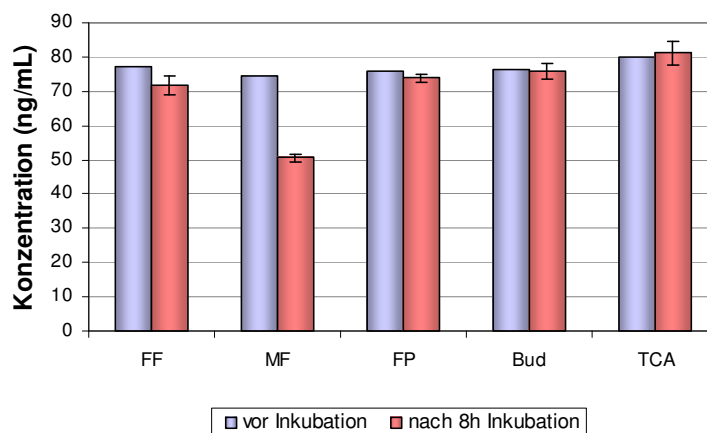


Abbildung 22: Stabilität der untersuchten Glucocorticoide im Zellkulturmedium. Die linken Säulen stellen dabei die Konzentrationen im Zellkulturmedium vor der Inkubation dar (Mittelwert aus zwei Versuchen). Die rechten Säulen ergeben sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, ergänzt um die mittlere Abweichung vom Mittelwert.

5.4 Diskussion

5.4.1 Gewebbindung und RRA

Es wurde erfolgreich ein Versuchsaufbau etabliert, der es ermöglichte, humanes Wirkstoff enthaltendes Gewebe mit einer humanen Lungeneithelzelllinie zu inkubieren und dabei einen pharmakologischen Effekt der Glucocorticoide in Form einer Hemmung der IL-8 Freisetzung nachzuweisen. Dabei war zunächst festzustellen, dass die Gewebeproben aller untersuchter Corticoide in der achtstündigen Inkubationszeit genügend Wirkstoff in das Zellkulturmedium freisetzen, um einen antiinflammatorischen Effekt aufzuzeigen. Als sehr wahrscheinlich in diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass aufgrund der unterschiedlichen Gewebeaffinitäten selbst in der achtstündigen Inkubationszeit nicht angenommen werden kann, dass aus dem Gewebe sämtlicher Wirkstoff an das Zellkulturmedium abgegeben wurde. Vielmehr ist zu vermuten, dass die höhere Bereitschaft der lipophileren Substanzen, an dem Nasengewebe unspezifisch zu binden, dazu führten, dass gerade bei den lipophileren Wirkstoffen FF, FP und MF nicht die gesamte im Gewebe gebundene Substanz in das Medium abgegeben werden konnte. Die Vollständigkeit der Freisetzung des nach der Auswaschphase im Humanplasma noch gebundenen Wirkstoffanteils in das Zellkulturmodell ist deshalb zu bezweifeln.

Dennoch ist anzunehmen, dass die höhere Gewebeaffinität der lipophileren Substanzen im Vergleich zu den hydrophileren Corticoiden in dem gewählten Versuchsaufbau aufgrund des höheren Konzentrationsgradienten und nicht zuletzt einer ausreichend langen Inkubationszeit des Gewebes im Medium auch zu einer höheren Wirkstoffkonzentration im Zellkulturmodell geführt haben.

Neben der Gewebeaffinität muss als zweiter Aspekt im Zusammenhang mit den erfassten antiinflammatorischen *in vitro* Effekten der nasalen Glucocorticoide die relative Rezeptoraffinität betrachtet werden. Sie korreliert gut mit der Potenz und biologischen Aktivität der Corticoide. So unterscheiden sich die Wirkstoffe teilweise beträchtlich in ihrer Affinität zum Rezeptor. Die von Valotis et al. bestimmten relativen Rezeptoraffinitäten von FF mit 2989, MF mit 2244 und FP mit 1775 müssen in Relation zu Dexamethason betrachtet werden, welches als Referenzsubstanz einen Wert von 100 aufweist [148]. Bud weist dagegen eine RRA von 855 und TCA von lediglich 233 [23] bzw. 361 [153] auf. Dies bedeutet beispielsweise, dass bei TCA eine wesentlich höhere freie Wirkstoffkonzentration nötig wäre, um dieselbe Anzahl an Rezeptoren zu besetzen wie bei FF. Betrachtet man die Effekte der Glucocorticoide mit unterschiedlichen RRA auf der Genexpressionsebene, so geht eine höhere Rezeptoraffinität mit einer vermehrten Transkriptionsrate einher [176].

Die eigens bestimmte Bindung der Glucocorticoide an Nasengewebe sowie die literaturbekannten RRA der untersuchten Substanzen müssen nun in die Interpretation der Ergebnisse der Zellkulturversuche miteinbezogen werden. Zunächst kann festgehalten werden, dass zwar alle Wirkstoffe im Experiment zu einer Hemmung der IL-8 Sekretion geführt haben, dass aber dennoch Unterschiede zwischen den Substanzen erkennbar waren. Beim Vergleich von TCA, Bud, FP und FF kam es bei TCA zu den höchsten IL-8 Konzentrationen, gefolgt von Bud. Im Vergleich zu TCA kam es bei FF zu einer etwa doppelt so starken Hemmung der IL-8 Sekretion. Diese Ergebnisse stehen sowohl im Einklang mit den *in vitro* Gewebeaffinitäten der Substanzen als auch mit den zu erwartenden Effekten aufgrund der bekannten RRA. FP zeigte einen ähnlichen antiinflammatorischen Effekt wie FF im Experiment.

Eine Ausnahme stellte in diesem Zusammenhang die MF-Gewebeproben dar, welche zwar ebenfalls zu einer Hemmung der IL-8 Sekretion führten, jedoch die höchsten IL-8 Konzentrationen im beschriebenen Versuchsaufbau aufwies. Dies war weder mit der Gewebeaffinität nach der Auswaschphase in Humanplasma, die allerdings im Vergleich zu FF und FP geringer ausgeprägt war, zu erklären, noch mit der, gerade verglichen mit den hydrophileren TCA und Bud, als relativ höher einzuschätzenden RRA des MF in Vereinbarung zu bringen. Die durchgeführten Stabilitätsversuche zeigten schließlich, dass MF bei einer achtstündigen Inkubation im Zellkulturmedium unter den identischen Versuchsbedingungen instabil war. In der Literatur ist die chemische Instabilität von MF bereits bekannt, die sich in der Bildung von Abbauprodukten wie 9,11-Epoxy-MF bemerkbar macht [133,155,177,178]. So kam es bei MF aufgrund der Instabilität unter den gewählten experimentellen Bedingungen zu einer geringeren biologischen Aktivität, womit die geringere Hemmung der IL-8 Sekretion erklärt werden konnte.

Neben der Inkubation mit Gewebeproben wurden auch die Plasmaproben nach der siebenstündigen Auswaschphase auf ihren pharmakologischen Effekt auf das entwickelte Zellkulturmodell überprüft. Beim Vergleich der untersuchten Glucocorticoide muss hier die aufgrund der unterschiedlichen Gewebeaffinitäten bei der Freisetzung der Substanzen in Humanplasma erhaltenen Wirkstoffkonzentrationen beachtet werden. So führte eine höhere Gewebebindung, wie sie bei FF, FP und MF nach der Gewebesättigung vorlagen, auch im Verlauf der siebenstündigen Desorption in das Blutkompartiment zu höheren Plasmakonzentrationen. Während bei den an sich mit einer geringeren Gewebeaffinität versehenen TCA und Bud im Verlauf der Freisetzung eine geringere Plasmakonzentration erreicht werden konnte. So sind die IL-8 Konzentrationen nach den Plasmainkubationen neben den genannten Unterschieden bezüglich der RRA der Substanzen zu erklären. TCA zeigt, gefolgt von Bud, jeweils eine geringere IL-8 Sekretionshemmung als die lipophileren FF, FP und

MF. Die nicht, oder nur geringfügig vorhandenen Unterschiede zwischen FF, FP und MF, sind wohl auf eine Nivellierung des entwickelten Zellkulturmodells bezüglich der Hemmung der IL-8 Freisetzung bei diesen Substanzen zurückzuführen. Die drei genannten lipophileren Substanzen führten durch die verwendeten 1:100 verdünnten Plasmaproben sowie ihre hohen RRA alle zu einer ähnlichen pharmakologischen Aktivität. Offensichtlich führte auch die geringere Vorinkubationszeit der Plasmaproben von lediglich drei Stunden sowie die höhere Desorptionsrate des MF bei den Freisetzungsversuchen dazu, dass die bekannte sich eher langsam vollziehende Degradation des MF sich nicht auf die antiinflammatorischen Effekte im Modell auswirkte.

6 Modell zur intranasalen Pharmakokinetik topisch applizierter Wirkstoffe

Die physikochemischen Eigenschaften der intranasalen Glucocorticoide sind für die Galenik der handelsüblichen, wässrigen Suspensionen sowie die pharmakokinetischen Vorgänge nach der topischen Applikation mitverantwortlich [23]. Der Wirkstoffanteil, der bereits gelöst in der Suspensionsformulierung vorliegt, kann nach Applikation sofort die Diffusion durch die Mukosaoberfläche vornehmen. Die als ungelöste Partikel auf der nasalen Schleimhaut aufgetragenen Glucocorticoide hingegen müssen sich zunächst in dem nur spärlich vorhandenen Nasensekret auflösen. Die Wasserlöslichkeit und Lipophilie der unterschiedlichen Substanzen ist hier entscheidend für die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit im nasalen Mukus. Gerade für die lipophileren Glucocorticoide konnte in eigenen Untersuchungen eine Steigerung der Lösungsgeschwindigkeit der Wirkstoffkristalle durch im Nasensekret vorhandene Proteine gezeigt werden [179].

Von physiologischer Seite kommen allerdings ebenso wichtige Aspekte hinzu. Die mukoziliäre Clearance, welche durch ein synergistisches Zusammenspiel mit den Phasen des Mukus funktioniert und für die Reinigung der Mukosaoberfläche von Fremdpartikeln und Mikroorganismen verantwortlich ist, sorgt für eine zeitliche Begrenzung des Depots, gerade der in den hinteren Bereichen der Nasenhöhle deponierten Wirkstoffpartikel. So beträgt die Verweilzeit der dort platzierten festen Bestandteile der Suspension ca. 20-30 min [5]. Die Diffusion der gelösten Substanzmoleküle in die Epithelzellen und die tieferliegenden Gewebeschichten ist von den Permeationseigenschaften der unterschiedlichen Wirkstoffe abhängig [143]. Des Weiteren geht die Gewebeaffinität der gelösten Glucocorticoide einher mit ihrer Lipophilie. So konnte ein Zusammenhang zwischen den lipophilen Eigenschaften eines Glucocorticoids und der Geschwindigkeit und des Ausmaßes der Adsorption an respiratorisches Gewebe gezeigt werden [74,151]. Die Verfügbarkeit der topisch applizierten Substanzen im Nasengewebe ist wichtig, um hohe Wirkstoffkonzentrationen am Glucocorticoidrezeptor und damit die pharmakologische Effektivität zu gewährleisten. Daneben ist die unspezifische Gewebebindung auch ein Kriterium für die Sicherheit der Wirkstoffe. Eine hohe Gewebebindung sorgt für eine langsame Umverteilung des Wirkstoffs in die systemische Zirkulation, mit der positiven Konsequenz, dass die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Arzneimittelwirkungen, die durch hohe Plasmakonzentrationen verursacht werden können, verringert wird.

Um nun eine Beurteilung der Pharmakokinetik nasal applizierter Glucocorticoid-

Suspensionen vornehmen zu können, müssen die verschiedenen Einflussfaktoren zusammenhängend betrachtet werden. So ist bei einer weniger lipophilen Substanz wie Budesonid davon auszugehen, dass die in der Formulierung bereits gelösten Wirkstoffmoleküle sowie die Lösungsgeschwindigkeit im Nasensekret, die für eine schnellere Auflösung der Kristalle spricht, zu einem höheren Wirkstoffanteil führen, der auf der Mukosa für die Absorption in das Nasengewebe bereitsteht. Während bei einer lipophileren Substanz wie Fluticasonpropionat anzunehmen ist, dass vergleichsweise weniger bereits gelöste Wirkstoffmoleküle vorliegen und eine geringere Wasserlöslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit der Kristalle dazu führen sollte, dass ein geringerer Wirkstoffanteil zur nasalen Absorption vorhanden ist.

Im weiteren Zusammenhang muss nun allerdings auch der nächste Schritt der Diffusion des auf der Mukosa zur Absorption bereitstehenden gelösten Wirkstoffanteils in das Nasengewebe beachtet werden. So zeigen *in vitro* Untersuchungen zur Gewebefixierung und Untersuchungen an Zellkulturmodellen, dass lipophilere Substanzen zu einer schnelleren Absorption in das Zielgewebe führen sowie eine Gewebefixierung im höheren Ausmaß stattfindet, im Vergleich zu hydrophileren Glucocorticoiden [157,180].

Während die modernen intranasalen Glucocorticoide meist als wässrige Suspensionen Verwendung finden, liegen weitere Antiallergika, die ebenso zur Behandlung der allergischen Rhinitis angewendet werden, auch als Lösungen vor. So ist das Antihistaminikum Azelastin-HCl (AZ-HCl) indiziert zur symptomatischen Behandlung der saisonalen allergischen Rhinitis und wird mit Hilfe eines Dosierpumpsprays in Form einer Lösung intranasal appliziert. Somit liegt hierbei der Arzneistoff nach Applikation auf der Nasenschleimhaut direkt zur Diffusion in das Zielgewebe bereit.

6.1 Fragestellung

Bisherige *in vitro* Untersuchungen beinhalteten nur einzelne Aspekte der pharmakokinetischen Zusammenhänge bei der nasalen Applikation wässriger Glucocorticoid-Suspensionen. So wurden im Rahmen dieser Arbeit der bereits gelöste Glucocorticoidanteil handelsüblicher Suspensionen zur nasalen Anwendung, die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit in künstlichem Nasensekret sowie die Bindung der gelösten Wirkstoffe an humanes Nasengewebe in jeweils unabhängigen Untersuchungen bestimmt. Dies ermöglichte jeweils nur die Beurteilung eines Teilaspektes der grundlegenden Fragestellung der aufeinanderfolgenden pharmakokinetischen Vorgänge nasal applizierter Glucocorticoid-Suspensionen.

Außerdem wurde bei Diffusionsuntersuchungen mit Hilfe von Zellkulturexperimenten

meist nur mit den gelösten Wirkstoffen gearbeitet [143,157]. Diese Untersuchungen können jedoch nicht den wichtigen Vorgang der Freisetzung aus der Arzneiform bei Wirkstoffsuspensionen darstellen. Andere *in vitro* Modelle, die auf hängenden Zellkultureinsätzen Monolayer kultivieren und durch anschließende Entfernung des apikalen Mediums eine Darstellung der respiratorischen Mukosaoberfläche möglich machen, stellen eine interessante Option dar und wurden bereits zur Untersuchung inhalativer Arzneiformen eingesetzt [181,182].

Die Entwicklung wässriger Glucocorticoid-Suspensionen hat sich u.a. aufgrund der Suche nach alternativen Arzneiformen durch die Umweltproblematik einer FCKW Anwendung durch Treibgasaerosole und deren ungünstiges Nebenwirkungsprofil zur topisch-nasalen Corticoidbehandlung ergeben [58]. Die bessere intranasale Verteilung und lokale Verträglichkeit neuer Applikatorsysteme zur Anwendung wässriger Wirkstoffsuspensionen sowie die galenische Entwicklung stabiler wässriger Arzneiformen trug ebenso zu ihrer Einführung bei [57,59]. Die besondere Situation der lokalen Applikation einer Wirkstoffsuspension, mit überwiegend ungelösten Substanzanteilen wirft die Frage auf, welchen Einfluss der Auflösungsprozess der Glucocorticoidkristalle auf der nasalen Schleimhaut auf die Pharmakokinetik hat.

So sollte ein *in vitro* Modell entwickelt werden, welches die Applikation der Wirkstoffformulierung, die Auflösung der Kristalle auf der Mukosa, die Diffusion in das respiratorische Gewebe sowie die Umverteilung des gewebegebundenen Wirkstoffanteils in das Blutkompartiment umfasst und somit die unterschiedlichen pharmakokinetischen Prozesse in einen der Physiologie nahe liegenden Zusammenhang gebracht werden können. In die Untersuchung wurden mit Fluticasonpropionat und Budesonid zwei Vertreter der intranasalen Glucocorticoide einbezogen, die sich physikochemisch durch ihre unterschiedliche Wasserlöslichkeit auszeichnen. So stellte sich die Frage, inwiefern sich der höhere bereits gelöste Wirkstoffanteil und die schnellere Auflösungsgeschwindigkeit des Bud im Vergleich zum FP bezüglich der im Experiment gemessenen Gewebeaffinität auswirken.

Die Herausforderung bestand darin *in vitro* eine Mukosaoberfläche zu simulieren, die es ermöglicht, die Gewebefindung handelsüblicher Suspensionsformulierungen, die topisch auf der Oberfläche der Modellschleimhaut aufgebracht werden, zu bestimmen. Außerdem sollte ein Weg gefunden werden, die mukoziliäre Clearance, die die Kontaktzeit der applizierten Wirkstoffkristalle mit der Mukosa in weiten Bereichen der respiratorischen Schleimhaut auf ca. 30 min begrenzt, in den Versuchsablauf miteinbezogen werden.

Neben der Betrachtung nasaler Glucocorticoid-Suspensionen wurde die Fragestellung um die Untersuchung des Azelastin-HCl, welches in der handelsüblichen Arzneiform als Lösung

in der Nase appliziert wird, erweitert. Dies ermöglichte die Beurteilung der Pharmakokinetik eines Antihistaminikums als einer weiteren Arzneistoffgruppe, die neben den topischen Corticoiden in der Therapie der allergischen Rhinitis eine wichtige Rolle spielen. Die Überprüfung des Modells mit einer weiteren Substanzgruppe stellte aber um so mehr auch einen möglichen Ausblick her, den Versuchsaufbau als einen ubiquitären Ansatz zur Darstellung der *in vitro* Pharmakokinetik auf weitere nasal applizierte Arzneistoffe zu übertragen.

6.2 Prinzip der Bestimmung

6.2.1 Methodenentwicklung

Aufgrund der zugrunde liegenden Fragestellung musste eine Möglichkeit geschaffen werden, eine Mukosaoberfläche zu simulieren, die in einem *in vitro* Modell der Physiologie einer respiratorischen Schleimhaut möglichst nahe kommt, damit die Bestimmung der Gewebepbindung handelsüblicher Glucocorticoid-Suspensionen ermöglicht wird und gleichzeitig eine reproduzierbare Versuchsdurchführung erreicht werden kann.

Die grundsätzliche Modellvorstellung der Mukosaoberfläche bestand aus homogen geschnittenem respiratorischen Gewebe, welches in eine Gel-Matrix eingebettet werden sollte. Dies sollte die Applikation einer Suspension zulassen und gleichzeitig einen nach der zeitlich begrenzten Inkubation des Wirkstoffs mit der Gewebe-Gel-Matrix durchzuführenden Waschprozess der simulierten Mukosa möglich machen.

Um dem Kriterium einer physiologisch ähnlichen Mukosaoberfläche zu entsprechen, wurde das respiratorische Gewebe in ersten Versuchen mittels Kollagen fixiert. Die nach der Entwicklung der Gewebe-Kollagen-Gel-Matrix durchgeführten Experimente mit Glucocorticoid-Suspensionen stellten sich jedoch als schwierig heraus. Zum einen war der Umgang mit dem schwer handhabbaren Gewebe-Gel bei den einzelnen Schritten des Versuchsablaufs fast unmöglich, zum anderen legten durchgeführte Experimente den Schluss nahe, dass aufgrund der instabilen Gel-Matrix ein reproduzierbares Arbeiten unmöglich ist. Dies führte zur Suche nach einer weiteren Möglichkeit, eine Gel-Matrix mit stabileren Eigenschaften für die Einbettung von Gewebe zu finden.

So zeigten Vorversuche mit einem Polyacrylamidgel, dass sich diese Matrix sowohl bezüglich der Stabilität und Handhabung als auch der Reproduzierbarkeit als eine funktionelle Einheit darstellte und die Idee einer zusammenhängenden Mukosaoberfläche aus homogenen Gewebepartikeln zu realisieren erlaubte. Dieses Polyacrylamidgel war in der Zusammensetzung

einem 10 %igen Gel zur SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nachempfunden, welches eigentlich zur biochemischen Analyse und Auftrennung von Proteinen Verwendung findet.

6.2.2 Versuchsprinzip

Zu Beginn eines Experiments wurden zunächst ein Gewebe-Gel sowie ein Vergleichsgel mit Hilfe der Oberseite einer Glaspetrischale hergestellt (siehe 6.3 Experimenteller Teil C). Aufgrund der besseren Verfügbarkeit und der vergleichbaren physiologischen Verwandtschaft des oberen und unteren Respirationstrakts wurden die Experimente mit Lungengewebe durchgeführt. Diese Vorgehensweise ergab jeweils ein Gel mit einem Durchmesser von 3.75 cm und einer Dicke von ca. 3 mm. Die Unterseite der Gele wurde während der Versuche mit PBS-Puffer feucht gehalten, um ein Deformieren über die Inkubationszeit zu verhindern. Auf die Oberseite der Gel-Matrix, welche die Mukosaoberfläche simulierte, wurde eine entsprechende Menge an Wirkstoffformulierung sowie künstlichem Nasensekret appliziert. Die beiden Gele wurden fortan für 30 min bei 37 °C auf einem rotierenden Schüttler langsam bewegt.

Nach der Inkubationszeit wurden beide Gele einem intensiven Waschprozess unterworfen, der sämtlichen ungelösten und nicht diffundierten Wirkstoff der applizierten Formulierung in einer Waschlösung sammelte (siehe 6.4.2 Experimenteller Teil C). Proben dieser Waschlösung dienen zur Ermittlung der Gewebekonzentration zum Zeitpunkt 0 min. Zur Berechnung der Gewebekonzentration der Substanzen wurden jeweils die Differenzen aus dem gebundenen Wirkstoffanteil des Gewebe-Gels und dem an das Vergleichsgel gebundenen Wirkstoffanteil gebildet.

Die gewaschenen Gele wurden nun jeweils in vortemperiertes Humanplasma überführt und gleichmäßig bei 37 °C geschüttelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, um die Freisetzung aus der Gewebebindung in das simulierte Blutkompartiment zu bestimmen. Das entsprechende Volumen an entnommenem Plasma wurde nach jeder Probennahme ersetzt.

Da es in der Literatur bereits Hinweise auf eine bedeutsame Verteilung von AZ-HCl in Erythrozyten gab [183], die sich durch eigens durchgeführte Untersuchungen zum Verteilungsgleichgewicht zwischen Humanplasma und einer Plasma-Erythrozyten-Mischung bestätigte (siehe 6.6, Experimenteller Teil C), wurde die Freisetzung der mit AZ-HCl beladenen Gelmatrices in einer Plasma-Erythrozyten-Mischung durchgeführt.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Gewebekombindung

Nach der 30-minütigen Inkubation der handelsüblichen Suspensionsformulierungen Flutide® Nasal (FP) und Budes® Nasenspray (Bud) mit den Gelmatrices, kam es bei FP mit 885 ± 12 ng/0.5 g und Bud mit 946 ± 162 ng/0.5 g zur Bindung von ähnlichen Wirkstoffmengen an das Lungengewebe (siehe *Abbildung 23* bzw. *Abbildung 25*).

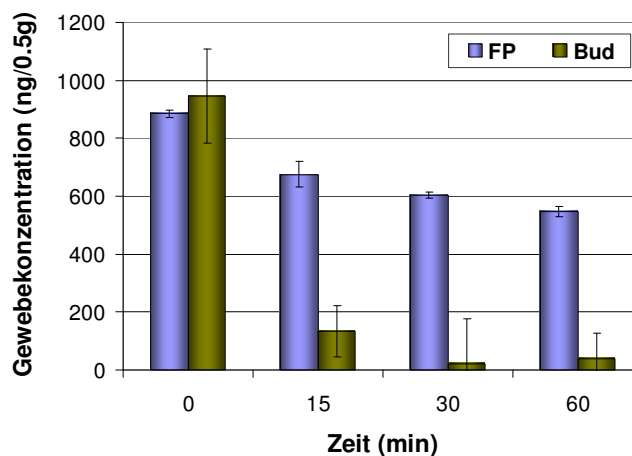


Abbildung 23: Vergleich der Gewebekombindung von FP (aus Flutide® Nasal) und Bud (aus Budes® Nasenspray) an humanes Lungengewebe aus den Gewebe-Gel-Matrix-Experimenten. Die Säulen zum Zeitpunkt 0 min stellen die Wirkstoffkonzentrationen des Gewebes nach 30-minütiger Inkubation der jeweiligen handelsüblichen Suspensionsformulierung mit der Gewebe-Gel-Matrix aus 0.5 g Gewebe, korrigiert um die an das Vergleichsgel gebundene Menge, dar. Die Säulen zu den Zeitpunkten 15, 30 und 60 min stellen die Gewebekombindungen nach Inkubation der wirkstoffbeladenen Gewebe-Gel-Matrix in Humanplasma und Korrektur durch das Vergleichsgel dar. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittlere Abweichung vom Mittelwert von jeweils drei Experimenten.

Nach der Überführung der mit Wirkstoff beladenen Gelmatrices in Humanplasma kam es bei Bud zu einer schnellen Freisetzung des gewebegebundenen Substanzanteils mit Gewebekombindungen von 132 ± 88 ng/0.5 g nach 15 min, 21 ± 154 ng/0.5 g nach 30 min und 39 ± 88 ng/0.5 g nach 60 min (siehe *Abbildung 23*). Bei FP hingegen wurde im Vergleich zu Bud eine wesentlich langsamere Freisetzung in Humanplasma festgestellt. So ergaben sich nach

15 min mit 675 ± 45 ng/0.5 g und nach 30 min mit 604 ± 9 ng/0.5 g vergleichsweise hohe Gewebekonzentrationen. Die gebundene Wirkstoffmenge des FP nach 60 min zeigt mit 546 ± 17 ng/0.5 g Gewebe noch über 60 % des ursprünglich gebundenen Substanzanteils (siehe *Abbildung 23*).

Betrachtet man die Abnahme der Gewebekonzentration über die Zeit der Inkubation in Humanplasma, so können zur Verdeutlichung des experimentellen Verlaufs die Plasmakonzentrationen der beiden untersuchten Glucocorticoide herangezogen werden. So kam es bei Bud zu einer schnellen Freisetzung des Wirkstoffs in das simulierte Blutkompartiment, mit einer durch das Vergleichsgel korrigierten Plasmakonzentration nach 60 min von 91 ± 21 ng/mL. Die Inkubation der mit FP beladenen Gewebe-Gel-Matrix ergab hingegen eine langsame Freisetzung des lipophilen Wirkstoffs in Humanplasma, mit einer mit Hilfe des Vergleichsgels korrigierten Plasmakonzentration nach 60 min von 34 ± 1 ng/mL.

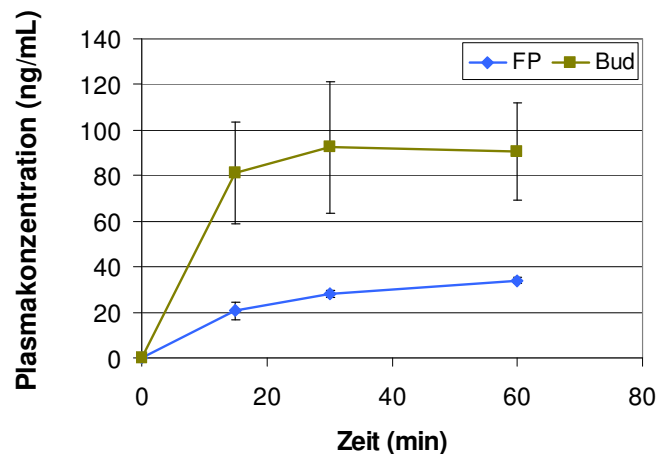


Abbildung 24: Vergleich der korrigierten Plasmakonzentrationen von FP und Bud nach Freisetzung aus den gewaschenen und wirkstoffbeladenen Gewebe-Gel-Matrices in Humanplasma. Die Punkte zu den Zeitpunkten 15, 30 und 60 min stellen die Plasmakonzentrationen nach Inkubation der wirkstoffbeladenen Gewebe-Gel-Matrix in Humanplasma und Korrektur durch das Vergleichsgel dar. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittlere Abweichung vom Mittelwert von jeweils drei Experimenten.

Die Untersuchung des in der gebrauchsfertigen Wirkstoffformulierung bereits gelöst vorliegenden lipophilen Antihistaminikums AZ-HCl (Vividrin[®] akut) wies mit 3994 ± 418 ng/0.5 g zum Zeitpunkt 0 min eine ca. viermal höhere Gewebekonzentration als die untersuchten

Glucocorticoide auf (siehe *Abbildung 25*).

Die Freisetzung aus der Gewebefindung in das Blutkompartiment wurde bei AZ-HCl durch Inkubation der gewaschenen Gele mit einer Plasma-Erythrozyten-Mischung durchgeführt. Es wurde in Untersuchungen zum Verteilungsgleichgewicht von AZ-HCl zwischen Humanplasma und der Plasma-Erythrozyten-Mischung eine Verteilung von 53 % in Erythrozyten nach 1h Inkubation ermittelt.

So kam es zu AZ-HCl Gewebekonzentrationen von 3459 ± 369 ng/0.5 g nach 15 min und 3236 ± 421 ng/0.5 g nach 30 min. Nach 60 min Äquibrierung der Gel-Matrix in der Plasma-Erythrozyten-Mischung befand sich mit 2991 ± 446 ng/0.5 g noch ca. 75 % der ursprünglich gebundenen Wirkstoffmenge im Gewebe (siehe *Abbildung 25*).

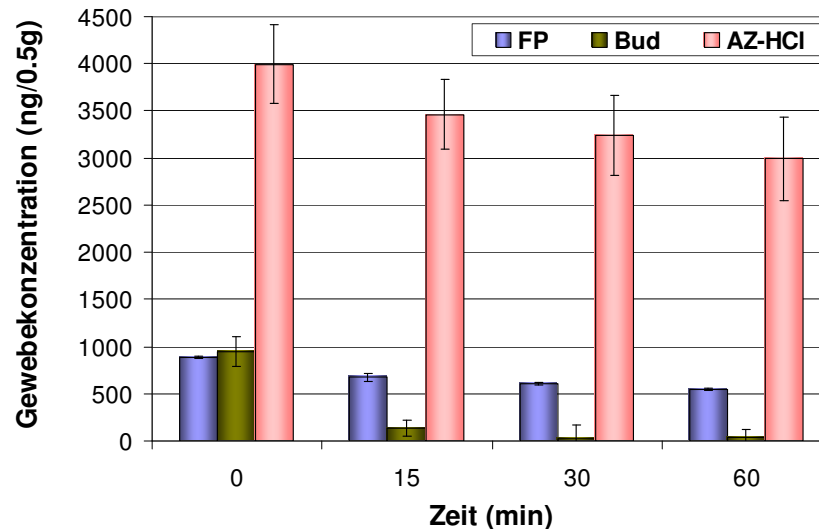


Abbildung 25: Vergleich der Gewebefindung von AZ-HCl (aus Vividrin® akut) und den bereits in *Abbildung 23* dargestellten Ergebnissen der Glucocorticoide FP bzw. Bud bzgl. der Bindung an humanes Lungengewebe aus den Gewebe-Gel-Matrix-Experimenten. Die Säulen zum Zeitpunkt 0 min stellen die Wirkstoffkonzentrationen im Gewebe nach 30-minütiger Inkubation der jeweiligen handelsüblichen Formulierung mit der Gewebe-Gel-Matrix aus 0.5g Gewebe, korrigiert um die an das Vergleichsgel gebundene Menge, dar. Die Säulen zu den Zeitpunkten 15, 30 und 60 min stellen die Gewebekonzentrationen nach Inkubation der wirkstoffbeladenen Gewebe-Gel-Matrix in Humanplasma (FP, Bud) bzw. in der Plasma-Erythrozyten-Mischung (AZ-HCl) und Korrektur durch das Vergleichsgel dar. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittlere Abweichung vom Mittelwert von jeweils drei Experimenten.

Eine weitere Möglichkeit die Ergebnisse der Gewebekonzentration darzustellen und die Unterschiede der untersuchten Wirkstoffe aufzuzeigen, ist die Fläche unter der Gewebekonzentrations-Zeit-Kurve als Integral (AUC) zu berechnen. So ergab die AUC über eine Stunde nach der Inkubation in Humanplasma für Bud mit $10140 \pm 4158 \text{ ng/0.5 g} \cdot \text{min}$ den geringsten Wert. FP hingegen führte zu $38542 \pm 1146 \text{ ng/0.5 g} \cdot \text{min}$ als Lipophileres im Vergleich der beiden Glucocorticoide zu einer größeren Fläche unter der Gewebekonzentrations-Zeit-Kurve (siehe *Abbildung 26*).

Azelastin-HCl setzte sich dagegen als lipophilste Substanz unter den drei untersuchten Wirkstoffen mit $199521 \pm 24822 \text{ ng/0.5 g} \cdot \text{min}$ deutlich von den beiden Glucocorticoiden ab (siehe *Abbildung 26*).

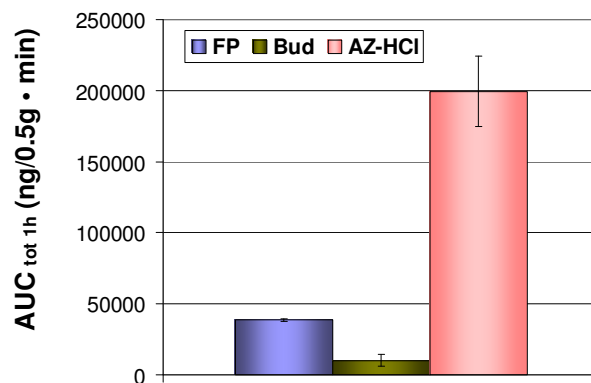


Abbildung 26: Vergleich der Fläche unter der Gewebe-Konzentrations-Zeit Kurve über eine Stunde für FP, Bud und AZ-HCl aus den Gewebe-Gel-Matrix-Experimenten. Die Säulen stellen die Mittelwerte und die mittlere Abweichung vom Mittelwert aus drei Experimenten dar.

6.3.2 Bindung an Polyacrylamid-Gel

Die Verwendung von Polyacrylamid-Gelen zur Fixierung des respiratorischen Gewebes und zur Simulation einer zusammenhängenden Mukosaoberfläche war die Voraussetzung zur Durchführung der Bestimmung der Gewebekonzentration aus handelsüblichen Suspensionsformulierungen. Die Bindung der untersuchten Wirkstoffe musste somit sowohl an die Gewebe-Gel-Matrix als auch an die Vergleichsgel-Matrix ohne Gewebe gleichermaßen untersucht werden, um eine Aussage über die gewebegebundene Menge machen zu können.

Die untersuchten Substanzen unterschieden sich bezüglich der Bindung an das

Polyacrylamid-Gel. So kann der Quotient aus der an das Vergleichsgel gebundenen Wirkstoffmenge und dem insgesamt an die Gewebe-Gel-Matrix gebundenen Wirkstoffanteil herangezogen werden, um einen Hinweis auf die Bindung an das Polyacrylamid-Gel zu erhalten. So ergab sich bei FP mit $23 \pm 5 \%$, im Vergleich zu Bud mit $80 \pm 1 \%$, eine geringere Polyacrylamidbindung, während sich beim Antihistaminikum AZ-HCl ein Wert von $33 \pm 2 \%$ errechnete (siehe *Abbildung 27*).

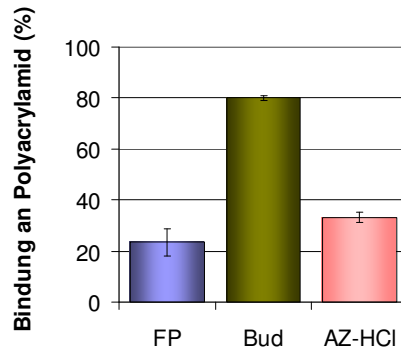


Abbildung 27: Vergleich der Bindung der untersuchten Substanzen FP, Bud und AZ-HCl an das Polyacrylamidgel, ermittelt aus dem Quotienten aus der an das Vergleichsgel gebundenen Wirkstoffmenge und an die Gewebe-Gel-Matrix gebundenen Menge. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittlere Abweichung vom Mittelwert von jeweils drei Experimenten.

6.4 Diskussion

Es konnte erfolgreich eine neue Methode etabliert werden, die es ermöglicht, in einem Modell die pharmakokinetischen Vorgänge verschiedener nasaler Glucocorticoid-Suspensionen *in vitro* darzustellen. So gelang es, die Freisetzung aus der Arzneiform, die Absorption des gelösten Wirkstoffs in das Zielgewebe, und die Umverteilung des gewebegebundenen Wirkstoffs in Humanplasma in einem Experiment zu erfassen. Dabei ist es durch die Wahl der Untersuchungsbedingungen gelungen, einen der Physiologie angenäherten experimentellen Aufbau zu entwickeln. Die Verwendung von künstlichem Nasensekret (KNS) sorgte dafür, dass der Auflösungsprozess der Wirkstoffkristalle auf der nasalen Schleimhaut durch die Bereitstellung von Mukusproteinen simuliert werden konnte. Die Sekretschicht, die die Zilien sowie die Zwischenräume der Zilien bedeckt, beträgt auf der menschlichen Schleimhaut ca. 5-15 μm und wurde durch die Verwendung von KNS auf der experimentellen Mukosaoberfläche in

einem realistischen Szenario miteinbezogen [2,5]. Die in den eigenen Untersuchungen ermittelten Einflüsse der im Nasensekret vorhandenen Mucine und Proteine auf die Lösungsgeschwindigkeit der nasal applizierten Glucocorticoidkristalle wurden hiermit also ebenso im Versuchsablauf berücksichtigt (siehe 3.3). Es erfolgte je Arzneistoff eine Applikation von ~ 9 µg pro Gel-Matrix, wobei die simulierte Mukosaoberfläche ~ 11 cm² betrug. Dadurch wurde gewährleistet, dass nach erfolgter Inkubation nicht sämtlich applizierter Wirkstoff in die Gewebe-Gel-Matrix diffundieren konnte, somit die Wirkstoffformulierung auf der Mukosa im Überschuss vorlag, was wiederum der Situation *in vivo* entsprechend nachempfunden wurde. Bei der Erhaltungstherapie der allergischen Rhinitis mit FP aus Flutide[®] Nasal Nasenspray sowie mit Bud aus Budes[®] Nasenspray werden 100 µg/Nasenloch/Tag appliziert. Die Oberfläche einer Hälfte der Nasenhöhle wird mit ca. 60-75 cm² angenommen [2,5]. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass ein gewisser Wirkstoffanteil gar nicht deponiert wird, sondern direkt nach der Applikation aus der Nase ausfließt. Außerdem haben Untersuchungen gezeigt, dass die Verteilung der versprühten Formulierung auf der gesamten Mukosaoberfläche nicht gleichmäßig erfolgt. So wird, je nach Haltung bei der Applikation, meist der größte Teil der Dosis in der unteren Nasenmuschel und dem vorderen Teil der Nasenhöhle deponiert [135,184].

Die Simulierung einer Mukosaoberfläche durch die Einbettung der Gewebestücke in eine zusammenhängende Gel-Matrix machte es möglich, den durch die mukoziliäre Clearance begrenzten Zeitraum der Präsenz der Kristalle auf der Schleimhaut im hinteren Teil der Nasenhöhle darzustellen. Der nach dem Inkubationszeitraum nicht aufgelöste und in die Gewebe-Gel-Matrix diffundierte Wirkstoffanteil wurde von der Oberfläche abgewaschen und konnte somit den physiologischen Abtransport der Kristalle in den Rachenraum nachahmen. Der im respiratorischen Gewebe gebundene Arzneistoff zum Zeitpunkt 0 min stellte schließlich den Wirkstoffanteil dar, der aufgrund des halbstündigen Mukosadepots in die Gewebestrukturen diffundieren konnte und als zusammenhängendes Maß für die pharmakokinetischen Vorgänge der Freisetzung aus der Arzneiform, gleichbedeutend mit dem Auflösungsprozess der Kristalle im Nasensekret sowie der Gewebeadsorption, herangezogen werden konnte.

So lagen bei Bud und FP nach der halbstündigen Inkubation der Glucocorticoid-Suspensionen auf der Gel-Matrix ähnliche Gewebekonzentrationen vor, obwohl sich beide Substanzen bezüglich ihrer physikochemischen Eigenschaften unterschieden. So lag bei Bud ein höherer bereits gelöster Wirkstoffanteil vor und der Auflösungsprozess der Kristalle im Nasensekret war ebenso im Vergleich zu FP als schneller anzunehmen [42], auch wenn FP im stärkeren Maße von dem Proteinanteil im Nasensekret bezüglich der Lösungsgeschwindigkeit profitierte als Bud (siehe 3.3). Auf der anderen Seite muss die höhere Lipophilie des FP und die

damit verbundene höhere Diffusionsgeschwindigkeit in das Gewebe sowie die höhere Gewebeaffinität im Gegensatz zu Bud bei der Diskussion der Ergebnisse beachtet werden (siehe 4.3) [157,180]. Durch die schnellere Diffusion vom Ort des Lösungsprozesses in die Gewebeareale bei FP kam es zu einem größeren Konzentrationsgefälle in der Lösungsschicht der Kristalle, was wiederum den Auflösungsprozess des Feststoffes gefördert hat (siehe 3.4.1 Noyes-Whitney Gleichung).

So kann die ähnliche Gewebekonzentration beider Glucocorticoide vor der Plasmainkubation, wie sie in dem *in vitro* Modell ermittelt wurde, damit erklärt werden, dass Bud durch die bessere Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit in gewissem Maße die geringere Gewebeaffinität im Vergleich zum FP kompensieren kann. Dies deutet sich auch an, wenn man die Ergebnisse der durchgeführten Gewebe-Gel-Experimente mit der nasalen Gewebeaffinität der gelösten Wirkstoffe vergleicht (siehe 4.3, *Abbildung 16*). Bud scheint bei der Untersuchung der Suspensionsformulierungen durch den schnelleren Lösungsprozess die geringere Gewebeaffinität im Vergleich zum FP auszugleichen.

Dies zeigt auch, dass es mit dem entwickelten Modell gelungen ist, den wichtigen Prozess der Auflösung der Glucocorticoidkristalle auf der Mukosa in den Zusammenhang der pharmakokinetischen Betrachtung nasaler Corticoidsuspensionen miteinzubeziehen. So konnten durch die Darstellung des Ergebnisses in Form der Gewebekonzentration durchaus auch Aussagen über das Löslichkeitsverhalten der Feststoffe gemacht werden.

Die Fortführung des pharmakokinetischen Modells um die Abbildung der Umverteilung der Substanzen aus der Gewebefindung in das Blutkompartiment konnte schließlich jedoch zeigen, dass es durch die Inkubation der wirkstoffgebundenen Gelmatrices in Humanplasma bei Bud zu einer schnellen Freisetzung des gebundenen Wirkstoffs kam. Im Gegensatz dazu lag bei FP auch nach einer Stunde Plasmainkubation noch mehr als 60 % der ursprünglich gebundenen Wirkstoffmenge im Gewebe gebunden vor. Die erwartete geringere Gewebeaffinität des Bud im Vergleich zu FP zeigte sich also auch bei den durchgeführten Gewebe-Gel-Matrix Experimenten und stehen im Einklang mit bereits bekannten Daten zur Freisetzung aus der Gewebefindung aus Nasen-, wie auch Lungengewebe [149,151].

Durch die Untersuchung des Antihistaminikums Azelastin-HCl (AZ-HCl) in demselben Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, dass das Modell auch auf eine weitere Arzneiform, sowie eine andere Arzneistoffgruppe angewandt werden konnte. Dies wurde dadurch bestätigt, dass AZ-HCl aus Vividrin® akut Nasenspray, im Vergleich zu den eingesetzten Glucocorticoid-Suspensionen von Bud und FP, deutlich höhere Gewebekonzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ergaben. Dies war zum einen darauf zurückzuführen, dass AZ-HCl in der verwendeten handelsüblichen Formulierung bereits gelöst vorlag. Somit war im

Gegensatz zu den Corticoidpräparaten kein Auflösen der Kristalle nötig, welches Zeit in Anspruch nahm. Außerdem stellte AZ-HCl ($\log P = 4.9$ [185]), im Vergleich zu Bud ($\log P = 1.9$ [185]) und FP ($\log P = 3.4$ [185]), die lipophilste Substanz dar, was sich auch im hohen Verteilungsvolumen der Substanz bemerkbar macht ($V_{dss\ AZ-HCl} = 14.5$ l/kg [186]). FP und Bud dagegen weisen deutlich geringere Verteilungsvolumina auf ($V_{dss\ FP} = 4.5$ l/kg [160]; $V_{dss\ Bud} = 2.6$ l/kg [159]) [176]. Es konnte eine gute Korrelation zwischen der in den eigenen Experimenten ermittelten Gewebeaffinität, die durch die Fläche unter der Gewebekonzentrations-Zeit-Kurve als Integral über eine Stunde ($AUC_{tot\ 1\ h}$) dargestellt wurde, und den literaturbekannten jeweiligen Verteilungsvolumina der Wirkstoffe festgestellt werden. Dies drückte sich in Form des Korrelationskoeffizienten von 0.999 aus (siehe *Abbildung 28*).

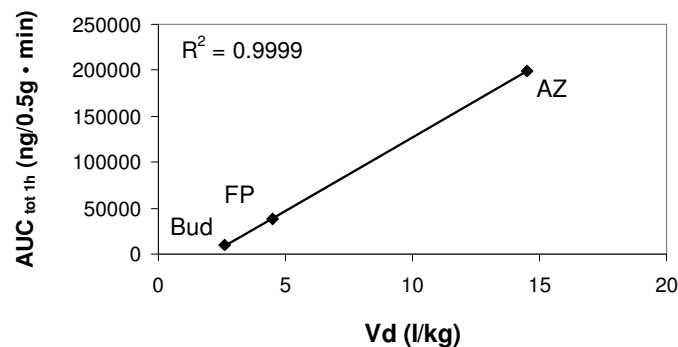


Abbildung 28: Korrelation zwischen den literaturbekannten Verteilungsvolumina von Bud, FP und AZ-HCl und der in den eigenen Experimenten ermittelten Fläche unter der Gewebekonzentrations-Zeit-Kurve über eine Stunde ($AUC_{tot\ 1\ h}$) der untersuchten Wirkstoffe. Der Korrelationskoeffizient wurde mit $r = 0.999$ bestimmt.

Weiterhin ist interessant, die Ergebnisse des *in vitro* Modells der untersuchten Glucocorticoide mit Daten aus *in vivo* Studien zu vergleichen. So lag die nasale Bioverfügbarkeit einer wässrigen Wirkstoffsuspension bei Bud bei 29 % bzw. 34 % [29,30]. Die in klinischen Studien ermittelten Plasmakonzentrationen von Bud wie von den anderen nasalen Glucocorticoiden kamen dabei zu einem großen Teil durch den direkt über die nasale Mukosa absorbierten Wirkstoff zustande, da dieser die hepatische Inaktivierung durch den first pass Effekt umgehen konnte [31,37,187,188]. Die relativ hohe Bioverfügbarkeit von Bud machte sich auch in vergleichbar hohen maximalen Plasmakonzentrationen (c_{max}) nach nasaler Applikation bemerkbar. Thorsson et al. ermittelten nach einer Einmalgabe von 400 μg einer wässrigen

Suspensionsformulierung, die mittels eines Pumpsprays nasal appliziert wurde, eine c_{\max} von 430 pg/mL [30,189]. Auch mit der raschen Auflösung der Bud-Kristalle auf der nasalen Mukosa sind die gemessenen c_{\max} -Werte zu erklären.

Im Gegensatz dazu war die in Studien ermittelte nasale Bioverfügbarkeit von FP mit < 1 % als vergleichbar gering einzustufen [29,34]. Die von Daley-Yates et al. untersuchte maximale Plasmakonzentration von FP betrug nach nasaler Einmalapplikation von 800 µg einer wässrigen Suspensionsformulierung lediglich 27.7 pg/mL [190].

Diese Unterschiede in der nasalen Bioverfügbarkeit und maximalen Plasmakonzentration zwischen den beiden Substanzen Bud und FP, die mittels *in vivo* Untersuchungen bestimmt wurden, waren auch über das entwickelte Modell nachvollziehbar. So lagen auch hier bei Bud nach erfolgter Freisetzung in das simulierte Blutkompartiment im Vergleich zu FP wesentlich höhere Plasmakonzentrationen vor. In den durchgeführten *in vitro* Versuchen ist dies auf die geringere Gewebeaffinität des Bud zu FP zurückzuführen.

Die Ergebnisse zeigten also durchaus, dass das entwickelte Modell zur Beurteilung der Pharmakokinetik nasal applizierter Formulierungen geeignet ist und Korrelate zur *in vivo* Situation hergestellt werden können. *In vivo* ist anzunehmen, dass der Unterschied zwischen den beiden Glucocorticoiden, bezüglich der in Studien gemessenen Plasmakonzentrationen, auch durch die perorale Absorption des verschluckten Wirkstoffs nach erfolgter mukoziliärer Clearance zustande kommt [190]. So landet ungefähr 70 % des applizierten Wirkstoffs durch direktes Ausfließen bzw. die mukoziliäre Clearance im Magen-Darm Trakt [23]. Die orale Bioverfügbarkeit wurde in klinischen Studien für Bud mit 11 % und FP mit < 1 % bestimmt und kann so, neben dem nasal absorbierten Wirkstoffanteil, gerade für hydrophilere Wirkstoffe wie Budesonid zu einem unerwünschten Anstieg des Plasmaspiegels beitragen.

7 Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch wirkstoffenthaltendes Humanplasma des pharmakokinetischen Modells

Die Therapie der allergischen Rhinitis umfasst neben den intranasalen Glucocorticoiden als eine weitere Wirkstoffgruppe zur topischen Applikation die Antihistaminika. Hierbei ist derzeit neben Levocabastin, Azelastin-HCl als H₁-Antihistaminikum der zweiten Generation sowohl als Augentropfen als auch als Nasenspray für die Behandlung zugelassen. Wie bei den nasalen Glucocorticoiden ermöglicht die topische Anwendung von Azelastin-HCl die Applikation höherer Dosen im Vergleich zur systemischen Therapie, was verantwortlich ist für eine effektive antiallergische und antiinflammatorische Wirkung im Zielorgan und dabei gleichzeitig systemische Nebenwirkungen sowie die Wahrscheinlichkeit für mögliche Wechselwirkungen minimiert [191]. Nasale Antihistaminika werden in der Regel zweimal täglich angewendet, um eine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Nasengewebe zu erreichen und positive Effekte auf die allergischen Symptome im idealen Maße vorzuweisen [192]. Im Vergleich zu den oralen Antihistaminika wurde in klinischen Studien eine ähnliche Wirksamkeit, jedoch ein signifikant schnellerer Wirkeintritt, ermittelt, der bereits innerhalb von 20 min nach Applikation eintreten kann [193,194]. Als nachteilig für die Compliance des Patienten bei der Anwendung von Azelastin-HCl-haltigen nasalen Arzneiformen ist der bittere Geschmack zu nennen, der bisweilen Übelkeit hervorrufen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass intranasale Glucocorticoide sowohl den nasalen wie auch den oralen Antihistaminika bezüglich einer Verbesserung der allergischen Symptomatik überlegen sind [195]. Antihistaminika bewirken dabei vor allem eine Symptombesserung in der Sofortphase der allergischen Reaktion [10]. Jedoch sind auch zahlreiche antiinflammatorische Effekte der Wirkstoffe beschrieben, die die Aufrechterhaltung der Entzündung beeinflussen können.

Ratner et al. untersuchten außerdem, ob eine Kombinationstherapie eines Antihistaminikums und eines Glucocorticoids, welche beide nasal appliziert wurden, wirksamer als die jeweilige Monotherapie ist. So wurde in dieser Studie festgestellt, dass die kombinierte nasale Therapie aus Azelastin-HCl und Fluticasonpropionat der jeweiligen Monotherapie überlegen ist [196,197]. Dennoch ergaben sich bislang noch keine Empfehlungen für eine parallele topische Anwendung beider Arzneistoffgruppen, was zum einen an der derzeitigen geringen Datenlage für eine positive Beurteilung und einen eindeutigen Vorteil der

Kombinationstherapie liegt, zum anderen an der ausreichenden Effektivität der Monotherapie mit intranasalen Glucocorticoiden festzumachen ist [8,198]. Eine Kombinationstherapie von einem oralen Antihistaminikum mit einem nasalen Glucocorticoid wird meist lediglich bei starken Beschwerden in Erwägung gezogen [9].

7.1 Fragestellung

Die guten antiinflammatorischen Effekte der intranasalen Glucocorticoide bei der Therapie der allergischen Rhinitis sind auf den effektiven genomischen Wirkmechanismus zurückzuführen und sind durch zahlreiche klinische Studien belegt [10]. Die *in vitro* Entzündungshemmung durch wirkstoffhaltige Gewebeproben intranasaler Glucocorticoide konnte durch die Entwicklung eines Modells mit Hilfe einer Lungenepithelzelllinie in eigenen Versuchen nachgewiesen werden (siehe *Kapitel 5*).

Die Wirksamkeit von H₁-Antihistaminika in der antiallergischen Therapie hängen sowohl mit ihren rezeptorabhängigen, als auch ihren rezeptorunabhängigen Effekten zusammen [199]. So ist die Potenz des Azelastins am H₁-Rezeptor zu nennen, die etwa zehnmal die des Chlorphenamins übersteigt [200]. Daneben sind aus *in vitro* und *in vivo* Studien eine Vielzahl an pharmakologischen Effekten bekannt, die zum einen die frühe Phase der allergischen Reaktion betreffen können, zum anderen sich aber auch antiinflammatorisch in der Spätphase äußern können. So kommt es durch Antihistaminika zur Hemmung der Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und basophilen Granulozyten, aber auch zur Hemmung der Expression und Freisetzung von inflammatorischen Cytokinen [186,200].

Das Ziel war es die pharmakokinetischen Experimente zur Gewebe-Gel-Bindung von Fluticasonpropionat und Azelastin-HCl mit einer pharmakodynamischen Fragestellung zu verbinden und einen Vergleich der antiinflammatorischen Eigenschaften beider Arzneistoffklassen mit Hilfe eines *in vitro* Zellkulturmodells einer Lungenepithelzelllinie und dem Entzündungsmarker IL-8 durchzuführen.

Bei der Bestimmung der Gewebebindung von Azelastin-HCl und Fluticasonpropionat mit Hilfe einer Gewebe-Gel-Matrix stellte sich heraus, dass das Antihistaminikum eine etwa viermal so starke Affinität zu Lungengewebe besitzt als das untersuchte Glucocorticoid (siehe *Kapitel 6*). Die höhere Gewebekonzentration des Azelastin-HCl im Vergleich zum Fluticasonpropionat, äußerte sich auch in einer höheren Wirkstoffkonzentration nach Freisetzung aus der Gewebe-Gel-Bindung in das simulierte Blutkompartiment.

Somit stellte sich die Frage, inwiefern sich die antiinflammatorischen Eigenschaften der beiden Vertreter der jeweiligen Arzneistoffklassen mit Hilfe eines Zellkulturmodells darstellen

lassen, wobei die Plasmaproben nach der Freisetzung aus der Gewebe-Gel-Bindung als humane Spezimen zur Inkubation mit Lungeneithelzellen Verwendung finden sollten.

7.2 Prinzip der Bestimmung.

Zur Bestimmung der Hemmung der IL-8 Sekretion aus A549 Zellen *in vitro* wurden Zellkulturversuche durch Inkubation mit Wirkstoff enthaltenden Plasmaproben mit Fluticasonpropionat und Azelastin-HCl durchgeführt (siehe 7.3, 7.4 und 7.5 Experimenteller Teil C). Dabei wurden A549 Lungeneithelzellen am Boden eines Zellkulturgefäßes kultiviert. Als humanes Spezimen für eine Inkubation mit den Zellen diente das Humanplasma der Freisetzungsversuche aus der Gewebe-Gel-Bindung und der Vergleichsgel-Bindung. Dabei wurden zum einen Plasmaproben eingesetzt, die nach der ersten Stunde der Umverteilung aus der Gelbindung gewonnen wurden. Außerdem wurde eine zweite Versuchsreihe durchgeführt, bei der Plasmaproben zur Zellinkubation verwendet wurden, die dadurch vorbereitet wurden, dass nach der kompletten Erneuerung der Freisetzungsmatrix nach einer Stunde frisches Humanplasma über dann weitere zwei Stunden mit der Gel-Matrix inkubiert wurde. Um für die Kontrollproben der Zellkulturexperimente eine entsprechende Matrix bereitzustellen, wurde ein wirkstofffreies Polyacrylamidgel mit Humanplasma für identische Zeiträume wie die wirkstofftragenden Gele inkubiert (Kontrollplasma). So konnte ein möglicher Einfluss von Acrylamidmonomeren auf die Zellviabilität, die theoretisch bei der Inkubation der Gel-Matrix in Humanplasma freigesetzt wurden, erfasst werden.

Nach der Kultivierung der Lungeneithelzellen bis zur Subkonfluenz wurden die Plasmaproben für zunächst 3 h mit der Zelllinie inkubiert, ehe der Ansatz mit Lipopolysaccharid (LPS) einer Konzentration von 50 µg/mL über 24 h stimuliert wurde. Anschließend wurden Proben aus dem Überstand der Zellkultur gewonnen und schließlich mittels ELISA bestimmt (siehe 7.6 Experimenteller Teil C).

7.3 Ergebnisse

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Plasmaproben nach einer Stunde Freisetzung aus der Gelbindung in Humanplasma untersucht. Durch die Inkubation mit Kontrollplasma und die Stimulation mit LPS über 24 Stunden kam es bei den A549 Zellen zur Sekretion von 338 ± 12 pg/mL (Kontrolle; n= 4) IL-8 (siehe *Abbildung 29*). Weiter wurde Humanplasma (P) ohne Gelinkubation in der Zellkultur untersucht, welches eine IL-8 Konzentration von 442 ± 27 pg/mL

(P +LPS; n= 4) ergab (siehe *Abbildung 29*). Daneben wurden Zellen mit Medium (M) inkubiert, in der auf Plasmazugabe sowie LPS-Stimulation verzichtet wurde und eine IL-8 Konzentration von 161 pg/mL (M –LPS; n= 1) ermittelt wurde. Schließlich wurde der Effekt von Medium untersucht, wobei auf Plasmazugabe verzichtet wurde, jedoch eine LPS-Stimulation stattfand, wodurch sich 271 pg/mL (M +LPS; n= 2) IL-8 ergaben (siehe *Abbildung 29*).

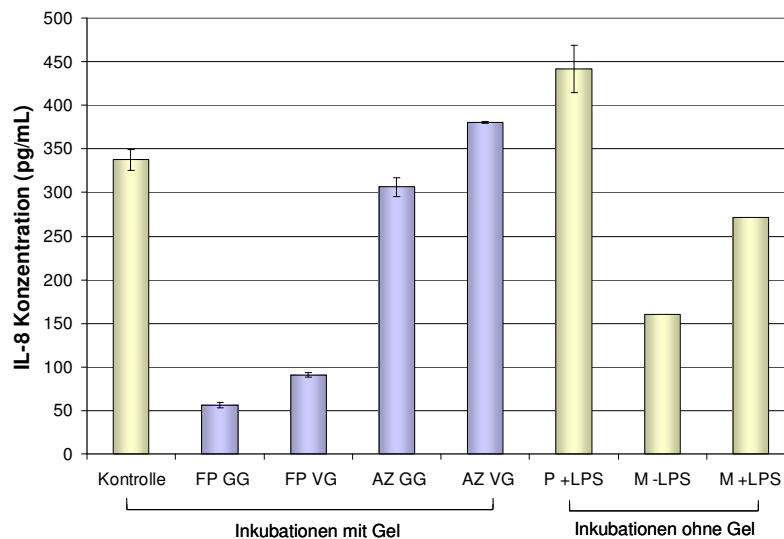


Abbildung 29: Hemmung der IL-8 Sekretion von A549 Zellen durch die Inkubation von Plasmaproben, welche durch eine einstündige Inkubation von wirkstoffbeladenem Gewebe-Gel, Vergleichsgel bzw. Kontroll-Gel in Humanplasma gewonnen wurden (FP GG: FP Gewebe-Gel; FP VG: FP-Vergleichsgel; AZ GG: AZ-Gewebe-Gel; AZ VG: AZ-Vergleichsgel; jeweils n= 3; Kontrolle: Kontroll-Gel; n= 4). Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittlere Abweichung vom Mittelwert. Die Lungenepithelzellen wurden mit LPS (50 µg/mL) stimuliert. Die IL-8 Konzentration im Zellkulturmedium wurde mittels ELISA bestimmt. Weiterhin sind dargestellt: Humanplasma ohne Gelinkubation mit LPS (P +LPS; n= 4; MW ± MAbM), Medium ohne Plasmazugabe und ohne LPS (M –LPS; n= 1), sowie Medium ohne Plasmazugabe und mit LPS (M +LPS; n= 2; MW).

Die Plasmaproben der Gelversuche mit Fluticasonpropionat ergaben nun eine Hemmung der IL-8 Sekretion in das Zellkulturmedium. Während bei den Plasmaproben der Vergleichsgele eine IL-8 Konzentration von 91 ± 3 pg/mL ermittelt wurde (FP VG; n= 3), kam es mit 56 ± 3 pg/mL (FP GG; n= 3) zu einer ca. 40 %igen Abnahme der IL-8 Konzentration der Gewebe-Gel-Proben gegenüber den Vergleichsgel-Proben (siehe *Abbildung 29*).

Während die Plasmaproben mit Azelastin-HCl aus den Vergleichsgel-Experimenten mit 380 ± 1 pg/mL (AZ VG; n= 3) eine ähnliche IL-8 Konzentration wie die Kontrollplasmaproben aufwiesen, kam es bei den Gewebe-Gel-Proben mit 306 ± 11 pg/mL (AZ GG; n= 3) zu einer geringen Hemmung der IL-8 Freisetzung (siehe *Abbildung 29*).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Plasmaproben, die nach der kompletten Erneuerung der Freisetzungsmatrix nach einer Stunde und darauffolgend durch weitere zwei Stunden Kontakt mit der Gel-Matrix entstanden sind, im Zellkultorexperiment untersucht. Hierdurch sollte der antiinflammatorische Effekt ermittelt werden, der durch eine verzögerte Freisetzung von Wirkstoff zustande kam. Bei der Inkubation mit Kontrollplasma und Stimulation mit LPS über 24 Stunden kam es bei den A549 Zellen zur Sekretion von 470 ± 6 pg/mL (Kontrolle; n= 4) IL-8 (siehe *Abbildung 30*). Weiter wurde Humanplasma (P) ohne Gelinkubation untersucht, welches zu einer IL-8 Konzentration von 439 ± 36 pg/mL (P +LPS; n= 4) führte. Außerdem wurden Zellen mit Medium (M) inkubiert, in der auf Plasmazugabe sowie LPS-Stimulation verzichtet wurde und eine IL-8 Konzentration von 224 pg/mL (M -LPS; n= 1) ermittelt wurde. Schließlich wurde der Effekt von Medium auf die Zellkultur untersucht, wobei auf Plasmazugabe verzichtet wurde, jedoch eine LPS-Stimulation stattfand, wodurch sich 322 pg/mL (M +LPS; n= 2) IL-8 ergaben (siehe *Abbildung 30*).

Die Plasmaproben der Gelversuche mit Fluticasonpropionat ergaben nun wiederum eine Hemmung der IL-8 Sekretion in das Zellkulturmedium. Während bei den Plasmaproben der Vergleichsgel eine IL-8 Konzentration von 135 ± 9 pg/mL ermittelt wurde (FP VG; n= 3), kam es mit 115 ± 15 pg/mL (FP GG; n= 3) lediglich zu einer ca. 15 %igen Abnahme der IL-8 Konzentration der Gewebe-Gel-Proben gegenüber den Vergleichsgel-Proben (siehe *Abbildung 30*).

Die Plasmaproben mit Azelastin-HCl aus den Vergleichsgel-Experimenten mit 416 ± 7 pg/mL (AZ VG; n= 3) zeigten eine leicht geringere IL-8 Konzentration als die Kontrollplasmaproben auf. Bei den Gewebe-Gel-Proben kam es mit 402 ± 16 pg/mL (AZ GG; n= 3) zu einer ähnlichen Hemmung der IL-8 Freisetzung (siehe *Abbildung 30*).

Die erfolgte Bestimmung der Zellviabilität nach der Durchführung der Versuche ergab eine vergleichbare Zellzahl für jedes Experiment (siehe 7.1.1 bzw. 7.2.1, Tabellarischer Anhang D). Hierdurch konnte ein schädlicher Einfluss durch die Plasmainkubation mit Polyacrylamidgelen ausgeschlossen werden.

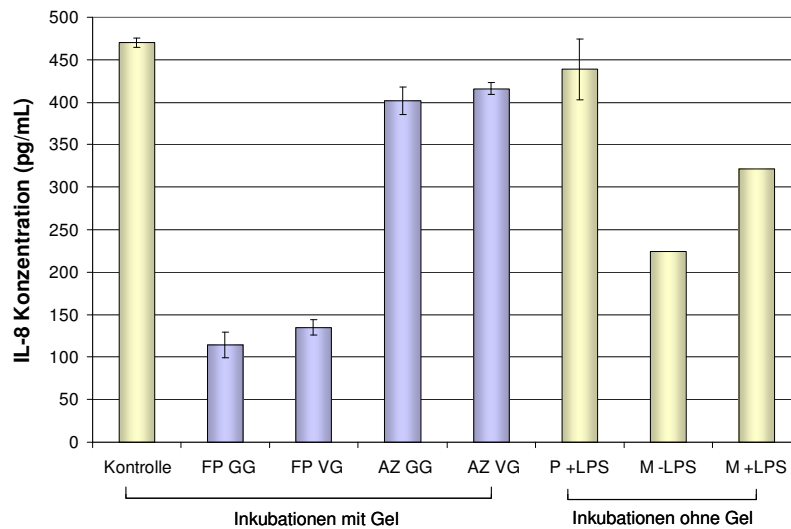


Abbildung 30: Hemmung der IL-8 Sekretion von A549 Zellen durch die Inkubation von Plasmaproben, welche durch die zweistündige Inkubation von wirkstoffbeladenem Gewebe-Gel, Vergleichsgel bzw. Kontroll-Gel in Humanplasma nach Erneuerung der Freisetzungsmatrix nach einer Stunde gewonnen wurden (FP GG: FP-Gewebe-Gel; FP VG: FP-Vergleichsgel; AZ GG: AZ-Gewebe-Gel; AZ VG: AZ-Vergleichsgel; jeweils n= 3; Kontrolle: Kontroll-Gel; n= 4). Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittlere Abweichung vom Mittelwert. Die Lungenepithelzellen wurden mit LPS (50 µg/mL) stimuliert. Die IL-8 Konzentration im Zellkulturmedium wurde mittels ELISA bestimmt. Weiterhin sind dargestellt: Humanplasma ohne Gelinkubation mit LPS (P +LPS; n= 4; MW ± MAbM), Medium ohne Plasmazugabe und ohne LPS (M -LPS; n= 1), sowie Medium ohne Plasmazugabe und mit LPS (M +LPS; n= 2; MW).

7.4 Diskussion

7.4.1 Antiinflammatorische Eigenschaften von Antihistaminika und Glucocorticoiden

Traditionell liegt bei H₁-Antihistaminika der Fokus der Pharmakologie auf der invers agonistischen Wirkung an H₁-Rezeptoren von beispielsweise Zellen der glatten Muskulatur, Mastzellen und weiterer Immunzellen. Doch eine Reihe von Untersuchungen haben auch gezeigt, dass H₁-Antihistaminika antiinflammatorische Effekte besitzen, die unabhängig von einer H₁-Rezeptorwirkung auftreten [199,201]. So ist auch ein Effekt antihistaminischer Wirkstoffe auf Epithelzellen, die während einer allergischen Reaktion entscheidend zur

Rekrutierung von Entzündungszellen beitragen, nachgewiesen worden. Arnold et al. untersuchten in diesem Zusammenhang die antiinflammatorischen Effekte von Cetirizin auf A549 Epithelzellen und stellten dabei eine histaminunabhängige Hemmung der IL-8 Freisetzung sowie eine verminderte Expression von ICAM-1, einem Oberflächenprotein zur Zelladhäsion von Immunzellen, fest [202]. Auch für Azelastin-HCl wurden bereits hemmende Effekte auf Mediatoren der Spätphasenreaktion der allergischen Entzündungsreaktion nachgewiesen [201].

Die Applikation von intranasalen Glucocorticoiden sorgt für einen lokalen pharmakologischen Effekt auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen. Neben der Wirkstoffaktivität in einer Reihe von Entzündungszellen wie eosinophile und basophile Granulozyten sorgt auch die Wirkung auf Mastzellen und Epithelzellen für eine positive Beeinflussung der Symptome der allergischen Rhinitis.

Es hatte sich bereits in selbst durchgeführten *in vitro* Untersuchungen mit intranasalen Glucocorticoiden herausgestellt, dass die Messung von freigesetztem IL-8 aus der Zelllinie A549 nach Inkubation mit Wirkstoff enthaltenden humanen Spezimen und anschließender Stimulation mit LPS als eine sensitive Methode herangezogen werden kann, um antiinflammatorische Effekte von Corticoiden an Epithelzellen nachzuweisen (siehe 5 Experimenteller Teil C).

So stellte die Durchführung des Zellkulturmodells eine sinnvolle Möglichkeit dar, die antiinflammatorischen Effekte von Azelastin-HCl und Fluticasonpropionat auf Lungenepithelzellen zu vergleichen.

Es konnte erfolgreich ein Zellkulturexperiment etabliert werden, welches in der Lage ist, die Gewebe-Gel-Versuche, die die Pharmakokinetik von Formulierungen zweier unterschiedlicher Arzneistoffklassen zur nasalen Applikation *in vitro* simulieren konnte, um eine pharmakodynamische Fragestellung zu erweitern. Hierbei ist zunächst festzuhalten, dass die im pharmakokinetischen Versuch ermittelte höhere Gewebekonzentration des AZ-HCl gegenüber FP, die sich auch in einer höheren Wirkstoffkonzentration nach Freisetzung in das Blutkompartiment äußerte, nicht zu einer stärkeren Hemmung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zum Glucocorticoid geführt hat. Dies ist durch den effektiven antiinflammatorischen Wirkmechanismus der Glucocorticoide gegenüber den Antihistaminika zu erklären. Die höhere ermittelte Gewebekonzentration des AZ-HCl im Vergleich zu FP, die mit der höheren Lipophilie sowie dem höheren Verteilungsvolumen des AZ-HCl zu erklären ist, scheint demnach nicht für einen vergleichbaren antiinflammatorischen Effekt im Rahmen des durchgeführten *in vitro* Experiments auszureichen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Literaturhinweisen zur antiinflammatorischen Wirksamkeit von H₁-Antihistaminika. So ist bekannt, dass für die entzündungshemmende

Aktivität der H₁-Antihistaminika, die durch rezeptorunabhängige Effekte zustande kommen, wesentlich höhere Wirkstoffkonzentrationen nötig sind als für die rezeptorabhängigen Wirkungen [199]. Außerdem zeigen klinische Vergleiche in systematischen Übersichtsarbeiten der beiden Arzneistoffklassen, dass intranasale Glucocorticoide den nasalen wie auch oralen Antihistaminika überlegen sind, was die Behandlung nasaler Symptome der allergischen Rhinitis angeht [195,203]. Auch wird bei einer Reihe von potentiellen antiinflammatorischen Eigenschaften der Antihistaminika angezweifelt, ob sie von klinischer Relevanz sind, da sie hoher Wirkstoffkonzentrationen bedürfen [199].

Dennoch ist in den *in vitro* Experimenten eine Hemmung der IL-8 Expression nach Zellinkubation mit Humanplasma der Freisetzungsversuche des AZ-HCl enthaltenden Gewebegels festzustellen. Allerdings ist dieser antiinflammatorische Effekt wesentlich geringer gegenüber der Glucocorticoidwirkung.

Es ist anzumerken, dass die Experimente nicht mit einer Plasma-Erythrozyten-Mischung durchgeführt worden sind, sondern aufgrund der Inkubation des Spezimen in der Zellkultur mit reinem Humanplasma. So wurde ein unkalkulierbarer Einfluss zellulärer Bestandteile auf die Lungenepithelzellen verhindert. Aufgrund einer nicht unerheblichen Verteilung von AZ-HCl in Erythrozyten wurde bei den pharmakokinetischen Untersuchungen die Freisetzung aus der Gewebe-Gel-Bindung mit einer Plasma-Erythrozyten-Mischung vorgenommen (siehe 6). Dadurch wurde mehr Wirkstoff in das simulierte Blutkompartiment freigesetzt, im Vergleich zur Verwendung einer reinen Plasmainkubation. In Anbetracht dessen darf vermutet werden, dass durch die verwendete reine Plasma-Matrix bei der Freisetzung aus der Gewebe-Gel-Bindung der antiinflammatorische Effekt des AZ-HCl im Zellkulturmodell schwächer ausgefallen ist, als durch die pharmakokinetischen Untersuchungen angenommen werden darf.

Betrachtet man die Ergebnisse der IL-8-Synthese-Hemmung aus A549 für beide Wirkstoffe, so erkennt man deutlich die unterschiedlichen Auswirkungen der beiden untersuchten Freisetzungzeitpunkte aus der Gewebefreisetzung. Die Plasmaproben, die über die erste Stunde der Desorption aus dem Gewebe-Gel zur Inkubation in der Zellkultur eingesetzt wurden, führten zu einem stärkeren antiinflammatorischen Effekt, im Vergleich zu den späteren Plasmaproben.

Zusätzlich machte sich dies bei der Betrachtung der Gewebe-Gel-Proben und der Vergleichsgel-Proben zu beiden Zeitpunkten erkennbar. Der Unterschied der IL-8 Konzentrationen zwischen den Gewebe-Gel-Proben und den Vergleichsgel-Proben war zum früheren Zeitpunkt der Freisetzung wesentlich deutlicher ausgeprägt. Dies war mit dem relativ schnellen Anstieg der Plasmakonzentration durch die Desorption von Wirkstoff aus der Gewebe-Bindung über die erste Stunde zu erklären. Weiterhin kam es nach der initialen

Desorption zu einer geringeren und langsameren Freisetzung aus der Gewebe-Gel-Bindung, was mit einer verzögerten Diffusion aus der Gewebefindung begründet werden kann. Dies drückte sich wiederum in geringeren Unterschieden bei der Betrachtung der IL-8 Konzentrationen von Gewebe-Gel und Vergleichsgel zum späteren Untersuchungszeitpunkt aus.

So lässt sich zusammenfassend festhalten, dass ein Vergleich der IL-8 Konzentrationen der Plasmainkubationen der Gewebe-Gele mit denen der Vergleichsgele beider untersuchter Arzneistoffe die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen erfolgreich bestätigt und den physiologischen Plasmaspiegelverlauf widerspiegelt.

Das jeweilige Gewebe-Gel führte zu einer stärkeren Freisetzung von Arzneistoff in das Blutkompartiment gegenüber dem Vergleichsgel. Diese höheren Wirkstoffkonzentrationen wiederum sorgten erwartungsgemäß für eine stärkere IL-8 Hemmung bei den Inkubationen im Zellkulturexperiment.

C Experimenteller Teil

1 Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils handelsüblicher Suspensionen zur intranasalen Applikation

1.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Beclomethason-17,21-dipropionat (BDP), Fluticason-17-(2 furoat) (FF), Fluticason-17-propionat (FP) und Mometason-17-(2 furoat) (MF) wurden von GlaxoSmithKline (Greenford, England) zur Verfügung gestellt. Budesonid (Bud) wurde von Sigma-Aldrich-Chemie (Taufkirchen, Deutschland), Amcinonid (Amc) und Triamcinolonacetonid (TCA) wurden von Cyanamid (Wolfratshausen, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Glucocorticoid-Nasensprays (siehe 1.3) wurden in einer öffentlichen Apotheke erworben. Das verwendete Wasser stammt aus einer Demineralisationsanlage (Umkehrosmose) und wurde mit einer Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q[®] reagent grade water system) von Millipore (Schwalbach, Deutschland) aufgereinigt. Acetonitril (HPLC-gradient-grade) wurde von der Firma VWR (Ismaning, Deutschland) bezogen. Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a. Qualität von E. Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben.

1.1.1 Stammlösungen

- **Interner Standard**

Als interner Standard wurde zunächst eine methanolische Stammlösung hergestellt, die Amcinonid in einer Konzentration von 1 mg/mL enthielt. Diese Stammlösung wurde weiter mit MeOH bis zu einer Konzentration von 5 µg/mL verdünnt. Die Zugabe des internen Standards erfolgte durch entsprechendes Zumischen zur Matrix der Kalibrierstandards und Proben.

- **Kalibrierstandards**

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden für die jeweiligen Glucocorticoide Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Durch Verdünnung mit MeOH wurden für BDP, FF, FP und MF Verdünnungen der Stammlösungen mit Konzentrationen zwischen 0.125 µg/mL und 8 µg/mL hergestellt. Während die Verdünnungen der Stammlösungen von Bud und TCA Konzentrationen zwischen 12.5 µg/mL und 800 µg/mL beinhalteten. Die jeweiligen Kalibrierstandards wurden durch entsprechendes Zumischen der Verdünnungen zur Matrix erhalten. Alle Stammlösungen wurden bei -40 °C gelagert.

1.1.2 Verwendete Glucocorticoid-Nasensprays

Fertigarzneimittel	Wirkstoff	Sonstige Bestandteile	Hersteller
Avamys[®] 27.5 µg/Sprühstoß Nasenspray	Fluticason- furoat (FF)	Carmellose-Natrium, Glucose, Polysorbat 80, Natriumedetat, Benzalkoniumchlorid, Aqua purif.	GlaxoSmith Kline
Nasonex[®] 50 µg/Sprühstoß Nasenspray	Mometason- furoat (MF)	Carmellose-Natrium, mikrokristalline Cellulose, Glycerol, Natriumcitrat 2- H ₂ O, Citronensäure H ₂ O, Polysorbat 80, Benzalkoniumchlorid, Aqua purif.	Essex Pharma
Flutide[®] Nasal 50 µg/Sprühstoß Nasenspray	Fluticason- propionat (FP)	Carmellose-Natrium, mikrokristalline Cellulose, Glucose, Polysorbat 80, 2- Phenylethanol, Benzalkoniumchlorid, Aqua purif.	GlaxoSmith Kline
ratio Allerg[®] 50 µg/Sprühstoß Heuschnupfenspray	Beclomethason- 17,21-dipropionat (BDP)	Carmellose-Natrium, mikrokristalline Cellulose, Glucose, Polysorbat 80, Benzalkoniumchlorid, HCl, NaOH, Aqua purif.	ratiopharm
Budes[®] 50 µg/Sprühstoß Nasenspray	Budesonid (Bud)	Carmellose-Natrium, mikrokristalline Cellulose, Glucose, Polysorbat 80, Natriumedetat, Kaliumsorbit, HCl, Aqua purif.	Hexal
Nasacort[®] 55 µg/Sprühstoß Nasenspray	Triamcinolon- acetonid (TCA)	Carmellose-Natrium, Mikrokristalline Cellulose, Glucose, Polysorbat 80, Benzalkoniumchlorid, Natriumedetat, HCl, NaOH, Aqua purif.	Sanofi- Aventis

1.1.3 Entnahme einer homogenen Glucocorticoid-Suspension aus den Nasenspray-Zubereitungen

Um für die Versuche eine homogene Glucocorticoid-Suspension zu erhalten, wurden die Hinweise der jeweiligen Hersteller zur richtigen Anwendung beachtet. Vor dem Auslösen eines Sprühstoßes wurden die Applikationssysteme mehrmals gut geschüttelt. Vor dem Erstgebrauch sowie vor der Entnahme an jedem Versuchstag wurde das jeweilige Nasenspray durch mehrfaches Auslösen bis zum Austritt eines feinen Sprühnebels vorbereitet („Priming“).

Die Entnahme der entsprechenden Suspension wurde durch aufrechtes Einsprühen in einen Spitzkolben (Inhalt 5 mL, NS 14/23) erreicht (siehe *Abbildung 31*). Die im Kolben gesammelte Suspension wurde vor dem weiteren Gebrauch für wenige Sekunden auf dem Vortex geschüttelt. Zur Gewährleistung identischer Bedingungen wurde dieses Vorgehen vor jedem neuen Versuchsansatz durchgeführt.

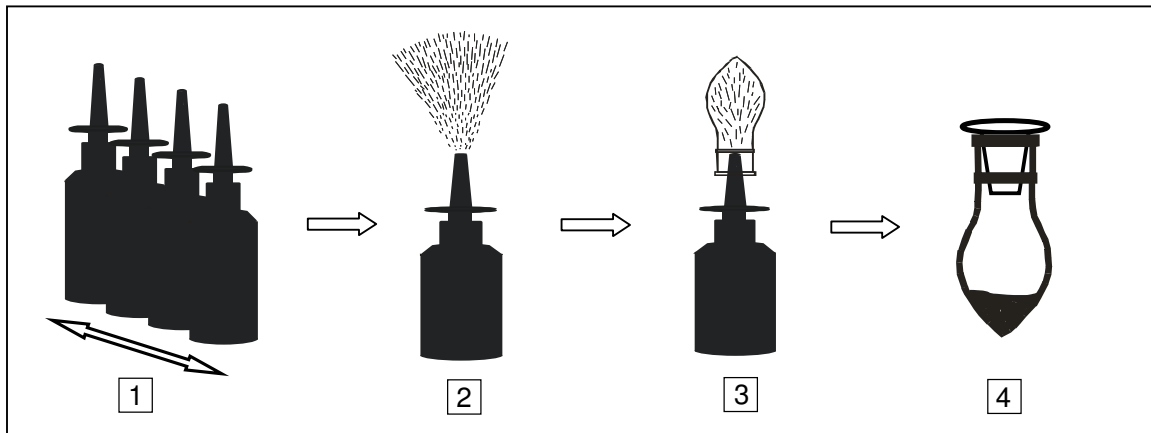


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Entnahme einer homogenen Glucocorticoid-Suspension aus handelsüblichen Nasenspray-Zubereitungen: 1.) Nasenspray gut schütteln; 2.) Mehrfaches Auslösen bis zum Austreten eines feinen Sprühnebels (falls notwendig); 3.) Aufrechtes Einsprühen in einen Spitzkolben; 4.) Aufbewahrung der gesammelten Suspension im Spitzkolben; vor der Entnahme mit der Microliterpipette für wenige Sekunden auf dem Vortex schütteln

1.2 Verwendete Geräte und Materialien

Ultrafiltrationseinheiten Microcon [®] Ultracel YM-10, MWCO 10000	Millipore (Bedford, USA)
Microfuge [®] 22R Centrifuge	Beckman Coulter (Kalifornien, USA)
Spitzkolben Inhalt 5 mL, NS 14/23	Witeg Labortechnik (Wertheim, Deutschland)
Microliterpipette 1-10 μ L (Eppendorf Research [®] variabel)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Microliterpipette 10-100 μ L (Eppendorf Research [®] variabel)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
HPLC-Vial (8 x 40 mm), 700 μ L	YMC (Dinslaken, Deutschland)
Sepecaps für Waters 96 Vials	YMC (Dinslaken, Deutschland)

1.3 Durchführung der Ultrafiltration

Die Ermittlung des Anteils an Arzneistoff, der in den verschiedenen Glucocorticoid-Suspensionen bereits gelöst vorliegt, erfolgte in 3 Zentrifugationsschritten. Zunächst wurde die Ultrazentrifugaleinheit mit 100 μ L Suspension beladen und für 15 min bei 12000 x g (20 °C) zentrifugiert. Das erhaltene Filtrat wurde verworfen. Anschließend folgte mit derselben Filtrationseinheit ein erneutes Zentrifugieren (100 μ L Suspension; 12000 x g für 15 min bei 20 °C). Wiederum wurde das Filtrat verworfen. Auf den so vorbehandelten Filter wurden 200 μ L Suspension aufgebracht und für 30 min bei 14000 x g (20 °C) zentrifugiert. Das Filtrat des letzten Schrittes wurde direkt für die Bestimmung mittels HPLC verwendet (siehe *Abbildung 32*).

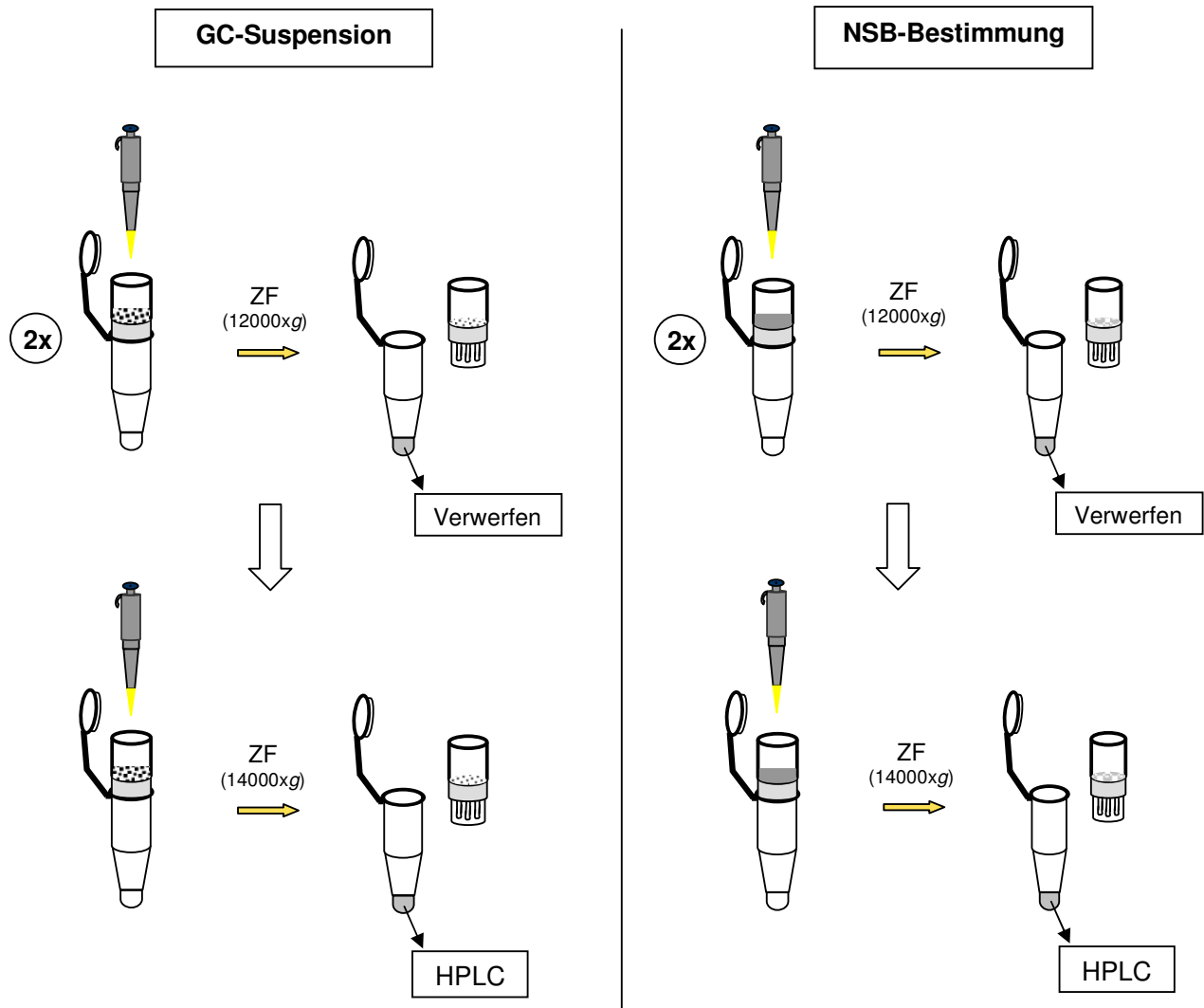


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Durchführung der Ultrafiltration zur Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils von Suspensionen zur intranasalen Anwendung. Auf der linken Seite ist der Ablauf der Zentrifugationsschritte der Glucocorticoid-Suspensionen dargestellt. Das rechte Schema zeigt die Bestimmung der nichtspezifischen Bindung (NSB) des gelösten Glucocorticoids (GC) an die Ultrafiltrationseinheit. Dabei wurde eine Standardlösung des entsprechenden Arzneistoffs eingesetzt und identisch wie die GC-Suspensionen behandelt. Die beiden ersten Zentrifugationsschritte (bei 12000 x g) dienen jeweils der Vorbehandlung der Filtrationsmembran und wurden verworfen, während das Filtrat der letzten Filtration (bei 14000 x g)

direkt zur Bestimmung mittels HPLC diente (ZF - Zentrifugation).

1.4 Bestimmung der nichtspezifischen Bindung der Glucocorticoide an die Ultrafiltrationseinheit

Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung (NSB) der lipophilen Glucocorticoide an das Filtermaterial wurden Standardlösungen der entsprechenden Glucocorticoide hergestellt. Die Konzentrationen dieser methanolisch/wässrigen (1:8) Standardlösungen betragen für Fluticasonfuroat (FF), Mometasonfuroat (MF), Fluticasonpropionat (FP) und Beclomethason-17,21-dipropionat (BDP) jeweils 0.5 µg/mL, für Budesonid (Bud) und Triamcinolonacetonid (TCA) 10 µg/mL. Mit den Standardlösungen wurden identische Zentrifugationsschritte, wie unter 1.3 beschrieben, durchgeführt und anschließend der Glucocorticoidgehalt im Filtrat bestimmt.

Berechnung der nichtspezifischen Bindung (NSB):

$$NSB [\%] = \frac{c(\text{Standardlösung nach letzter Zentrifugation})}{c(\text{Standardlösung})} \times 100$$

Berechnung der Probenkonzentration mit NSB Korrektur:

$$c(\text{mit NSB Korrektur}) [\mu\text{g} / \text{mL}] = \frac{c(\text{ohne NSB Korrektur}) \times 100}{[100 - NSB (\%)]}$$

1.5 Erfassung der log P-Werte

Die kalkulierten log P-Werte wurden den Datenblättern der entsprechenden Substanzen von Scifinder Scholar CAS Software entnommen. Demnach erfolgte die Berechnung der log P-Werte mit der Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software *V8.14 for Solaris*.

1.6 Probenvorbereitung für die HPLC

Unmittelbar nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden 50 µL des Filtrats direkt in ein HPLC-Vial überführt, mit 10 µL internem Standard (ISD, Amcinonid, 5 µg/mL) versetzt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt.

Zur Quantifizierung per HPLC wurden jeweils sechs Kalibrierstandards durch Zugabe der jeweiligen methanolischen Stammlösungen (siehe 1.1.1) in Millipore®-Wasser hergestellt. Nach Zugabe von 10 µL internem Standard (ISD, Amcinonid, 5 µg/mL) und vorsichtigem Vermischen durch Auf- und Abpipettieren direkt im HPLC-Vial wurde sofort per HPLC vermessen. Als Leerprobe (blank) diente Millipore®-Wasser und 10 µL MeOH. Die Konzentrationsbereiche der Standards lagen für FF und MF zwischen 10-200 ng/mL, für BDP und FP zwischen 20-200 ng/mL und für Bud und TCA zwischen 5-80 µg/mL.

1.7 Quantifizierung mittels HPLC

Zur Quantifizierung der einzelnen Glucocorticoide wurde die Hochleistungsflüssigchromatographie mit Gradientenelution verwendet. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch einer hydrophilen Komponente A (0.2 % (V/V) Essigsäure in Millipore®-Wasser) und einer lipophilen Komponente B (Acetonitril). Die Temperatur der Proben im Autosampler betrug während der gesamten Analyse 10 °C. Es wurden jeweils Proben mit einem Volumen von 30 µL injiziert. Die Messwellenlänge des Detektors zur Quantifizierung der jeweiligen Analyten betrug 254 nm.

1.7.1 HPLC Bedingungen

Degaser	Modell 1525 In-Line Vakuum-Degaser (Waters, Milford, USA)
Pumpe	Model 1525 für binäre Hochdruckgradienten mit analytischem Pumpenkopf (Waters)
Probengeber	717plus Autosampler mit integrierter Kühlung (Analysentemperatur 10 °C) (Waters)
Stationäre Phase	Symmetry C ₁₈ (150 x 4.6 mm; 5 µm Partikel), Temperierung mittels Säulenofen (Waters)
Detektor	UV Dualband Model 2487, Messwellenlänge 254 nm (Waters)
Steuerung und Datenverarbeitung	Software Breeze [®] Version 3.30 (Waters)

1.7.2 HPLC Methoden und Retentionszeiten (RT) der Glucocorticoide

- **Methode A**

BDP (RT: 21.4 min)

FF (RT: 19.1 min)

FP (RT: 18.9 min)

MF (RT: 19.0 min)

Amc (RT: 17.2 min)

Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	Komponente A (%)	Komponente B (%)
0	1	60	40
30		29	71

- **Methode B**

Bud (RT: 8.7 min)

Amc (RT: 17.2 min)

Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	Komponente A (%)	Komponente B (%)
0	1	60	40
20		40	60

- **Methode C**

TCA (RT: 7.0 min)

Amc (RT: 21.9 min)

Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	Komponente A (%)	Komponente B (%)
0	1	65	35
25		40	60

1.7.3 Auswertung

Die Retentionszeiten der verschiedenen Glucocorticoide sowie des internen Standards wurden bei der Methodenentwicklung erfasst. Zur quantitativen Auswertung wurde die Software „Breeze® Version 3.30“ (Waters) verwendet. Nach Integration wurden die Peakflächen des zu untersuchenden Glucocorticoids und des internen Standards ins Verhältnis gesetzt. Zur Erstellung einer Kalibriergerade wurden die ermittelten Flächenquotienten der Standards gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen. Nach Bildung der Quotienten der zu analysierenden Proben wurden anhand der Kalibriergeraden die entsprechenden Konzentrationen bestimmt.

2 Bestimmung des Sprühstoßvolumens handelsüblicher Glucocorticoid-Suspensionen zur intranasalen Applikation

2.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Diethylether (p.a. Qualität) wurde von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Anbieter aller anderen verwendeten Reagenzien sind im vorangegangenen Kapitel (siehe 1.1) vermerkt.

2.1.1 Stammlösungen

- **Interner Standard**

Als interner Standard wurde zunächst eine methanolische Stammlösung hergestellt, die Amcinonid in einer Konzentration von 1 mg/mL enthielt. Diese Stammlösung wurde mit MeOH bis zu einer Konzentration von 150 µg/mL verdünnt. Die Zugabe des internen Standards erfolgte durch entsprechendes Zumischen zur Matrix der Kalibrierstandards und Proben.

- **Kalibrierstandards**

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden für die jeweiligen Glucocorticoide Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Durch Verdünnung mit MeOH wurden für BDP, Bud, FF, FP, MF und TCA Verdünnungen der Stammlösungen mit Konzentrationen zwischen 25 µg/mL und 800 µg/mL hergestellt. Die jeweiligen Kalibrierstandards wurden durch entsprechendes Zumischen der Verdünnungen zur Matrix erhalten. Alle Stammlösungen wurden bei -40 °C gelagert.

2.2 Verwendete Geräte und Materialien

Labofuge II	Heraeus-Christ (Osterode am Harz, Deutschland)
Mischrad	Außendurchmesser 340 mm, 24 Halterungen für Normschliffe NS 14/23, 10 Upm, (Konstruktion der institutseigenen Werkstatt)
Reagenzgläser (100 x 16 mm), NS 14/23 mit Stopfen, Duran®	Witeg Labortechnik (Wertheim, Deutschland)
Ultraschallbad Merck Eurolab USR 30	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Alle weiteren verwendeten Geräte sind dem vorangegangenen Kapitel (siehe 1.2) zu entnehmen.

2.3 Gehaltsbestimmung intranasaler Glucocorticoid-Nasensprays

Zur Bestimmung des Sprühstoßvolumens einer Dosierung intranasal applizierter Glucocorticoide wurde eine Gehaltsbestimmung eines definierten Volumens der unterschiedlichen Glucocorticoid-Suspensionen vorgenommen. Hierfür wurden 50 µL der jeweiligen vorbereiteten Glucocorticoid-Suspension (siehe 1.1.3) mit einer Microliterpipette aufgezogen. Daraufhin wurde die Pipettenspitze gründlich mit Zellstoff abgewischt, um von außen haftende Wirkstoffpartikel zu entfernen. Das vorgegebene Volumen an homogener Glucocorticoid-Suspension wurde in eine vorbereitete Mischung aus 500 µL MeOH und 500 µL Millipore®-Wasser pipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich aus der Pipettenspitze ausgewaschen. In der Folge wurden die Proben für wenige Sekunden auf dem Vortex gemischt und für 15 min im Ultraschallbad inkubiert.

Zur Vorbereitung der Kalibrierstandards und Leerproben (blank) wurden jeweils sieben Aliquots mit einer Mischung aus 500 µL MeOH und 500 µL Millipore®-Wasser hergestellt. Jeweils sechs Aliquots wurden mit methanolischen Glucocorticoidverdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 2.5 bis 80 µg/mL versetzt.

Die Probenaufarbeitung mittels erschöpfender Etherextraktion folgte direkt im Anschluss. Dieses Vorgehen gewährleistet das vollständige Lösen ungelöster Glucocorticoidkristalle im lipophilen Ethermilieu und ein Abtrennen hydrophiler Hilfsstoffe der

nasalen Formulierungen, die für die HPLC-Analytik störend sind. Die Proben der Gehaltsbestimmung und die Kalibrierstandards wurden mit 50 µL internem Standard (ISD, 150 µg/mL Amcinonid) versetzt. Die Leerproben wurden mit 50 µL MeOH versetzt. Der Zugabe des ISD bzw. des MeOH zu den Proben folgte ein kurzes Durchmischen auf dem Vortex.

In der Folge wurde zweimal mit Diethylether extrahiert. Dabei wurden die Proben mit jeweils 3 mL Diethylether versetzt und 20 min am Mischrad angebracht. Zur besseren Phasentrennung wurde jeweils nach der Extraktion bei ca. 1000 x *g* für 3 min abzentrifugiert. Die Etherphasen beider Extraktionsschritte wurden vereinigt und unter einem leichten Stickstoffstrom bei 30 °C im Wasserbad bis zur Trockne abgedampft. Die Rückstände wurden jeweils in 250 µL MeOH aufgenommen und sofort zur Quantifizierung per HPLC verwendet.

2.4 Quantifizierung mittels HPLC

Die HPLC Bedingungen, die verwendeten HPLC Methoden sowie die Vorgehensweise bei der Auswertung sind dem vorangegangenen Kapitel (siehe 1.7) zu entnehmen. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL.

2.5 Berechnung des Sprühstoßvolumens pro Sprühstoß

Durch die in den eigenen Versuchen ermittelte Glucocorticoidkonzentration in 50 µL Suspension konnte nun das Sprühstoßvolumen anhand der vom jeweiligen Hersteller bekannten applizierten Wirkstoffdosis pro Sprühstoß berechnet werden.

3 Bestimmung der Löslichkeit intranasaler Glucocorticoid-Suspensionen in Puffer und künstlichem Nasensekret

3.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Bovines Serumalbumin (BSA, Typ H1) wurde von Gerbu (Heidelberg, Deutschland) erworben. Bicinchoninsäure und Mucin (gewonnen aus dem Schweinemagen, Typ II) wurden von Sigma-Aldrich-Chemie bezogen (Taufkirchen, Deutschland). Polypropylenglycol mit dem mittleren Molekulargewicht 4000 (PPG-4000, Pluriol® P 4000) wurde von BASF (Ludwigshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Anbieter aller anderen verwendeten Reagenzien sind in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.1, bzw. 2.1) beschrieben.

3.1.1 Stammlösungen

Die Herstellung, Konzentrationen sowie die Handhabung der Stammlösungen zur Quantifizierung sind dem vorangegangenen Kapitel (siehe 1.1.1) zu entnehmen.

3.1.2 Isotonischer Phosphat-Puffer mit pH 6.5

Der verwendete isotonische Phosphat-Puffer wurde hergestellt aus Phosphate Buffered Saline (PBS)-Trockensubstanz ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Durch Auflösen der Trockensubstanz in Millipore®-Wasser wurden folgende Konzentrationen erreicht:

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na_2HPO_4	8.1 mM
KH_2PO_4	1.5 mM
Millipore®-Wasser	q.s.

Durch 1N HCl wurde der pH-Wert auf 6.5 eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurde der vorbereitete Puffer aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Künstliches Nasensekret (KNS)

Zur Herstellung von künstlichem Nasensekret (KNS) wurde zunächst 35.0 g Mucin in einem 1 L Masskolben eingewogen und mit PBS (pH 6.5, siehe 2.1.1) unter Umrühren auf ca. 900 mL ergänzt. Die eingesetzte Mucinmenge wurde aus Vorversuchen ermittelt und diente zur Sättigung der Lösung mit höher- und niedermolekularen Glykoproteinen. Da sich die Literaturwerte bezüglich des Ionengehalts von menschlichem Nasensekret unterscheiden [118,127,128,204], wurde isotonischer PBS als Grundlage für die Herstellung des KNS verwendet. Das Gemisch wurde im Ultraschallbad insgesamt 2 h behandelt, wobei unter gelegentlichem kräftigen Durchmischen die gebildeten Mucinpräzipitate aufgelöst wurden, damit schließlich eine homogene Mucindispersion erhalten werden konnte. Der pH-Wert der Dispersion wurde aufgrund der sauren Anteile des Mucins mit 1 molarer Natriumhydroxid-Lösung auf den Wert 6.5 eingestellt und anschließend mit PBS-Puffer auf 1 L ergänzt.

Zur Aufreinigung und weiteren Homogenisierung der Mucindispersion wurden im Folgenden zwei Zentrifugationsschritte vorgenommen. Zunächst wurden grobe Partikel der Dispersion durch Zentrifugation bei $3345 \times g$ über 10 min ($15 \text{ }^{\circ}\text{C}$) und anschließendes vorsichtiges Abnehmen des Überstandes entfernt. Der gewonnene vereinte Überstand wurde einer erneuten Zentrifugation bei $18000 \times g$ über 15 min ($15 \text{ }^{\circ}\text{C}$) unterworfen. Durch die Bedingungen dieses letzten Zentrifugationsschritts konnte weitestgehend gewährleistet werden, dass bei den Zentrifugationen der geplanten Löslichkeitsversuche mit Glucocorticoid-Suspensionen keine Sedimentation höhermolekularer Proteine und Glykoproteine stattfindet.

3.1.4 Proteinbestimmung der aufgereinigten Mucindispersion

Die Proteinbestimmung der aufgereinigten Mucindispersion erfolgte photometrisch nach der Lowry- [118] und der Bicinchoninsäure-Methode [205].

3.1.4.1 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry ist die Bildung eines Komplexes aus Cu^{2+} -Ionen mit Peptiden und anschließender Reduktion einer Phosphormolybdat/ Phosphorwolframat-Lösung unter Entstehung von Cu^{+} und Molybdän-Wolfram-Blau, welches photometrisch erfasst werden kann.

3.1.4.1.1 Reagenzien und Geräte

Photometer UV-mini 1240	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Vortex Reax I	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gerbu (Heidelberg, Deutschland)
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Lösung A: 2 g Na_2CO_3 wurden in 100 mL 0.1 molarer NaOH gelöst (18.86 mM)

Lösung B: 1 g CuSO_4 wurde in 100 mL Millipore®-Wasser gelöst (6.26 mM)

Lösung C: 2 g Na-tartrat wurden in 100 mL Millipore®-Wasser gelöst (8.69 mM)

Lösung D: Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz : Millipore®-Wasser im Verhältnis 5:4

Lösung E: 10 mL Lösung A, 0.1 mL Lösung B und 0.1 mL Lösung C

Kalibrierlösungen:

Aus einer BSA-Stammlösung (10 mg/mL) wurden 6 Kalibrierlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0.05 bis 1.0 mg/mL hergestellt.

Probelösung:

Die aufgereinigte Mucindispersion wurde vor der Bestimmung 1:100 mit PBS verdünnt.

3.1.4.1.2 Durchführung

200 μL der Probe-, und Kalibrierlösungen sowie des PBS-Puffers (Nullabgleich) wurden mit 1 mL Lösung E versetzt, kurz auf dem Vortex durchmischt und zur Inkubation 10 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Weiter wurden 100 μL Lösung D zugegeben, nochmals gut durchmischt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Probe- bzw. Kalibrierlösungen bei 750 nm gegen den PBS-Puffer zum Nullabgleich bestimmt. Nach der Erstellung der Kalibriergeraden (Beispiel siehe *Abbildung 33*) konnte der Proteingehalt der Mucindispersion berechnet werden.

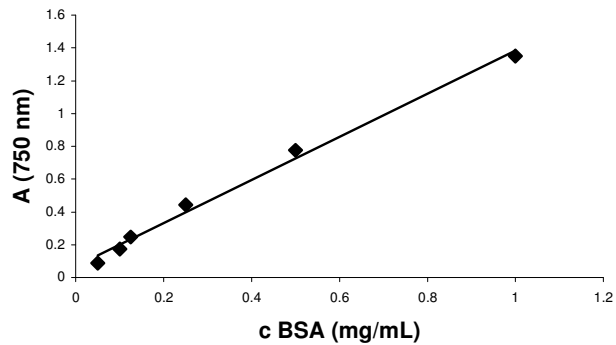


Abbildung 33: Beispielhafte Darstellung einer Kalibriergeraden von BSA (Bestimmung mit Lowry); Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.9924$

3.1.4.2 Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Das Prinzip der Proteinbestimmung mit BCA besteht wiederum aus einer Komplexbildung von Cu^{2+} -Ionen und Proteinen. Die Reduktion von Cu^{2+} hat die Bildung von Cu^+ zur Folge, welches mit BCA einen spezifischen Farbkomplex bildet und photometrisch erfasst werden kann.

3.1.4.2.1 Reagenzien und Geräte

Microplate Reader	Benchmark, BioRad Lab. (Kalifornien, USA)
96-Lochplatte, Falcon, flexibel, PVC	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gerbu (Heidelberg, Deutschland)
Bicinchoninsäure-Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Wärmeschrank Modell 400	Memmert (Schwabach, Deutschland)

Lösung I: Bicinchoninsäure

Lösung II: 4 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

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

Kalibrierlösungen:

Aus einer BSA-Stammlösung (10 mg/mL) wurden 6 Kalibrierlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0.02-1.0 mg/mL hergestellt.

Probelösung:

Die aufgereinigte Mucindispersion wurde vor der Bestimmung sowohl 1:10 als auch 1:100 mit PBS-Puffer verdünnt.

3.1.4.2.2 Durchführung

10 µL der Probe- bzw. Kalibrierlösungen und des PBS-Puffers (Nullabgleich) wurden in einer 96-Lochplatte mit 200 µL Lösung III versetzt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt und 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Ein zur Lochplatte passender Deckel wurde verwendet, um Verdunstungen während der Inkubationszeit zu verhindern. Anschließend wurden die Ansätze für 1 min auf Eis gekühlt, wobei zur Verhinderung einer Tropfenbildung an der Platte eine Alufolie zwischen Eis und Platte gelegt wurde. Unmittelbar vor der Vermessung wurde der Deckel entfernt und die Absorption am Microplate-Reader bei 560 nm gegen die Leerprobe (Nullabgleich) bestimmt. Die Probe- bzw. Kalibrierlösungen und die Leerprobe wurden jeweils dreifach vermessen und anschließend der Mittelwert gebildet. Nach der Erstellung der Kalibriergeraden (Beispiel siehe *Abbildung 34*) konnte der Proteingehalt der Mucindispersion berechnet werden.

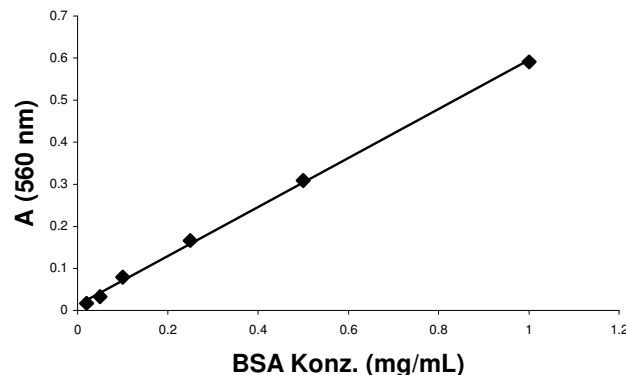


Abbildung 34: Beispielhafte Darstellung einer Kalibriergeraden von BSA (Bestimmung mit BCA); Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.9988$

3.1.4.3 Einstellung des Proteingehalts des künstlichen Nasensekrets

Um die Proteinmenge des künstlichen Nasensekrets (KNS) an Literaturwerte für menschliches Nasensekret [118,130,204] anzupassen, wurde bovines Serumalbumin (BSA) zur aufgereinigten Mucindispersion zugegeben. Der ermittelte Gesamtproteingehalt der aufgereinigten Mucindispersion betrug 4.57 mg/mL. Um den angestrebten Proteingehalt von 8 mg/mL im künstlichen Nasensekret zu erreichen, wurden 3.43 mg BSA pro mL Mucindispersion in einen Maßkolben eingewogen, aufgereinigte Mucindispersion zugegeben und unter vorsichtigem Umschütteln zum Lösen gebracht. Nach allen Arbeitsschritten zur Herstellung des KNS wurde erneut der pH-Wert gemessen, damit ein pH von 6.5 bestätigt werden konnte. Um für alle Löslichkeitsversuche dieselben Bedingungen zu gewährleisten, wurde KNS in ausreichender Menge hergestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das KNS aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2 Verwendete Geräte und Materialien

Megafuge 1.0R (Biofuge A)	Kendro-Heraeus (Berlin, Deutschland)
Microfuge [®] 22R Centrifuge,	Beckman Coulter (Kalifornien, USA)
Wasserbad	GFL 1083 (Burgwedel, Deutschland)
pH-Meter inoLab pH 720	WTW (Weilheim, Deutschland)
Microliterpipette 20-200 µL (Eppendorf Research [®] variabel)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Microliterpipette 100-1000 µL (Eppendorf Research [®] variabel)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß 1.5 mL (Polypropylen)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Transferpette [®] electronic, 0.1-5 mL	Brand (Wertheim, Deutschland)
Reagenzgläser (100 x 16 mm), NS 14/23 mit Stopfen, Duran [®]	Witeg Labortechnik (Wertheim, Deutschland)

Alle weiteren verwendeten Geräte und Materialien sind in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.2 bzw. 2.2) beschrieben.

3.2.1 Beschichtung von Reagiergefäßen mit Polypropylenglykol

Um eine mögliche Adsorption der Proteine und Glucocorticoide an die eingesetzten Polypropylengefäße während der Zentrifugationsschritte (siehe 2.3) zu minimieren, wurde eine Beschichtung der Reagiergefäße mit inertem Material vorgenommen. Durch den Einsatz von dem Blockpolymer Polypropylenglykol vom mittleren Molekulargewicht 4000 (PPG 4000) konnte von Mehl E. et al. [206] zum einen eine stabile Beschichtung erreicht, zum anderen eine besonders niedrige Protein-Restadsorption an die beschichteten Reagiergefäße gewährleistet werden.

3.2.1.1 Durchführung der Beschichtung

Da das zur Beschichtung verwendete Detergenz Polypropylenglykol vom mittleren Molekulargewicht 4000 (PPG-4000) bei Raumtemperatur weitgehend wasserunlöslich ist, wurde zunächst Millipore®-Wasser in ausreichender Menge bei -20 °C gelagert, bis sich am Rand des Aufbewahrungsgefäßes bereits Eiskristalle gebildet hatten. Im Folgenden wurde eine 0.05 % (m/V) Lösung von PPG-4000 in eiskaltem Millipore®-Wasser hergestellt, wobei bis zum vollständigen Auflösen des Detergenz gelegentlich mit einem Glasstab umgerührt wurde und der Ansatz auf Eis gelagert wurde. Die weiteren Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) des Instituts vorgenommen.

Die vorbereiteten Reaktionsgefäße wurden zu ca. 80 % mit der vorbereiteten Detergenzlösung befüllt, am Mischrad befestigt und über Nacht für 14 h bei 10 Upm gleichmäßig beschichtet. Nach gründlichem Abgießen der Lösung wurde zweimal mit eiskaltem Millipore®-Wasser nachgespült und die beschichteten Reaktionsgefäße an der Luft getrocknet.

3.3 Durchführung der Löslichkeitsversuche

Zur Bestimmung der Löslichkeit wurden 200 µL der jeweiligen vorbereiteten Glucocorticoid-Suspension (siehe 1.1.3) in 3.8 mL vorgewärmtes PBS bzw. KNS pipettiert, kurz auf dem Vortex durchmischt und bei 31 °C (Wasserbad) unter leichtem Schütteln inkubiert. Um die nichtspezifische Bindung von Proteinen und Glucocorticoiden an die Materialien zu verhindern, wurde während der Inkubation und Lagerung ausschließlich mit Glasware (Duran®) gearbeitet, außerdem wurden für die folgenden Zentrifugationsschritte mit PPG-4000 beschichtete Reaktionsgefäße (siehe 2.2.1) verwendet. Um während der Zentrifugationsschritte eine konstante Temperatur zu gewährleisten und eine Ausfällung bereits gelösten Glucocorticoids zu

verhindern, wurde die Zentrifuge bei jedem Versuchsdurchgang mindestens 10 min auf 30 °C vorgewärmt. Nach 30 min bzw. 5 h wurden 1.5 mL des Ansatzes in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 15000 x *g* bei 30 °C abzentrifugiert. Mit 1.3 mL des erhaltenen Überstands wurde abermals eine Zentrifugation für 15 min bei 15000 x *g* (30 °C) durchgeführt. Anschließend wurden Proben von 1 mL entnommen und in 500 µL vorgelegtes MeOH überführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -40 °C gelagert.

Zur Vorbereitung der Kalibrierstandards und Leerproben (blank) wurden jeweils sieben Aliquots von PBS bzw. KNS mit einem Volumen von je 1 mL in 500 µL MeOH pipettiert. Jeweils sechs Aliquots PBS bzw. KNS wurden mit methanolischen Glucocorticoidverdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 400 ng/mL versetzt und zusammen mit den Leerproben bei -40 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.4 Probenaufarbeitung

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Proben aus den Löslichkeitsversuchen und die Kalibrierstandards mit jeweils 50 µL internem Standard (5 µg/mL Amcinonid) versetzt. Die Leerproben wurden mit 50 µL MeOH versetzt. Der Zugabe des ISD bzw. MeOH zu den Proben folgte ein kurzes Durchmischen auf dem Vortex. Anschließend wurde zweimal mit Diethylether extrahiert. Dabei wurden die Proben mit jeweils 3 mL Diethylether versetzt und 20 min am Mischrad angebracht. Zur besseren Phasentrennung wurde jeweils nach der Extraktion bei ca. 1000 x *g* für 3 min abzentrifugiert. Die Etherphasen beider Extraktionsschritte wurden vereinigt und unter einem leichten Stickstoffstrom bei 30 °C im Wasserbad bis zur Trockne abgedampft. Die Rückstände wurden jeweils in 100 µL MeOH aufgenommen und sofort zur Quantifizierung per HPLC verwendet.

3.5 Quantifizierung mittels HPLC

Die HPLC Bedingungen, die verwendeten HPLC Methoden sowie die Vorgehensweise bei der Auswertung sind dem vorangegangenen Kapitel (siehe 1.7) zu entnehmen. Das Injektionsvolumen betrug in diesem Falle jeweils 20 µL.

3.6 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Glucocorticoidkristallen in einer Mucindispersion

3.6.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Fertigarzneimittel	Wirkstoff	Sonstige Bestandteile	Hersteller
Flutide® Nasetten	Fluticason-propionat (FP)	Polysorbat 20, Sorbitanlaurat, Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, Aqua ad injectabilia	GlaxoSmith Kline

Die Herkunft und Beschreibung weiterer verwendeter Substanzen und Reagenzien sind vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.1, 2.1 bzw. 3.1) zu entnehmen.

3.6.2 Herstellung einer Mucindispersion

Um das Auflösungsverhalten von Glucocorticoidkristallen zu ermitteln, wurde eine Mucindispersion hergestellt. Im Vergleich zur Herstellung des KNS (siehe 3.1.3) wurde auf eine Aufreinigung durch Zentrifugation verzichtet, wodurch auch der Einfluss höhermolekularer Mucinproteine auf das Auflösungsverhalten erfasst werden konnte. Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an die von Lorin et al. ermittelte Zusammensetzung von menschlichem Nasensekret [118]. So wurden 150 mM NaCl, 41 mM KCl, 8.1 mM CaCl₂-H₂O und 7 mg/mL Mucin (Typ II) eingewogen, in einem entsprechenden Volumen Millipore®-Wasser gelöst bzw. dispergiert und anschließend für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Im Gegensatz zur Herstellung des KNS wurde auf die Zugabe von Albumin verzichtet, da sich diese Proteinkomponente bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme der Glucocorticoidkristalle als störend erwies und der benötigte Proteingehalt, der an Literaturwerte des physiologischen Nasensekrets angelehnt [118,130,204], durch die fehlende Aufreinigung durch Zentrifugation allein mittels Mucin (Typ II) erreicht werden konnte.

3.6.3 Verwendete Geräte und Materialien

Rasterelektronenmikroskop (REM)	DSM Zeiss 962 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Sputtersystem	SCD 005 für Platin/Palladium (Baltec, Witten, Deutschland)
Wärmeschrank	BE 400 (Mettler, Schwabach, Deutschland)
Objektträger	Mit Vertiefung, Kalk-Natron Glas, 15 x 1.5 mm (Durchmesser x Höhe der Vertiefung; K. Roth, Karlsruhe, Deutschland); zur Verwendung der Objektträger im REM wurden diese vom Glasbläser des Instituts durch Entfernen der unbenötigten Seitenflächen entsprechend zurechtgeschnitten.

3.6.4 Durchführung der Inkubation und Probenvorbereitung

Es wurden auf einem Objektträger 3 μL der Flutide[®] Nasetten-Suspension (entsprechen 3 μg Fluticasonpropionat) in 97 μL vorgelegte Mucindispersion pipettiert und für 5 min bzw. 16 h im Wärmeschrank bei 31 °C inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben mit einem Deckglas und einer entsprechenden Silikondichtung an den Rändern verschlossen, um eine Verdunstung der Dispersion zu vermeiden. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben unter einem leichten Stickstoffstrom bei Raumtemperatur (RT) bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurde dreimal mit 50 μL Millipore[®]-Wasser gewaschen und wiederum unter Stickstoffbegasung bei RT getrocknet. Zum Vergleich wurden 3 μL der Flutide[®] Nasetten-Suspension in 97 μL Millipore[®]-Wasser auf einem vertieften Objektträger dispergiert und unter leichter Stickstoffbegasung bei RT bis zur Trockne eingengt. Nach einmaligem Waschen mit 50 μL Millipore[®]-Wasser wurde nochmals unter leichtem Stickstoffstrom bei RT getrocknet.

3.6.5 Präparation der Proben (Sputtern)

Die trockenen Proben wurden auf der Unterseite des Objektträgers vorsichtig mit einem leitfähigen Klebeband versehen, auf einem Probentisch befestigt und mit Hilfe eines Standardträgerhalters in die Sputter Coating Anlage gestellt. Die Evakuierung des Probenraums

wurde mittels einer Rotationspumpe durchgeführt, wobei durch zweimaliges Spülen des Probenraums mit Argon der gewünschte Druck von 10^{-1} mbar schneller erreicht wurde. Anschließend wurden die Proben durch Aufdampfen einer dünnen Schicht aus Platin-Palladium elektrisch leitfähig gemacht. Nach Evakuierung der Proben kam es durch eine Hochspannung (25 mA) über 5 min zur Ionisierung der Argonatome in einem Plasma. Als Plasma wird ein Aggregatzustand bezeichnet, der im Allgemeinen Materie im neutralen und ionisierten Zustand enthält. Die Ionen schlugen ihrerseits Atome der Targetfolie (Kathode, Platin/Palladium) heraus, welche sich im gesamten Probenraum verteilten und eine ca. 30 nm dünne Platin-Palladium-Schicht auf dem Objekt (Anode) bildeten. Dieser Vorgang der Kathodenzerstäubung und Beschichtung des Objektes wird Sputtern genannt [207,208].

3.6.6 Durchführung

Das Objekt wurde in der evakuierten Probenkammer mit einem Elektronenstrahl, der durch eine Kondensorlinse fokussiert wurde, rasterförmig abgefahren. Die Beschleunigungsspannung betrug hierbei 15 kV. Der Kathodenheizstrom wurde eingeschaltet und der Emissionsstrom eingestellt. Durch Wechselwirkung der auftreffenden Elektronen (Primärelektronen) kam es lokal und abhängig vom Auftreffpunkt auf der Probenoberfläche zur Erzeugung von Signalen (Sekundärelektronen), die mit Hilfe eines Detektors die Information über die Oberflächenstruktur in einen entsprechenden Helligkeitswert am Bildschirm aufzeichneten. Der Arbeitsabstand wurde auf 6 mm eingestellt. Nach Einstellung der gewünschten Vergrößerung (9000x-20000x) wurde mit Hilfe des Fokussierdrehknopfes auf maximale Bildschärfe fokussiert. Nach Optimierung aller Einstellungen erfolgte die Bildaufnahme und Speicherung der gewünschten Abbildung mittels geeigneter Computersoftware [209].

4 Bindung intranasal angewendeter Glucocorticoide an humanes Nasengewebe

4.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) wurde von Gerbu (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Alle weiteren Anbieter verwendeter Substanzen sind den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.1, 2.1 bzw. 3.1) zu entnehmen.

4.1.1 Stammlösungen

- **Interner Standard**

Als interner Standard wurde Amcinonid verwendet. Die Herstellung, Konzentrationen sowie die Handhabung der Stammlösungen des internen Standards sind dem ersten Kapitel (siehe 1.1.1) zu entnehmen.

- **Kalibrierstandards**

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden für die jeweiligen Glucocorticoide Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Durch Verdünnung mit MeOH wurden für FF, FP, MF sowie für Bud und TCA Verdünnungen der Stammlösungen mit Konzentrationen zwischen 0.125 µg/mL und 8 µg/mL hergestellt. Die jeweiligen Kalibrierstandards wurden durch entsprechendes Zumischen der Verdünnungen zur Matrix erhalten. Alle Stammlösungen wurden bei -40 °C gelagert.

4.1.2 Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

NaCl	118 mM
KCl	4.48 mM
KH ₂ PO ₄	1.20 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1.18 mM
CaCl ₂ x H ₂ O	2.44 mM
HEPES	10 mM
Millipore®-Wasser	q.s.

Zur Herstellung des Krebs-Ringer-HEPES-Puffers (KRP-HEPES) wurden die entsprechenden Salze in der erforderlichen Menge in einen 1 L Maßkolben eingewogen, der zunächst mit Millipore®-Wasser auf ca. 900 mL aufgefüllt wurde. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 1 molarer Natriumhydroxid-Lösung auf den Wert 7.4 eingestellt und das Volumen mit Millipore®-Wasser auf 1 L ergänzt. Der hergestellte KRP-HEPES-Puffer wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2 Verwendete Geräte und Materialien

Erlenmeyerkolben 50 mL (Duran®)	Schott (Mainz, Deutschland); der Glasbläser des Instituts fertigte Erlenmeyerkolben mit Normschliff NS 14/23 an. Somit konnte der Verschluss der Erlenmeyergefäße mit Glasstopfen während der Gewebeeinkubationen gewährleistet werden.
Erlenmeyerkolben 10 mL (Duran®)	

Alle weiteren verwendeten Geräte sind in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.2, 2.2, bzw. 3.2) vermerkt.

4.2.1 Humanes Nasengewebe und Blutplasma

Humanes Nasengewebe wurde von Dr. Bachert von der Universitätsklinik Gent erhalten. Das Gewebe entstammt von insgesamt 30 Patienten, die sich einem chirurgischen Eingriff unterziehen mussten und ihr Einverständnis für die Verwendung der Gewebeproben zu Versuchszwecken gaben. Die Durchführung der Experimente mit menschlichem Nasengewebe wurde durch die Ethikkommission Ghent genehmigt. Keiner der Patienten wurde für einen Zeitraum von mindestens 3 Wochen vor dem chirurgischen Eingriff mit Glucocorticoiden behandelt. Ebenso ergab sich kein Hinweis auf eine chronisch-entzündliche Erkrankung in den Atemwegen der beteiligten Patienten. Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, auf Trockeneis zur Universität Würzburg transportiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Humanes Plasma wurde von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg erhalten. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung zu wissenschaftlichen Zwecken lag

auch hier vor. Das Blutplasma von drei gesunden Spendern wurde gepoolt, zu je 50 mL aliquotiert, anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.1.1 Vorbereitung des Nasengewebes

Das vorbereitete Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Gewebe wurde mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer zunächst weitestgehend blutfrei gewaschen. Als Unterlage wurde eine quadratische Glasplatte, die in einem Eisbad gelagert war, verwendet. Durch Zugreifen mit einer gebogenen Pinzette wurden die groben Gewebestücke fixiert und mit einem Skalpell in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten. Die geschnittenen Gewebewürfel wurden bis zur Überführung in ein Reagiergefäß und darauffolgendem Schockfrieren auf der gekühlten Glasplatte gelagert und durch Beträufeln mit KRP-HEPES-Puffer ständig feucht gehalten. Nach Bearbeitung des gesamten Gewebes wurde gepoolt, anschließend zu je 1.0 g aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das vorbereitete Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.3 Bindung intranasal angewendeter Glucocorticoide an humanes Nasengewebe

4.3.1 Durchführung

In der Vorbereitung des Versuches wurde zunächst Nasengewebe, Krebs-Ringer-HEPES-Puffer und Blutplasma bei Raumtemperatur aufgetaut. 1.0 g des zerschnittenen Gewebes wurden in 40 mL Krebs-Ringer-HEPES-Puffer suspendiert und kurz bis zur Äquilibration der Temperatur bei 37 °C (Wasserbad) gelagert. Danach wurde die Gewebesuspension mit 0.3 µg/mL des zu untersuchenden Glucocorticoids versetzt und 1 h bei 37 °C im Wasserbad unter Schüttelbewegungen inkubiert. Anschließend wurden Proben zu je 3 mL glucocorticoidhaltigem Puffer entnommen und zur Entfernung von Geweberesten für 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden Proben zu 2 mL erhalten und bis zur weiteren Analyse bei -40 °C gelagert. Abzentrifugierte Gewebereste wurden daraufhin im zurückbleibenden Puffer resuspendiert und wiederum zur übrigen Gewebesuspension überführt.

Um eine eventuell auftretende nichtspezifische Bindung der lipophilen Glucocorticoide an Glasmaterialien zu kontrollieren, wurden die verwendeten Glasgeräte mit

glucocorticoidhaltigem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (40 mL; 0.3 µg/mL), jedoch ohne Gewebe, versetzt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden ebenfalls 3 ml Puffer entnommen, für 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert und aus dem Überstand eine Probe zu 2 mL gewonnen, die zur Analyse der nichtspezifischen Bindung an die Glasmaterialien herangezogen wurde.

Zur Vorbereitung der Kalibrierstandards und Leerproben (blank) wurden sieben Aliquots mit jeweils 2 mL des Krebs-Ringer-HEPES-Puffers in Reagenzgläser abgefüllt. Sechs Aliquots wurden mit Glucocorticoidverdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 400 ng/mL versetzt und zusammen mit den Leerproben bei -40 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

4.4 Freisetzung der Glucocorticoide aus der Gewebefindung in Gegenwart von humanem Plasma

4.4.1 Durchführung

Das in 3.3.1 beschriebene mit Glucocorticoid gesättigte Gewebe wurde abfiltriert (Filterpapier MN 615, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), zweimal mit je 2 mL Krebs-Ringer-HEPES-Puffer gewaschen und anschließend in 10 mL Humanplasma (37 °C) überführt. Die so erhaltene Gewebeplasmasuspension wurde bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Nach 10, 20, 30, 45 und 60 min wurde 1 mL Plasma entnommen und jeweils durch frisches, vorgewärmtes Plasma (37 °C) ersetzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -40 °C gelagert.

Nach der einstündigen Inkubation wurde die Gewebesuspension für weitere 6 h mit humanem Plasma bei 37 °C gewaschen und anschließend die humanen Spezimen (Nasengewebe, Humanplasma) bis zur weiteren Verwendung (siehe *Kapitel 5*) bei -80 °C gelagert.

Zur Vorbereitung der Kalibrierstandards und Leerproben (blank) wurden sieben Aliquots mit jeweils 1 mL des Humanplasmas in Reagenzgläser abgefüllt. Sechs Aliquots wurden mit Glucocorticoidverdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 400 ng/mL versetzt und zusammen mit den Leerproben bei -40 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

4.5 Probenaufarbeitung

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Puffer- bzw. Plasmaproben aus den Bindungs- und Freisetzungsvorsuchen und die Kalibrierstandards mit jeweils 50 µL internem

Standard (5 µg/mL Amcinonid) versetzt. Die Leerproben wurden mit 50 µL MeOH versetzt. Der Zugabe des ISD bzw. des MeOH zu den Proben folgte ein kurzes Durchmischen auf dem Vortex.

In der Folge wurde zweimal mit Diethylether extrahiert. Dabei wurden die Proben mit jeweils 3 mL Diethylether versetzt und 20 min am Mischrad angebracht. Zur besseren Phasentrennung wurde jeweils nach der Extraktion bei ca. 1000 x *g* für 3 min abzentrifugiert. Die Etherphasen beider Extraktionsschritte wurden vereinigt und unter einem leichten Stickstoffstrom bei 30 °C im Wasserbad bis zur Trockne abgedampft. Die Rückstände wurden jeweils in 100 µL MeOH (für Bud und TCA) bzw. in 200 µL MeOH (für FF, FP und MF) aufgenommen und sofort zur Quantifizierung per HPLC verwendet.

4.6 Quantifizierung mittels HPLC

Die HPLC Bedingungen, die verwendeten HPLC Methoden sowie die Vorgehensweise bei der Auswertung sind dem ersten Kapitel (siehe 1.7) zu entnehmen. Das Injektionsvolumen der unterschiedlichen methanolischen Proben betrug jeweils 20 µL.

5 Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch gewebegebundene intranasale Glucocorticoide

5.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien für die Zellkultur

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM, 3.7 g/L NaHCO₃, 4.5 g/L D-Glucose), fötales Bovines Serum (FBS), Penicillin/Streptomycin (Penstrep, 10000 U/mL / 10000 µg/mL), L-Glutamin (Glut, Konzentrat 200 mM), nicht essentielle Aminosäuren (NEA, Konzentrat 100 mM), isotonischer Phosphatpuffer (PBS-Pulver, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM), Trypsin/EDTA (0.05/0.02 % in PBS ohne Calcium und Magnesium) und Trypanblau (0.5 % in physiologischer Kochsalzlösung) wurden von Biochrom AG (Berlin, Deutschland) bezogen, Lipopolysaccharid (LPS, rough strains, von Salmonella minnesota RE 595) wurde von Sigma-Aldrich-Chemie (Taufkirchen, Deutschland) erworben, Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Anbieter aller anderen verwendeten Reagenzien sind in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.1, 2.1, 3.1 bzw. 4.1) beschrieben.

5.1.1 Zusammensetzung des Zellkulturmediums für A549

Das Zellkulturmedium für A549 bestand aus DMEM, mit 10 % FBS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM NEA. Die Zusätze (FBS, Penstrep, Glut, NEA) wurden erst kurz vor Verwendung des Mediums hinzugegeben. Das fertige Medium wurde bei 4 °C gelagert.

5.1.2 Stimulation der Zellen

Es wurde eine Stammlösung LPS in Zellkulturmedium hergestellt. Zur Stimulation der Zellen wurde LPS in einer Konzentration von 50 µg/mL verwendet.

5.2 Verwendete Geräte und Materialien

Dampfsterilisator Vakulab S 3000	MMM GmbH (Planegg, Deutschland)
Deckgläser Cover Glass 18x18	VWR (Darmstadt, Deutschland)
ELISA-Reader Multiscan Ascent	Thermo (Vantaa, Finnland)
ELISA-Washer MultiWash Advantage	TriContinent (Suffolk, UK)
Hera Cell Inkubator	Kendro (Hanau, Deutschland)
Inversmikroskop Eclipse TS 100	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
Reaktionsgefäß Eppendorf Cap 1.5 mL	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
6-well Millicell® hängende Zellkultureinsätze, Porengröße 8 µm, Polyethylenterephthalat	Millipore (Bedford, USA)
Serologische Pipetten (10 mL; 25 mL)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterilbank Laminar Air Flow, Typ UVF 6.07	BDK (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Zählkammer Neubauer Improved	Superior (Marienfeld, Deutschland)
Zellkulturplatten 6-well Primaria Falcon, (für Gewebeinkubationsversuche)	Becton Dickinson (New Jersey, USA)
Zellkulturplatten 6-well (für Plasma- inkubationsversuche)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturflaschen 75 cm ³	Nunc (Roskilde, Dänemark)

Alle weiteren verwendeten Geräte sind in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.2, 2.2, 3.2, bzw. 4.2) vermerkt.

5.2.1 Humanes Nasengewebe und Blutplasma

Zur Ermittlung der pharmakologischen Aktivität intranasaler Glucocorticoide wurden die humanen Spezimen nach der Gewebefreisetzung in Humanplasma aus Kapitel 4.2 verwendet. Nach 7 h Freisetzung der Glucocorticoide aus dem Nasengewebe in Humanplasma wurden die humanen Spezimen (Nasengewebe, Humanplasma) bei -80 °C gelagert.

Die Gewebeproben wurden vom Plasma durch Zentrifugation getrennt und einer

Dampfsterilisation (Dampfsterilisator Vakulab S 3000) unterworfen. Hierzu wurde ein fest eingestelltes Betriebsprogramm nach dem Vorvakuumverfahren zur Dampfsterilisation bei 121 °C (2 bar, 15 min) mit nachfolgender beschleunigter Kühlung des Sterilisiergutes auf weniger als 80 °C durch Druckluft-Stützdruck mit gleichzeitiger Kaltwasser-Mantelkühlung verwendet. Danach wurden die Gewebeprobe in den locker verschlossenen Behältnissen fest verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Humanplasmaproben nach siebenstündiger Freisetzung wurden keiner Sterilisation unterworfen und ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.3 Kultivierung von A549

5.3.1 Humane Lungenepithelzellen A549

Die humane Lungenkarzinom-Zelllinie A549 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) erworben. Es handelte sich dabei um Alveolar-Typ II Zellen eines Adenokarzinoms. Die Zellen wurden als gefrorene Kultur geliefert.

5.3.2 Erste Kultivierung von A549

Die Zelllinie A549 wurde als gefrorene Kultur in DMEM mit 20 % FBS und 10 % DMSO in einer Dichte von ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen pro Ampulle geliefert. Zur ersten Kultivierung der Zellen wurde eine Zellkulturflasche mit 30 mL warmem Zellkulturmedium (37 °C) vorbereitet. Vor dem möglichst raschen Auftauprozess der gefrorenen Zellen wurde der Rand des Kryoröhrchens mit Ethanol (70 %) dekontaminiert, zum Entlüften so weit wie nötig geöffnet und anschließend sofort wieder fest verschlossen. Die Zellen wurden nun in einem vorbereiteten Wasserbad (37 °C) solange geschwenkt, bis die Zellsuspension gerade aufgetaut war. Nun wurde abermals der Rand des Kryoröhrchens mit Ethanol (70 %) dekontaminiert und der Inhalt Kryoröhrchens in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt. Zur Entfernung des Frostschutzmittels (DMSO) wurde ein erster Mediumwechsel nach 24 h vorgenommen.

5.3.3 Mediumwechsel und Passagieren von A549

Die Kultivierung von A549 erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen. Ein Mediumwechsel erfolgte

Montag, Mittwoch und Freitag. Zum Passagieren der Zellen wurde nach Entfernen des Mediums der konfluente Monolayer kurz mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 4 mL Trypsin/EDTA wurde für 4 min bei 37 °C inkubiert, ehe durch Zugabe von Zellkulturmedium die Enzymwirkung gestoppt wurde und ein Passagieren in mit warmem Medium vorbereitete Zellkulturflaschen stattfinden konnte. Die Zellen wurden alle 4-7 Tage im Verhältnis 1:7-1:10 geteilt.

5.3.4 Aussäen von A549 für Inkubationsversuche

Zum Aussäen der Zellen für die Inkubationsversuche in 6-well Platten wurden konfluente Monolayer der Zellkulturflaschen zunächst mit ca. 3 mL Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C trypsinisiert, in ausreichend Medium aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen (50 mL) überführt. Anschließend wurde bei 1100 x g bei 20 °C für 4 min abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes erfolgte ein vorsichtiges Resuspendieren der Zellen in 10 mL Zellkulturmedium, bis eine homogene Zellsuspension erhalten wurde.

Um für das Aussäen der Zellen gleiche Kultivierungsbedingungen gewährleisten zu können, wurde eine Zellzahlbestimmung vorgenommen. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer). Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblaulösung gemischt, kurz stehengelassen und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der intakte Cytoplasmamembranen nicht passieren kann und somit nur tote Zellen anfärbt.

Die **Berechnung der Zellzahl pro mL Medium** erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl / mL} = \frac{\text{Gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (kammerspezifischer Faktor)}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}}$$

Nach erfolgter Zellzahlbestimmung wurde je nach Zelldichte ein entsprechendes Volumen der Zellsuspension mit frischem Medium homogen gemischt, um die gewünschte Aussaatdichte zu erreichen. Die Aussaatdichte in den verwendeten 6-well Platten betrug 2×10^5 Zellen pro 3 mL Zellkulturmedium. Diese Vorgehensweise gewährleistete identische Ausgangsbedingungen für die Zellexperimente. Bei der gewählten Aussaatdichte war der Zellmonolayer nach ca. 36 h subkonfluent.

5.4 Inkubation von A549 mit humanen Spezimen

5.4.1 Inkubation mit Humanplasma

Nachdem die Zellen subkonfluent gewachsen waren, wurde das Medium vollständig abgenommen und der Monolayer mit 3 ml Zellkulturmedium einer 1:100 Verdünnung der Plasmaproben (siehe 5.2.1) für 3 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um eine identische Matrix für die Kontrollen zu gewährleisten, wurde Humanplasma derselben Charge verwendet, welches für 7 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert wurde. Auch bei den Kontrollproben erfolgte eine Inkubation mit einer 1:100 Verdünnung des Kontrollplasmas in 3 mL Zellkulturmedium für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Um eine vergleichbare Behandlung aller Proben zu gewährleisten, wurden alle Versuchsansätze mit Plasmaproben parallel angesetzt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Stimulanz (50 µg/mL LPS in Zellkulturmedium) über 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ zur Produktion von IL-8 angeregt. Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes wurde bei 1000 x g für 10 min bei 20 °C zur Entfernung von Zellbruchstücken und Stimulanz zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

5.4.2 Inkubation mit nasalen Gewebeproben

Zur Inkubation von A549 mit den zuvor sterilisierten Gewebeproben aus den Freisetzungsversuchen (siehe Experimenteller Teil C, 5.2.1) wurden hängende Zellkultureinsätze (Millicell[®], 8 µm Porengröße, Polyethylenterephthalat) verwendet. Bereits nach dem Aussäen der Zellen wurden die Einsätze eingesetzt und mit 3 ml Zellkulturmedium bedeckt. Nach Subkonfluenz des Monolayers wurde das gesamte Medium abgenommen und die Zellen mit 3 mL frischem Medium versetzt. Anschließend erfolgte das Resuspendieren der Gewebeproben in 3 mL Zellkulturmedium und das Überführen der Gewebesuspension in die Zellkultureinsätze. Bei der Kontrolle wurde 3 mL Medium in das apikale Kompartiment gegeben. Gewebeproben und Kontrollproben wurden für 8 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um eine vergleichbare Behandlung aller Proben zu gewährleisten, wurden alle Versuchsansätze mit Gewebeproben parallel angesetzt. Danach wurden die Zellkultureinsätze mit dem Gewebe vorsichtig abgenommen und dem Zellkulturüberstand 2 mL Medium entnommen, um durch die folgende Stimulation eine Aufkonzentrierung mit IL-8 zu erreichen. Die Stimulation der Zellen wurde mit 50 µg/mL LPS in Zellkulturmedium über 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes

wurde bei 1000 x g für 10 min bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

5.5 Zellzahlbestimmung nach Beendigung des Versuches

Nach Beendigung der Experimente diente die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen der Gewährleistung identischer Kultivierungsbedingungen. Nach der Probennahme in Form des Zellkulturüberstandes wurden das restliche Medium komplett abgenommen und der Monolayer mit 1 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 8 min mit Trypsin/EDTA versetzt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Weiter wurde durch Zugabe von 2 mL serumhaltigen Zellkulturmedium die Enzymwirkung inaktiviert und durch häufiges Auf- und Abpipettieren ein quantitatives Ablösen der Zellen erreicht. Die homogene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) überführt. Zur Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Nach kurzem Durchmischen der Zellsuspension auf dem Vortex wurde im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblaulösung gemischt, kurz stehen gelassen und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Die Berechnung der Zellzahl ist dem Abschnitt 5.3.4. zu entnehmen.

5.6 Quantitative Bestimmung der IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA

5.6.1 Prinzip der Bestimmung

Es wurde der Quantikine[®] Human CXCL8/IL-8 Immunoassay von R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstedt) verwendet (Lagerung 4 °C). Der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) basierte auf der Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Es handelt sich dabei um ein quantitatives immunologisches Nachweisverfahren, welches mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion humanes IL-8 aus Zellkulturüberständen, Serum- oder Plasmaproben bestimmt.

5.6.2 Vorbereitung der Reagenzien

Vor Beginn der Durchführung der IL-8 Bestimmung wurden alle dem Kit beigefügten Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Zur Herstellung des Waschpuffers wurde das

Waschpufferkonzentrat 1:25 mit Millipore®-Wasser verdünnt. Zur Verdünnung von Zellkulturüberständen und zur Herstellung der Kalibrierstandards wurde der Calibrator Diluent RD5P Konzentrat 1:5 mit Millipore®-Wasser gemischt (Calibrator Diluent RD5P 1X). Die Substratlösung für den Enzymumsatz wurde erst kurz vor dem Gebrauch durch Mischen gleicher Anteile an Farbreagenz A (Wasserstoffperoxid) und B (Tetramethylbenzidin) hergestellt. Um während der Verwendung den benötigten Lichtschutz für die Substratlösung sicherzustellen, wurde die Substratlösung in einem Probengefäß aus Braunglas (10 mL) aufbewahrt.

5.6.3 Herstellung der Kalibrierstandards

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurde zunächst der lyophilisierte IL-8-Standard in 5.0 mL Calibrator Diluent RD5P (1X) gelöst. Dies ergab eine Stammlösung von 2000 pg/mL. Die weiteren Kalibrierstandards wurden durch Verdünnen der Stammlösung mit Calibrator Diluent RD5P (1X) hergestellt. Dies führte zu Standardlösungen in den Konzentrationen 1000 pg/mL, 500 pg/ml, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL und 31.25 pg/mL. Als Leerwertkontrolle (0 pg/mL) diente der Calibrator Diluent RD5P (1X).

5.6.4 Durchführung der IL-8 Bestimmung

Während der Vorbereitung aller Reagenzien und Kalibrierstandards wurden die Proben der Zellkulturversuche bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Zugabe von 100 µL Assay Diluent RD1-85 in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte folgte das Hinzufügen von 50 µL Probe, Kalibrierstandard, bzw. Kontrolle.

IL-8 der Proben und Standards wurde von einem spezifischen Antikörper, der auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert war, gebunden. Anschließend wurden die *wells* mit einem selbstklebenden Streifen luftdicht verschlossen, durch vorsichtiges Klopfen der Platte durchmischt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Mit einem gründlichen Waschvorgang durch viermaliges Spülen mit 250 µL Waschpuffer (ELISA-Washer MultiWash Advantage) wurde die Probenflüssigkeit entfernt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Mikrotiterplatte umgedreht und Flüssigkeitsreste in den *wells* durch kurzes Abklopfen auf Papiertücher beseitigt.

Anschließend wurden jeweils 100 µL IL-8 Konjugat (polyklonaler Antikörper gegen IL-8 konjugiert mit *horseradish peroxidase*) zugesetzt, wodurch ein spezifischer Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex gebildet wurde. Nach Abdichten der Vertiefungen mit Klebestreifen folgte

wiederum eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nun wurde ein weiterer Waschschrift mit viermaligem Spülen mit jeweils 250 μL Waschpuffer durchgeführt, um überschüssiges ungebundenes IL-8 Konjugat zu entfernen.

Im letzten Schritt wurden in jedes *well* 200 μL Substratlösung gegeben und für 30 min vor Licht geschützt aufbewahrt. Es kam zu einer Farbentwicklung proportional zur Konzentration an gebundenem IL-8. Nach Zusatz von 50 μL Stopplösung (2N Schwefelsäure) wurde die enzymatische Reaktion beendet. Ein Farbumschlag von gelb nach blau war festzustellen. Ein Mischen der Farblösung durch vorsichtiges Klopfen der Mikroplatte führte schließlich zu einer homogenen Färbung. Direkt im Anschluss wurde die Absorption der einzelnen Proben bei 450 nm mit Hilfe des ELISA-Reader Multiskan Ascent bestimmt. Die Messung der Absorption bei 600 nm diente zur Korrektur der optischen Fehler der Vertiefungen der Mikroplatte.

5.6.5 Auswertung der IL-8 Bestimmung

Zur Ermittlung einer Kalibriergeraden wurden die ermittelten Absorptionswerte der unterschiedlichen Kalibrierstandards (31.25 pg/mL-1000 pg/mL) verwendet und mittels Regressionsanalyse der Korrelationskoeffizient bestimmt (Beispiel siehe *Abbildung 35*). Für jedes Experiment (Plasmaproben, Gewebeproben) wurde eine eigene Kalibrierung vorgenommen. Aus den ermittelten Absorptionen der Proben konnten daraus die jeweiligen IL-8 Konzentrationen bestimmt werden.

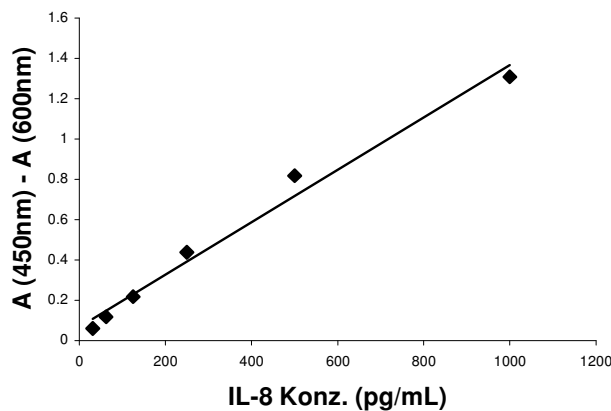


Abbildung 35: Beispielhafte Darstellung einer Kalibriergeraden von IL-8; Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.9838$

5.7 Bestimmung der nichtspezifischen Bindung der Glucocorticoide an Zellkulturmaterialien

5.7.1 Durchführung

Zur Ermittlung der nichtspezifischen Bindung der Glucocorticoide an die hängenden Zellkultureinsätze und Zellkulturmaterialien bzw. der Stabilität der Glucocorticoide in Zellkulturmedium wurden Standardlösungen der jeweiligen Substanzen in Zellkulturmedium (80 ng/mL Bud, FP, FF, MF, und TCA) hergestellt und für 8 h bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die Zellkultureinsätze abgenommen, 2.0 mL Probe entnommen und bis zur weiteren Analyse bei -40 °C gelagert.

Zur Vorbereitung der Kalibrierstandards und Leerproben wurden jeweils sieben Aliquots von Zellkulturmedium mit einem Volumen von je 2 mL hergestellt. Jeweils sechs Aliquots Medium wurden mit methanolischen Glucocorticoidverdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 600 ng/mL versetzt und zusammen mit den Leerproben bei -40 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

5.7.2 Probenaufarbeitung

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Proben zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung und die Kalibrierstandards mit jeweils 50 µL internem Standard (5 µg/mL Amcinonid) versetzt. Die Leerproben wurden mit 50 µL MeOH versetzt. Der Zugabe des ISD bzw. des MeOH zu den Proben folgte ein kurzes Durchmischen auf dem Vortex.

Anschließend wurde zweimal mit Diethylether extrahiert. Dabei wurden die Proben mit jeweils 3 mL Diethylether versetzt und 20 min an dem Mischrad angebracht. Zur besseren Phasentrennung wurde jeweils nach der Extraktion bei ca. 1000 x g für 3 min abzentrifugiert. Die Etherphasen beider Extraktionsschritte wurden vereinigt und unter einem leichten Stickstoffstrom bei 30 °C im Wasserbad bis zur Trockne abgedampft. Die Rückstände wurden jeweils in 100 µL MeOH aufgenommen und sofort zur Quantifizierung per HPLC verwendet.

5.7.3 Quantifizierung mittels HPLC

Die HPLC Bedingungen, die verwendeten HPLC Methoden sowie die Vorgehensweise bei der Auswertung sind dem ersten Kapitel (siehe 1.6) zu entnehmen. Das Injektionsvolumen der methanolischen Proben betrug jeweils 20 µL.

6 Modell zur intranasalen Pharmakokinetik topisch applizierter Wirkstoffe

6.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Azelastin-HCl wurde von Sigma Aldrich (Taufkirchen) erworben. Kollagen Typ I-Hydrogel und eine entsprechende Gelneutralisationslösung wurde freundlicherweise von der Firma Amedrix (Esslingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Rotiphorese 30 Gel (gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37.5:1), TRIS (Pufferan[®], ≥ 99.9 %, p.a. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris), TRIS-hydrochlorid (Pufferan[®], ≥ 99 %, p. a. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Tris-HCl), ROTI[®] Stock 20 % SDS (20 % Stocklösung Natrium-dodecylsulfat, SDS), Ammoniumperoxodisulfat (≥ 98 %, p.a., APS) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan; 99 %, p.a.) wurden von Roth (Karlsruhe) bezogen, Anbieter aller anderen verwendeten Reagenzien sind in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.1, 2.1, 3.1, 4.1 bzw. 5.1) beschrieben.

6.1.1 Nasale Arzneiformen der Experimente

Flutide[®] Nasal Nasenspray (Suspension)	Fluticason-propionat (FP)	Carmellose-Natrium, mikrokristalline Cellulose, Glucose, Polysorbat 80, 2-Phenylethanol, Benzalkoniumchlorid, Aqua purif.	GlaxoSmith Kline
Budes[®] Nasenspray (Suspension)	Budesonid (Bud)	Carmellose-Natrium, mikrokristalline Cellulose, Glucose, Polysorbat 80, Natriumedetat, Kaliumsorbat, HCl, Aqua purif.	Hexal
Vividrin[®] akut Nasenspray (Lösung)	Azelastin-HCl (AZ-HCl)	Natriumedetat, Hypromellose, Natriummonohydrogenphosphat, Citronensäure, NaCl, Aqua purif.	Mann Pharma

6.1.2 Reagenzien zur Herstellung des Polyacrylamidgels

- **Trenngelpuffer**

Tris-Base	0.85 M
Tris-HCl	0.15 M
Millipore®-Wasser	q.s.

Zur Herstellung des Trenngelpuffers wurden die entsprechenden Salze in der erforderlichen Menge in einen 1 L Maßkolben eingewogen, der zunächst mit Millipore®-Wasser auf ca. 900 mL aufgefüllt wurde. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung auf den Wert 8.8 eingestellt und das Volumen mit Millipore®-Wasser auf 1 L ergänzt. Für die Experimente mit Azelastin-HCl wurde der pH Wert auf 7.4 eingestellt und das Volumen mit Millipore®-Wasser auf 1 L ergänzt. Der hergestellte Puffer wurde bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

- **10 % Sodiumdodecylsulfat-Lösung (SDS-Lsg.)**

Die 20 % Stocklösung wurde 1:2 mit Millipore®-Wasser verdünnt. Die hergestellte Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

- **10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS-Lsg.)**

Zur Herstellung der 10 % APS-Lsg. wurden 0.2 g Feststoff in einen 2 mL Maßkolben eingewogen, mit Millipore®-Wasser gelöst und schließlich mit dem Lösungsmittel auf 2 mL ergänzt. Die hergestellte Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

6.1.3 Stammlösungen

- **Interner Standard**

Als interner Standard für die Analyse der Plasmaproben wurde Amcinonid verwendet. Die Herstellung, Konzentrationen sowie die Handhabung der Stammlösungen des internen Standards sind dem ersten Kapitel (siehe 1.1.1) zu entnehmen. Als interner Standard für die Azelastinproben diente Dimetindenmaleat. Hierbei wurde zunächst eine methanolische Stammlösung hergestellt, die Dimetindenmaleat in einer Konzentration von 1 mg/mL enthielt. Diese Stammlösung wurde weiter mit MeOH bis zu einer Konzentration von 5 µg/mL verdünnt.

Die Zugabe des internen Standards erfolgte durch entsprechendes Zumischen zur Matrix der Kalibrierstandards und Proben.

- **Kalibrierstandards**

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden für die jeweiligen Glucocorticoide bzw. für AZ-HCl Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Durch Verdünnung mit MeOH wurden für FP, Bud und AZ-HCl Verdünnungen der Stammlösungen mit Konzentrationen zwischen 0.250 µg/mL und 5 µg/mL hergestellt. Die jeweiligen Kalibrierstandards wurden durch entsprechendes Zumischen der Verdünnungen zur jeweiligen Matrix erhalten. Alle Stammlösungen wurden bei -40 °C gelagert.

6.1.4 Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

Die Herstellung des Krebs-Ringer-HEPES-Puffers (KRP-HEPES) ist Kapitel 4.1.2 zu entnehmen. Der hergestellte KRP-HEPES-Puffer wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -40 °C gelagert.

6.1.5 Isotonischer Phosphat-Puffer mit pH 7.4

Der verwendete isotonische Phosphat-Puffer wurde hergestellt aus den jeweiligen Feststoffen, durch entsprechende Einwaage. Durch Auflösen der Substanzen in Millipore®-Wasser wurden folgende Konzentrationen erreicht:

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
Millipore®-Wasser	q.s.

Durch 1N NaOH wurde der pH-Wert auf 7.4 eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurde der vorbereitete Puffer aliquotiert und bei -40 °C gelagert.

6.1.6 Künstliches Nasensekret (KNS)

Die Herstellung, Vorbereitung und Spezifizierung des künstlichen Nasensekrets (KNS) sind dem Kapitel 3.1.3 bzw. 3.1.4 zu entnehmen.

6.1.7 Humanes Lungengewebe, Blutplasma, Erythrozytenkonzentrat

Humanes Lungengewebe wurde von Dr. Kardziej vom Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken (Münnerstadt) erhalten. Das Gewebe entstammte von 5 Patienten, die sich einer Segmentektomie bzw. Lobektomie unterziehen mussten und ihr Einverständnis für die Verwendung der Gewebeproben zu Versuchszwecken gaben. Die Durchführung der Experimente mit menschlichem Lungengewebe wurde durch die Ethikkommission Würzburg genehmigt. Keiner der Patienten hat für einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen vor dem chirurgischen Eingriff Glucocorticoide eingenommen oder inhaliert. Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Gewebe in einer isotonen Kochsalzlösung gewaschen, auf Trockeneis zur Universität Würzburg transportiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Humanes Plasma und Erythrozytenkonzentrat wurden von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg erhalten. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung zu wissenschaftlichen Zwecken lag auch hier vor. Das Blutplasma von drei gesunden Spendern wurde gepoolt, zu je 50 mL aliquotiert, anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -40 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das Erythrozytenkonzentrat wurde aliquotiert und bei 6 °C gelagert.

6.1.7.1 Einstellung des Hämatokritwertes

Zur Ermittlung des Hämatokritwertes wurde 1 mL des Erythrozytenkonzentrates bei 6 °C und 10000 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend das Volumen des Überstandes bestimmt. Anschließend wurde die Probe verworfen. Mit Hilfe dieser Methode konnte ein physiologischer Hämatokritwert (Zielwert: 40 %) durch entsprechendes Zumischen an Humanplasma zum Erythrozytenkonzentrat eingestellt werden. Diese Mischung wird im Folgenden als Plasma-Erythrozyten-Mischung bezeichnet.

6.1.7.2 Vorbereitung des Lungengewebes

Das Gewebe wurde mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer zunächst weitestgehend blutfrei gewaschen. Als Unterlage wurde eine quadratische Glasplatte, die in einem Eisbad befestigt war, verwendet. Durch Zugreifen mit einer gebogenen Pinzette wurden die groben Gewebestücke fixiert und mit einem Skalpell in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten. Die geschnittenen Gewebewürfel wurden bis zur Überführung in ein Reagiergefäß und darauffolgendem Schockfrieren auf der gekühlten Glasplatte gelagert und durch Beträufeln mit KRP-HEPES-Puffer ständig feucht gehalten. Nach Bearbeitung des gesamten Gewebes wurde dieses gepoolt, anschließend zu je 0.5 g aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das vorbereitete Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

6.2 Verwendete Geräte und Materialien

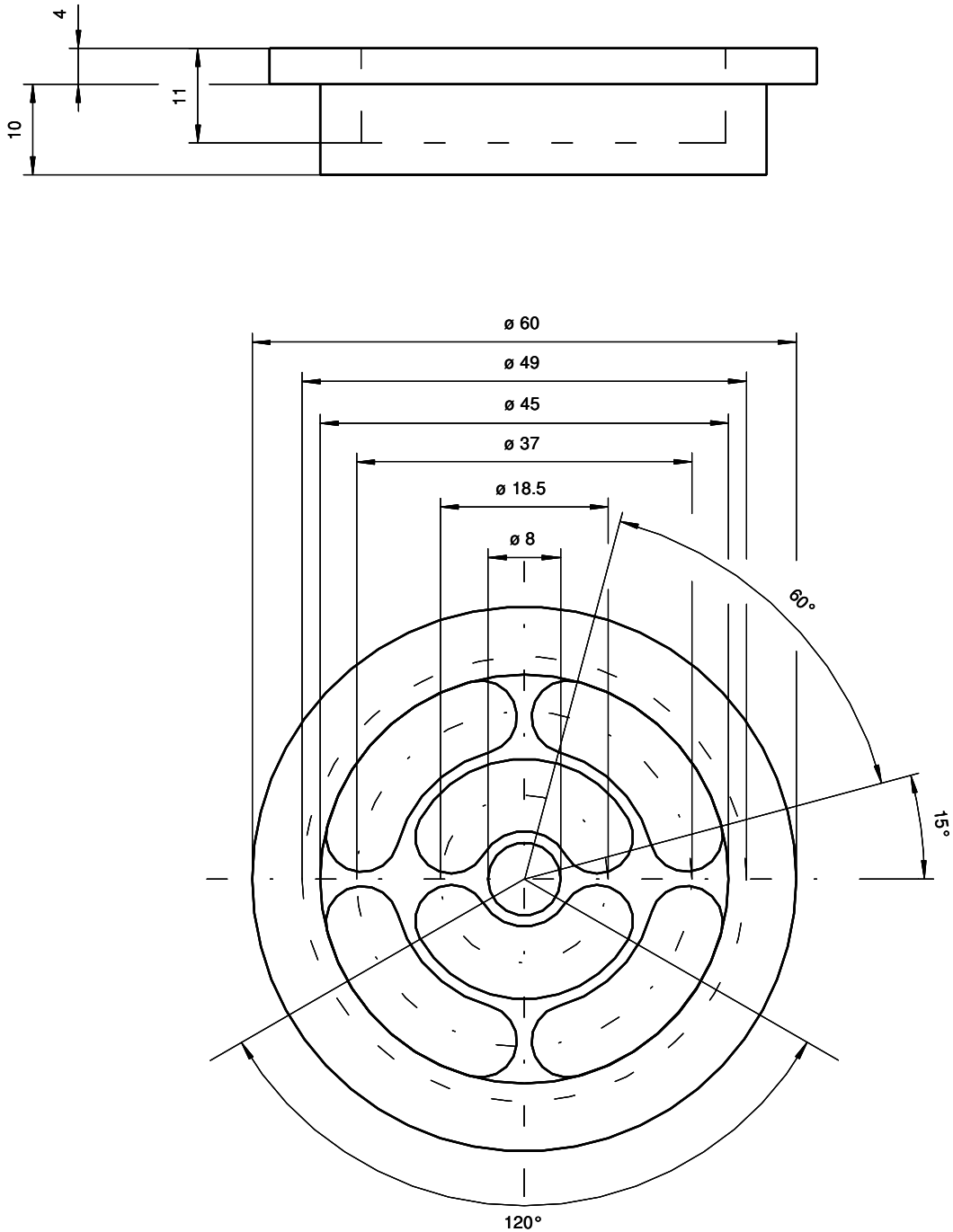
Einmalskalpelle	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Petrischale, 40 x 12 mm, Glas	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß Eppendorf Cap 2.0 mL	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Wägeglast, 30 x 50 mm (30 mL) mit Normschliffdeckel	Chemikalienausgabe (Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Würzburg)
Mikro-Doppelspatel, löffelförmig gebogen, Länge 130 mm, Löffelmaße: 10 x 5 mm	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Deckglaspinzette, abgewinkelt, Länge 130 mm	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
HPLC-Vial, 8 x 40 mm, 1mL	YMC (Dinslaken, Deutschland)
Transferpette [®] electronic, 0.1-5 mL	Brand (Wertheim, Deutschland)
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph Instr. (Schwabach, Deutschland)
Mini-Wippschüttler (Mini-Rocker), Geschwindigkeitsbereich: 7.5-30 min ⁻¹ , stufenlos regelbar	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Hera Cell Inkubator, Brutschrank	Kendro (Hanau, Deutschland)
Wärmeschrank Modell 400	Memmert (Schwabach, Deutschland)

Microfuge® 22R Centrifuge,	Beckman Coulter (Californien, USA)
Eppendorf Centrifuge 5702	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Alle weiteren verwendeten Geräte sind in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.2, 2.2, 3.2, 4.2 bzw. 5.2) vermerkt.

6.2.1 Waschvorrichtung zur Gelwaschung

Zusammen mit der institutseigenen Werkstatt wurde eine Waschvorrichtung zum Waschen der Ober- und Unterseite der Gele entwickelt. Ziel dabei war es, eine möglichst geringe Auflagefläche des Gels auf der Waschvorrichtung zu verwirklichen, um die quantitative Erfassung des nichtgebundenen Arzneistoffanteils zu erreichen, aber dennoch eine genügende Stabilität des Waschvorgangs zu ermöglichen. Als Werkstoff für die Konstruktion wurde Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon) verwendet, um eine mögliche Adsorption der lipophilen Arzneistoffe an die Waschvorrichtung zu vermeiden (siehe *Abbildung 36*).



Copyright © Prof. Högger
Würzburg

Abbildung 36: Technische Zeichnung der Waschvorrichtung aus Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon) nach DIN ISO 2768f (Christoph Kessler)

6.3 Vorbereitungen zur Versuchsdurchführung

6.3.1 Herstellung von Kollagen-Gelen mit/ohne Gewebe

Die Herstellung von Kollagen-Gelen mit Gewebe sollte dazu dienen das geschnittene Gewebe in eine physiologische Matrix einzubetten. Ein Kollagen-Gel ohne Gewebe wurde als Vergleichsgel hergestellt. Um ein für die Versuche möglichst stabiles Gel zu erhalten, den Gehalt an Kollagen im Gel aber möglichst gering zu halten, wurden verschiedene Gele mit unterschiedlichem Kollagenanteil hergestellt.

- **2:1 Kollagen-Gelzusammensetzung:**

Millipore®-Wasser	1.0 mL
Gelneutralisationslösung	0.5 mL
Kollagen	3 mL

- **3:1 Kollagen-Gelzusammensetzung:**

Millipore®-Wasser	0.5 mL
Gelneutralisationslösung	0.5 mL
Kollagen	3 mL

- **4:1 Kollagen-Gelzusammensetzung:**

Millipore®-Wasser	0.4 mL
Gelneutralisationslösung	0.4 mL
Kollagen	3.2 mL

Das Kollagen wurde zunächst über Nacht schonend im Kühlschrank aufgetaut. Zur Durchmischung des Kollagens wurde das Vorratgefäß (50 mL Reagenz- und Zentrifugenröhre) mehrfach kräftig geschüttelt und zur Entfernung der entstandenen Luftblasen bei 1000 x g für 10 min (5 °C) zentrifugiert. Bis zur Gelherstellung wurde das so vorbereitete Kollagen-Hydrogel im Kühlschrank aufbewahrt. Nachdem das Kollagen einmal aufgefroren war, wurde ein abermaliges Einfrieren vermieden. Es kam bei längerer Lagerung des Kollagens im

Kühlschrank zur Ausbildung einer Ruhestruktur, die sich in einer höheren Viskosität bemerkbar machte. Ein einfaches Pipettieren war hiernach unmöglich. In diesem Fall wurde erneut kräftig durchmischt und anschließend, wie oben beschrieben, abzentrifugiert.

Zur Herstellung der Gele wurden alle Reagenzien auf Eis gelagert. Das Lungengewebe wurde nach dem Auftauen bei Raumtemperatur ebenso auf Eis gelagert. Die Herstellung der Kollagen-Gele erfolgte im Kühlraum, da höhere Temperaturen zu einem Viskositätsanstieg des Kollagens führten und ein Gießen der Gele unmöglich machte. Die Oberseite einer Glaspetrischale (Durchmesser: 3.75 cm), die als Form zum Gießen der Gele verwendet wurde, und zuvor gründlich mit Wasser gereinigt und mit Isopropanol entfettet wurde, sowie die sonstigen Hilfsmittel wie Spatel, 50 mL Tubes und Pipettenspitzen, wurden frühzeitig im Kühlraum gelagert, damit auch hier bei Kontakt mit dem Kollagen tiefe Temperaturen garantiert werden konnten. Der vordere Teil der Pipettenspitzen zum Pipettieren des Kollagen-Hydrogels wurde jeweils gleichmäßig abgeschnitten, um eine exaktere Dosierung des viskosen Kollagens zu ermöglichen.

Zunächst wurden das entsprechende Volumen an Millipore®-Wasser und die Gelneutralisationslösung in einer 50 mL Reagenz- und Zentrifugenröhre durch Auf- und Abpipettieren sorgfältig durchmischt. Anschließend wurde der entsprechende Anteil an Kollagen zugemischt und abermals durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gründlich durchmischt. Dabei stellte sich heraus, dass ein sorgfältiges Durchmischen besonders wichtig war, um die Homogenität der Gele zu gewährleisten. Dies erfolgte zügig, aber mit besonderer Vorsicht, da hierbei leicht unerwünschte Luftblasen entstehen konnten. Pro Ansatz waren ca. 25 % überschüssiges Gesamtgelvolumen für die Mischung eines Gels einzukalkulieren, um trotz des Verlustes des an Kontaktmaterialien haftenden Kollagens genügend Gel-Matrix zum Ausgießen vorzubereiten.

Für die Herstellung eines Gels mit Gewebe wurden die Gewebestücke mit Hilfe eines Spatels auf der Oberfläche der Petrischale verteilt. Von der gekühlten fertigen Mischung wurden nun 3 x 0.9 mL mittels einer frischen Pipette auf das ausgebreitete Gewebe gegeben. Sofort wurden die Gewebestücke mit sorgfältigen Rührbewegungen mit zwei Spateln in der noch flüssigen Gel-Matrix homogen verteilt. Hierbei wurde besonders auf langsame Bewegungen geachtet, da bei diesem Vorgang ebenfalls sehr leicht Luftblasen entstanden. Bei der Bearbeitung aufgetretene größere oberflächliche Luftblasen konnten unmittelbar nach dem Gießen mittels einer Pipettenspitze vorsichtig entfernt werden. Als Vergleichsgel wurde ein Gel in identischer Zusammensetzung und Form, jedoch ohne Gewebe, hergestellt. Die Gelform wurde mit einem Normschliffdeckel bedeckt. Der Gelansatz wurde im Brutschrank bei 37 °C für 35 min dem Gelieren überlassen.

6.3.1.1 Überführung des Gels in das Wägeglas

Nach dem Geliervorgang wurde vorsichtig mit Hilfe eines löffelförmigen, flachen Mikro-Spatels an der Grenzfläche zwischen Gussform und Gel-Matrix beginnend das Ablösen des entsprechenden polymerisierten Gels provoziert. Nachdem die Ränder des Geles abgelöst waren, konnte schließlich eine vorsichtige langsame kreisförmige Bewegung die plane Fläche des Gelansatzes freigeben.

Nun konnte durch Greifen des entsprechenden Gelkonstrukts mit der Deckglaspinzette ein Überführen in ein Wägeglas (Durchmesser: 5.0 cm), welches als Gefäß für die eigentliche Versuchsdurchführung diente, herbeigeführt werden. Dorthin überführt wurde die Unterseite des jeweiligen Geles mit 1 mL isotonem PBS-Puffer befeuchtet, um ein Austrocknen und dadurch etwaige unerwünschte Formveränderungen zu verhindern. Bis zum Beginn der Probenaufgabe wurden die Gele mit dem entsprechenden Normschliffdeckel verschlossen.

6.3.2 Herstellung eines Polyacrylamid-Gels mit/ohne Gewebe

Eine weitere Möglichkeit das Gewebe in einer Gel-Matrix zu fixieren und somit die Analyse der Auflösungsgeschwindigkeit und der Gewebefixierung in Kombination direkt aus der nasalen Arzneiform bestimmen zu können, bestand darin, die Gewebestücke in ein 10 %iges Polyacrylamidgel einzugießen. Vor dem Gießen der Gele wurden die Reagenzien für die Gelherstellung, sowie das zu verwendende Lungengewebe auf Raumtemperatur gebracht.

- **Gelzusammensetzung (modifiziert nach [210]):**

30 % Acrylamid	0.667 mL
Trenngelpuffer	0.750 mL
Millipore®-Wasser	0.546 mL
10 % SDS-Lösung	50 µL
10 % APS-Lösung	40 µL
TEMED	4 µL

Als Form zum Gießen der Gele wurde wiederum die Oberseite einer Glaspetrischale (Durchmesser: 3.75 cm) verwendet, die zuvor gründlich mit Wasser gereinigt und mit Isopropanol entfettet wurde.

In ein 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß wurden zunächst der Trenngelpuffer, Millipore®-

Wasser, die 10 % SDS-Lösung, die 10 % APS-Lösung und schließlich das entsprechende Volumen an 30 % Acrylamid Lösung pipettiert und auf dem Vortex gemischt.

Mit Hilfe eines Spatels wurden die Gewebestücke auf der Oberfläche der Petrischale verteilt. Anschließend wurde das entsprechende Volumen an TEMED zu dem Gelansatz hinzupipettiert und abermals kurz auf dem Vortex durchmischt. Direkt danach wurde der gesamte Ansatz auf das ausgebreitete Gewebe gegeben. Sofort wurden mit sorgfältigen Rührbewegungen mit zwei Spateln die Gewebestücke in der noch flüssigen Gel-Matrix homogen verteilt. Positiv anzumerken ist hierbei, dass im Vergleich zum Gießen des Kollagengels die Problematik der Entstehung von Luftblasen bei der Bearbeitung des Polyacrylamidgels wesentlich geringer ist.

Nach 3 min wurde die Oberfläche des Gels vorsichtig mit 2 x 500 µL Millipore®-Wasser bedeckt, damit es zur Ausbildung einer flachen Grenzfläche während der Polymerisation kam. Der Gelansatz wurde schließlich mit einem Normschliffdeckel abgedeckt und bei Raumtemperatur für 60 min der Polymerisation überlassen.

Pro Versuchsansatz wurden wiederum jeweils ein Gel mit Gewebe und ein Vergleichsgel ohne Gewebe hergestellt.

6.3.2.1 Überführung des polymerisierten Gels in das Wägeglas

Nach Auspolymerisation des Gelansatzes wurde das überstehende Wasser vorsichtig durch Schräghalten abpipettiert. Das Vorgehen zum Ablösen der Gele und den weiteren Vorbereitungen vor dem Beginn des Experiments sind einem vorangegangenen Abschnitt (siehe 6.3.1.1) zu entnehmen.

6.4 Bindung intranasal angewendeter Wirkstoffe an die Gewebe-Gel-Matrix

6.4.1 Durchführung

Die untersuchten nasalen Arzneiformen Flutide® Nasal, Budes®-Nasenspray und Vividrin® akut - Nasenspray wurden, wie unter 1.1.3 beschrieben, vorbereitet. Ebenso bereitgestellt wurden 2 Reagenzgläser mit jeweils 2 mL PBS-Puffer und 1 mL MeOH zur Ermittlung der applizierten Dosis (siehe Pipettierschema). Der Brutschrank wurde auf 37 °C vorgeheizt und von der CO₂-Versorgung abgekoppelt. In dem Brutschrank wurde der Plattformschüttler aufgebaut.

Die beiden Wägegläser mit dem Gewebe-Gel und dem Vergleichsgel wurden auf einer

rutschfesten, stabilen Unterlage bereitgestellt. Zur Ermittlung der Gewebefixierung von FP (Bud, AZ-HCl) wurden 100 μL (55 μL , 40 μL) der Arzneiform, nach Abwischen der befüllten Pipettenspitze mit einem fusselfreien Tuch, in 2.4 mL (2.445 mL, 2.460 mL) KNS suspendiert. Sofort wurde die Wirkstoff enthaltende Matrix für ca. 5 Sekunden auf dem Vortex gemischt, anschließend 500 μL (entsprechen einer Dosis von $\sim 9 \mu\text{g}$ Wirkstoff) davon zur Ermittlung der applizierten Dosis in einem der vorbereiteten Reagenzgläser dispergiert. Weiteres Mischen auf dem Vortex folgte zwischen der Probenaufgabe von jeweils 500 μL auf das Gewebe-Gel und das Vergleichsgel. Dabei wurde jeweils vorsichtig das Applikationsvolumen in die Mitte der Gele pipettiert. Von dort spreitete die Wirkstoff enthaltende Matrix sofort auf der Oberfläche der Gele (siehe *Abbildung 37;1*). Die Pipettenspitze wurde anschließend vorsichtig mit dem PBS-Puffer, der die Unterseite des Gels befeuchtete, durch Auf- und Abpipettieren gespült. Schließlich wurden weitere 500 μL der Wirkstoff enthaltenden Matrix in einem der vorbereiteten Reagenzgläser dispergiert, um eine weitere Probe zur Ermittlung der applizierten Dosis zu erhalten.

Die beiden auf der rutschfesten Unterlage befindlichen Wägegläser wurden verschlossen und die nun wirkstofftragenden Gele auf den Plattformschüttler im Brutschrank unter konsequentem Waagrecht halten überführt. Die Drehzahl des rotierenden Schüttlers wurde langsam auf 55 U/min reguliert und die Gele für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Pipettierschema Applikation:

Analyse	PBS-Puffer	MeOH	Wirkstoff enthaltende Matrix: 2.5 mL (KNS + Wirkstoffsuspension bzw. -lösung)
Probe A: Applizierte Dosis	2 mL	1 mL	500 μL
Gewebe-Gel	—	—	500 μL
Vergleichsgel	—	—	500 μL
Probe B: Applizierte Dosis	2 mL	1 mL	500 μL

6.4.2 Waschen des Gels nach erfolgter Inkubation

Nach der 30-minütigen Inkubation erfolgte das Waschen der Gele. Hierzu wurden jeweils zunächst 3 x 1 mL PBS-Puffer direkt auf die Oberfläche des Gels pipettiert (siehe Pipettierschema). Danach wurde das Gel mit Hilfe einer Deckglaspinzette, nach genügendem Abtropfen des Puffers, auf die Waschvorrichtung überführt, die daraufhin umgehend auf dem verwendeten Wägeglas Platz fand (siehe *Abbildung 37;2*). Nun wurde zunächst die verwendete Pinzette mit 1 mL PBS-Puffer gewaschen und anschließend die Oberseite des Gels mit 3 x 1 mL PBS-Puffer gewaschen. Mit Hilfe der Deckglaspinzette wurde das Gel auf die Rückseite gedreht. Nach abermaligem Abwaschen der Pinzette mit 1 mL PBS-Puffer wurde auch diese Seite der Waschprozedur mit 3 x 1 mL unterzogen. Schließlich wurde das gewaschene Gel nach kurzem Abtropfen wiederum mit der Deckglaspinzette in ein neues Wägeglas überführt, welches zunächst verschlossen wurde (siehe *Abbildung 37;3*).

Das Waschen der Gele erfolgte nacheinander, wobei mit dem Gewebe-Gel begonnen wurde. Der Waschvorgang eines Gels dauerte weniger als 3 min. Um etwaige an der Waschvorrichtung befindliche Kristalle bzw. Wirkstoffmoleküle abzuwaschen wurde nach erfolgter Gelwaschung jeweils die Waschvorrichtung mit 3 x 1 mL MeOH nachgespült.

Pipettierschema Gel-Waschvorgang:

Waschschritte (chronologisch)	PBS-Puffer	MeOH
1. Im Wägeglas	3 x 1 mL	—
2. Deckglaspinzette	1 mL	—
3. Geloberseite	3 x 1 mL	—
4. Deckglaspinzette	1 mL	—
5. Gelunterseite	3 x 1 mL	—
6. Waschvorrichtung	—	3 x 1 mL

6.4.3 Vorbereitung der Proben für die Analytik

Die sich im Reagenzglas befindlichen Proben zur Ermittlung der applizierten Dosis wurden nun in einen 25 mL Maßkolben überführt. Um ein quantitatives Überführen des Analyten zu

gewährleisten, wurde das entsprechende Reagenzglas mit insgesamt 10 mL PBS-Puffer und 9 mL MeOH ausgewaschen.

Die Waschlösungen der Gele in den Wägegläsern wurden ebenfalls quantitativ in einen 25 mL Maßkolben überführt. Hierbei wurde das entsprechende Wägeglas mit jeweils insgesamt 7 mL MeOH dreimalig gründlich ausgewaschen. Um ein vollständiges Auflösen bislang nicht gelöster Wirkstoffkristalle zu ermöglichen, wurden die sich im Maßkolben befindlichen Analytdispersionen auf dem Vortex mehrfach durchmischt, bevor schließlich mit MeOH bis auf 25 mL ergänzt wurde. Die Matrix der Proben zur Ermittlung der applizierten Menge und der Waschlösungen der Gele enthielten somit die gleichen Volumina an KNS, PBS-Puffer und MeOH.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden sieben Aliquots von jeweils insgesamt 1 mL Matrix mit den Matrixanteilen MeOH : PBS : KNS von 50:48:2 direkt in ein HPLC-Vial abgefüllt. Sechs Aliquots wurden dabei für FP, für Bud und AZ-HCl mit Wirkstoffverdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 500 ng/mL versetzt, verschlossen und zusammen mit den Leerproben bei -40 °C bis zur weiteren Analyse am nächsten Tag gelagert.

6.5 Freisetzung der Wirkstoffe aus der Gewebe-Gel-Bindung in Gegenwart von humanem Plasma bzw. Plasma-Erythrozyten-Mischung

Das in 6.4.2 beschriebene gewaschene Wirkstoff enthaltende Gewebe-Gel bzw. das zugehörige Vergleichsgel wurden mit jeweils 10 mL Humanplasma (37 °C) für die beiden Glucocorticoide versetzt (siehe *Abbildung 37;4*). Da in eigenen Untersuchungen für AZ-HCl eine Umverteilung in Erythrozyten festgestellt wurde, wurde für die Freisetzungsversuche mit AZ-HCl 10 mL einer Plasma-Erythrozyten-Mischung (37 °C) verwendet. Die so erhaltene Mischung aus Gewebe-Gel und Plasma bzw. Plasma-Erythrozyten-Mischung wurde bei 37 °C auf dem Wippschüttler mit 7.5 min⁻¹ eingestellter Wippgeschwindigkeit geschüttelt. Nach 15, 30, und 60 min wurde 1 mL Plasma bzw. Plasma-Erythrozyten-Mischung entnommen und jeweils durch frisches, vorgewärmtes Plasma bzw. Plasma-Erythrozyten-Mischung (37 °C) desselben Volumens ersetzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -40 °C gelagert. Durch diese Lagerung konnte auch eine für die folgende Analytik gewünschte Hämolyse der Erythrozyten gewährleistet werden.

Zur Vorbereitung der Kalibrierstandards und Leerproben (blank) wurden sieben Aliquots von jeweils 1 mL des Humanplasmas bzw. der Plasma-Erythrozyten-Mischung in

Reagenzgläser abgefüllt. Sechs Aliquots wurden dabei für die Analytik von FP (Bud, AZ-HCl) mit Wirkstoffverdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 10-200 ng/mL (10-400 ng/mL) versetzt.

Die Plasmaproben wie auch die Kalibrierstandards wurden mit jeweils 50 µL internem Standard (5 µg/mL Amcinonid) versetzt. Für die Azelastinproben sowie die zugehörigen Kalibrierstandards wurde Dimetindenmaleat (Dimet, 5 µg/mL) als interner Standard verwendet. Die Leerproben wurden mit dem entsprechenden Volumen MeOH versetzt. Der Zugabe des ISD bzw. des MeOH zu den Proben folgte ein kurzes Durchmischen auf dem Vortex.

Anschließend wurden die Proben zusammen mit den Leerproben bei -40 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

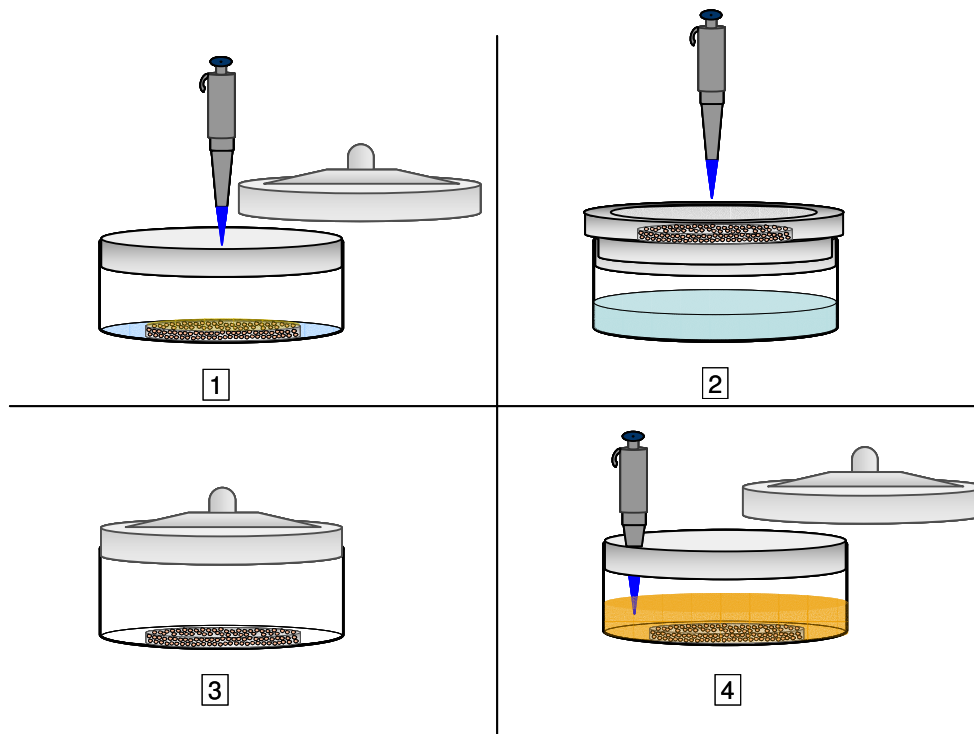


Abbildung 37: Schematische Darstellung des Versuchablaufs mit dem Polyacrylamid-Gewebe-Gel: 1.) Probenaufnahme: die in KNS dispergierte Wirkstoffsuspension bzw. Lösung wird auf die Gewebe-Gel-Matrix, deren Unterseite mit PBS-Puffer befeuchtet ist, aufgetragen; 2.) Nach Überführung des Gewebe-Gels auf die Waschvorrichtung erfolgt Waschvorgang der Ober- und Unterseite mit PBS-Puffer; 3.) Überführung der gewaschenen Gewebe-Gel-Matrix in ein neues Wägegglas; 4.) Freisetzung des Wirkstoffs aus der Gewebe-Gel-Bindung in Humanplasma bzw. Plasma-Erythrozyten-Mischung mit Probenahme

6.6 Verteilung von Azelastin-HCl in Erythrozyten

Hierzu wurden 3.950 mL Plasma-Erythrozyten-Mischung und 3.950 mL Humanplasma mit jeweils 50 μL einer AZ-HCl-Lösung (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS-Puffer pH 7.4, MeOH Anteil < 0.0002 %) versetzt und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze umgehend bei 400 x *g* für 5 min abzentrifugiert und anschließend 1 mL Probe aus dem Überstand abgenommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -40 °C gelagert.

Zur Vorbereitung der Kalibrierstandards und Leerproben (blank) wurden sieben Aliquots von jeweils 1 mL des Humanplasmas bzw. der Plasma-Erythrozyten-Mischung in Reagenzgläser abgefüllt. Sechs Aliquots wurden dabei mit AZ-HCl Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 10-400 ng/mL versetzt. Für die Proben der Plasma-Erythrozyten-Mischung, die Humanplasmaproben sowie die zugehörigen Kalibrierstandards wurde Dimetindenmaleat (Dimet, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) als interner Standard verwendet. Die Leerproben wurden mit dem entsprechenden Volumen MeOH versetzt. Der Zugabe des ISD bzw. des MeOH zu den Proben folgte ein kurzes Durchmischen auf dem Vortex.

Anschließend wurden die Proben zusammen mit den Leerproben bei -40 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

6.7 Probenaufarbeitung

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Waschlösungen bzw. die Proben zur Ermittlung der applizierten Menge für einige Sekunden auf dem Vortex durchmischt und davon jeweils 1 mL in HPLC Vials abgefüllt und verschlossen. Diese Proben wurden nun zusammen mit den Kalibrierstandards und den Leerproben für 30 min bei 13000 x *g* bei 10 °C abzentrifugiert. Zum Schutz vor den Zentrifugalkräften und etwaigem Zerschlagen wurden die Vials dabei in einem 2 mL Eppendorf Reagiergefäß untergebracht. Anschließend wurden jeweils 200 μL vom Überstand abgenommen und in neue Vials überführt. Diese Proben dienen durch Direktinjektion der Quantifizierung per HPLC.

Die Plasmaproben, die jeweiligen Kalibrierstandards und Leerproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mittels einer zweimaligen Extraktion mit Diethylether aufgearbeitet. Dabei wurden die Proben mit jeweils 3 mL Diethylether versetzt und 20 min am Mischrad angebracht. Zur besseren Phasentrennung wurde jeweils nach der Extraktion bei 200 x *g* für 1 min abzentrifugiert. Die Etherphasen beider Extraktionsschritte wurden vereinigt und unter einem leichten Stickstoffstrom bei 30 °C im Wasserbad bis zur Trockne abgedampft. Die Rückstände wurden jeweils in 100 μL MeOH aufgenommen und sofort zur Quantifizierung

per HPLC verwendet.

Die Proben der Plasma-Erythrozyten-Mischung sowie die Humanplasmaproben wurden ebenfalls bei Raumtemperatur aufgetaut und zunächst mit 250 μL NaOH versetzt. Anschließend erfolgte eine zweimalige Extraktion der Analyten mit einer Mischung aus Hexan/n-Octanol (95:5). Dabei wurden die Proben mit jeweils 4.5 mL der Hexan/n-Octanol-Mischung versetzt und 20 min am Mischrhad befestigt. Die Phasentrennung nach der Extraktion wurde durch Abzentrifugieren bei $2000 \times g$ für 5 min herbeigeführt. Die organischen Phasen beider Extraktionschritte wurden vereinigt. Im nächsten Schritt wurde durch die Zugabe von 150 μL 0.2 % Essigsäure zu der organischen Phase die Rückextraktion in die wässrige Phase durchgeführt. Hierbei wurden die Proben für 2 min auf dem Vortex geschüttelt. Anschließend wurde die organische Phase abgenommen und verworfen. Die erhaltene wässrige Phase diente direkt zur Quantifizierung per HPLC.

6.8 Quantifizierung mittels HPLC

6.8.1 Bestimmung der Glucocorticoidproben

Die HPLC Bedingungen, die verwendeten HPLC Methoden sowie die Vorgehensweise bei der Auswertung für die Glucocorticoide sind dem ersten Kapitel (siehe 1.7) zu entnehmen. Das Injektionsvolumen der Proben der Waschlösungen bzw. der Proben zur Ermittlung der applizierten Menge betrug jeweils 50 μL . Das Injektionsvolumen der Plasmaproben betrug jeweils 20 μL .

6.8.2 Bestimmung von Azelastin-HCl

Zur Quantifizierung der Proben mit AZ-HCl wurde die Hochleistungsflüssigchromatographie mit isokratischer Elution verwendet, in Anlehnung an die Methode von Langevin et al. [211]. Die Flussrate betrug 0.75 mL/min. Die mobile Phase bestand aus einem 50:50 Gemisch einer hydrophilen Komponente A (0.4 % (V/V) Phosphorsäure, 0.8 % (V/V) Triethylamin in Millipore®-Wasser) und einer lipophilen Komponente B (Acetonitril). Die Temperatur der Proben im Autosampler betrug während der gesamten Analyse 10 °C. Das Injektionsvolumen der Proben der Waschlösungen bzw. der Proben zur Ermittlung der applizierten Menge betrug jeweils 50 μL . Das Injektionsvolumen der Proben der Plasma-Erythrozyten-Mischung bzw. der Plasmaproben betrug jeweils 20 μL . Die Messwellenlänge des Detektors zur Quantifizierung des Analyten und des internen Standards betrug 210 nm.

6.8.2.1 HPLC Bedingungen

Stationäre Phase	Lichrospher® 100 CN (250 x 4 mm; 5 µm Partikel, Knauer), Temperierung mittels Säulenofen (Waters)
Detektor	UV Dualband Model 2487, Messwellenlänge 210 nm (Waters)

Degaser, Pumpe, Probengeber, Steuerung und Datenverarbeitung entsprechen den im Kapitel 1.7 geschilderten Geräten und Systemen.

6.8.2.2 HPLC Methode und Retentionszeiten (RT)

- **Methode D**

AZ-HCl (RT: 13.7 min)

Dimet (RT: 14.7 min)

Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	Komponente A (%)	Komponente B (%)
0	0.75	50	50
20		50	50

6.8.2.3 Auswertung

Die Retentionszeiten von AZ-HCl sowie des internen Standards wurden bei der Methodenentwicklung erfasst. Zur quantitativen Auswertung wurde die Software „Breeze® Version 3.30“ (Waters) verwendet. Nach Integration wurden die Peakflächen des AZ-HCl und des internen Standards ins Verhältnis gesetzt. Zur Erstellung einer Kalibriergerade wurden die ermittelten Flächenquotienten der Standards gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen. Nach Bildung der Quotienten der zu analysierenden Proben wurden anhand der Kalibriergeraden die entsprechenden Konzentrationen bestimmt.

7 Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch wirkstoffenthaltendes Humanplasma des pharmakokinetischen Modells

7.1 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Anbieter aller verwendeten Reagenzien sind in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1 bzw. 6.1) beschrieben.

7.2 Verwendete Geräte und Materialien

Heracell 240 Inkubator	Thermo Electron LED GmbH (Langenselbold, Deutschland)
Herasafe KS 12 Sicherheitswerkbank KI II	Thermo Electron LED GmbH (Langenselbold, Deutschland)

Alle weiteren verwendeten Geräte sind in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2 bzw. 6.2) vermerkt.

7.3 Vorbereitungen zur Versuchsdurchführung

7.3.1 Gewinnung von Plasmaproben

Zur Gewinnung von entsprechenden Plasmaproben zur Inkubation mit A549 Lungenepithelzellen wurden zunächst erneut, wie in Kapitel 6.3 und 6.4 beschrieben, Experimente zur Bindung der Wirkstoffe Fluticasonpropionat aus Flutide[®] Nasal sowie Azelastin-HCl aus Vividrin[®] akut an die Polyacrylamid-Gewebe-Gel-Matrix durchgeführt und die Gewebebindung bestimmt (siehe 6.7 und 6.8).

Die Durchführung der Freisetzung der Wirkstoffe aus der Gewebe-Gel-Bindung erfolgte schließlich, in weiten Teilen wie in Kapitel 6.5 beschrieben. Die Matrix der Freisetzung von Azelastin-HCl aus der Gewebe-Gel-Bindung bestand jedoch aus Humanplasma. Die Verwendung einer Plasma-Erythrozyten-Mischung war aufgrund der folgenden Inkubation der Freisetzungsmatrix mit A549 Lungenepithelzellen nicht sinnvoll.

So wurde das gewaschene Wirkstoff enthaltende Gewebe-Gel bzw. das zugehörige Vergleichsgel mit jeweils 10.0 mL Plasma bei 37 °C auf dem Wippschüttler geschüttelt. Nach 60 min wurden jeweils Plasmaproben entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -40 °C gelagert. In der Folge wurde das gesamte Plasma entfernt und jeweils durch 10.0 mL frisches, vorgewärmtes Plasma (37 °C) ersetzt. Nach weiteren zwei Stunden wurden abermals Proben entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -40 °C gelagert. Um eine identische Matrix für die Kontrollen zu erhalten, wurde 10.0 mL Humanplasma derselben Charge bei 37 °C mit einem wirkstofffreien Polyacrylamidgel unter Wippschüttelbewegungen eingelagert. Nach 60 min wurden Kontrollplasmaproben entnommen, das gesamte Plasma durch 10.0 mL frisches Plasma ersetzt und für weitere zwei Stunden geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurden abermals Proben gewonnen und bei -40 °C bis zur weiteren Verwendung eingelagert.

7.4 Zellkultur

Die Kultivierung von A549 Lungenepithelzellen erfolgte analog Kapitel 5.3.

7.4.1 Inkubation mit Humanplasma

Nachdem die Zellen subkonfluent gewachsen waren, wurde das Medium vollständig abgenommen und der Monolayer mit 2.9 ml Zellkulturmedium und 100 µL der jeweiligen Plasmaproben (siehe 7.3.1) für 3 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Kontrollen ergaben sich durch Versetzen der Zellen mit 2.9 mL Zellkulturmedium und 100 µL des jeweiligen Kontrollplasmas für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Zusätzliche Zellinkubationen, wie Humanplasma ohne Gelinkubation und Medium ohne Plasmazugabe wurden durchgeführt. Um eine vergleichbare Behandlung aller Proben zu gewährleisten, wurden alle Versuchsansätze mit Plasmaproben der entsprechenden Inkubationszeit parallel angesetzt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Stimulanz (50 µg/mL LPS in Zellkulturmedium) über 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ zur Produktion von IL-8 angeregt. Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes wurde bei 1000 x *g* für 10 min bei 20 °C zur Entfernung von Zellbruchstücken und Stimulanz zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

7.5 Zellzahlbestimmung nach Beendigung des Versuchs

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde analog Kapitel 5.5 durchgeführt.

7.6 Quantitative Bestimmung der IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA

Es wurde der TiterZyme[®]-EIA human IL-8 Immunoassay Kit von Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland) verwendet (Lagerung 4 °C, IL-8 Standard -20 °C). Das Prinzip des ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) war eine Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik.

7.6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Vor Beginn der Durchführung der IL-8 Bestimmung wurden alle dem Kit beigefügten Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Zur Herstellung des Waschpuffers wurde das Waschpufferkonzentrat 1:20 mit Millipore[®]-Wasser verdünnt.

7.6.2 Herstellung der Kalibrierstandards

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurde zunächst der lyophilisierte IL-8 Standard in 2.0 mL mitgeliefertem Puffer (Assay buffer 13) gelöst. Dies ergab eine Stammlösung von 1000 pg/mL. Die weiteren Kalibrierstandards wurden durch Verdünnen der Stammlösung mit Assay buffer 13 hergestellt. Dies führte zu Standardlösungen in den Konzentrationen 500 pg/mL, 250 pg/ml, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.25 pg/mL, 15.62 pg/mL und 7.8 pg/mL. Als Leerwertkontrolle (0 pg/mL) diente der Assay buffer 13.

7.6.3 Durchführung der IL-8 Bestimmung

Während der Vorbereitung aller Reagenzien und Kalibrierstandards wurden die Proben der Zellkulturversuche bei Raumtemperatur aufgetaut. Zunächst erfolgte die Zugabe von 100 µL Probe, Kalibrierstandard bzw. Kontrolle in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte.

Anschließend wurden die *wells* mit einem selbstklebenden Streifen luftdicht verschlossen und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler mit 150 rpm inkubiert.

Mit einem gründlichen Waschvorgang durch viermaliges Spülen mit 400 µL Waschpuffer (ELISA-Washer MultiWash Advantage) wurde die Probenflüssigkeit entfernt. Nach dem letzten

Waschvorgang wurde die Mikrotiterplatte umgedreht und Flüssigkeitsreste in den *wells* durch kurzes Abklopfen auf Papiertücher beseitigt.

Anschließend wurde jeweils 100 μL IL-8 Antikörper zugesetzt. Nach Abdichten der Vertiefungen mit Klebestreifen folgte wiederum eine einstündige Inkubation auf dem Plattformschüttler mit 150 rpm bei Raumtemperatur. Nun wurde ein weiterer Waschschrift mit viermaligem Spülen mit jeweils 400 μL Waschpuffer durchgeführt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von jeweils 100 μL IL-8 Konjugat (Antikörper konjugiert mit *horseradish peroxidase*) in die Vertiefungen der wells und eine Inkubation für 30 min auf dem Plattformschüttler mit 150 rpm bei Raumtemperatur.

Im letzten Schritt wurden in jedes *well* 100 μL TMB Substratlösung gegeben und für 15 min auf dem Plattformschüttler mit 150 rpm geschüttelt. Es kam zu einer Farbentwicklung proportional zur Konzentration an gebundenem IL-8. Nach Zusatz von 50 μL Stopplösung (1N HCl) wurde die enzymatische Reaktion beendet. Ein Mischen der Farblösung durch vorsichtiges Klopfen der Mikroplatte führte schließlich zu einer homogenen Färbung. Anschließend wurde die Absorption der einzelnen Proben bei 450 nm mit Hilfe des ELISA-Reader Multiskan Ascent bestimmt. Die Messung der Absorption bei 600 nm diente zur Korrektur der optischen Fehler der Vertiefungen der Mikroplatte.

7.6.4 Auswertung der IL-8 Bestimmung

Zur Ermittlung einer Kalibriergeraden wurden die ermittelten Absorptionswerte der unterschiedlichen Kalibrierstandards (7.8 pg/mL -500 pg/mL) verwendet und mittels Regressionsanalyse der Korrelationskoeffizient bestimmt. Aus den ermittelten Absorptionen der Proben konnten daraus die jeweiligen IL-8 Konzentrationen bestimmt werden.

8 Validierung der Analysemethoden

8.1 Selektivität

Mit der Selektivität wird die Fähigkeit einer Methode nachgewiesen, ohne eine Störung durch Begleitstoffe der Matrix, verschiedene Komponenten nebeneinander zu erfassen. So wurden zur Vorbereitung der Leerproben alle Probenmatrixes (PBS-Puffer, KNS, KRH-Puffer, Humanplasma) nach Art und Volumen mit dem Lösungsmittel versetzt, mit dem auch die Kalibrierstandards hergestellt wurden. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte analog zu den in den einzelnen Kapiteln beschriebenen Methoden. Jede Matrix wurde durch mindestens drei Proben auf die selektive Bestimmung der unterschiedlichen Analyten untersucht.

In den erfassten Chromatogrammen kam es bei keinem der untersuchten Analyten zu interferierenden Peaks bei den entsprechenden Retentionszeiten (siehe *Abbildung 12* bzw. *Abbildung 13*).

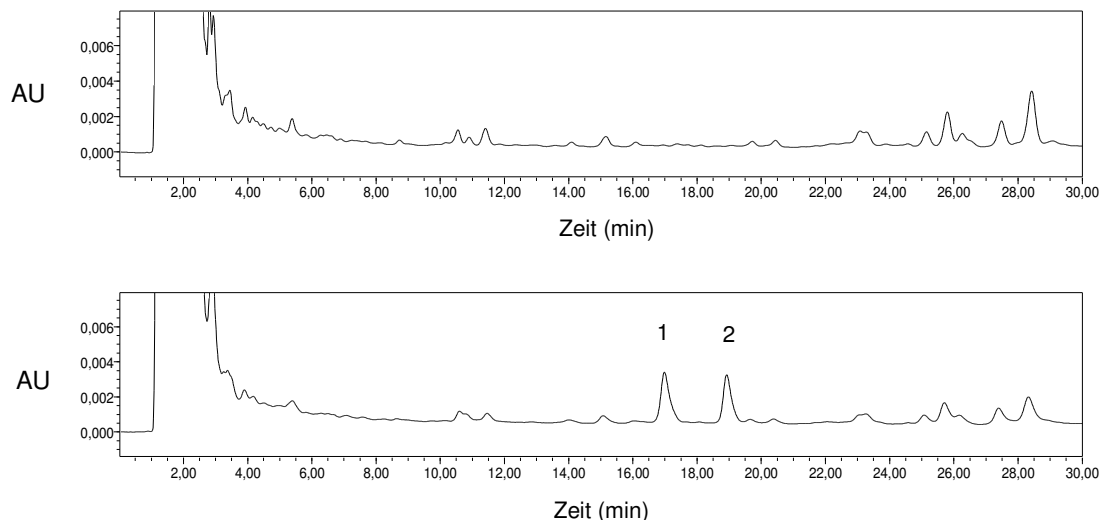


Abbildung 38: Musterchromatogramme der Bestimmung aus künstlichem Nasensekret (KNS), extrahiert mit Diethylether: Oben dargestellt ist ein Chromatogramm, das nach Injektion einer Leerprobe (KNS blank) entstand. Das untere Chromatogramm zeigt den Kalibrierstandard S_3 des Fluticasonfuroat (2) mit dem internen Standard Amcinonid (1).

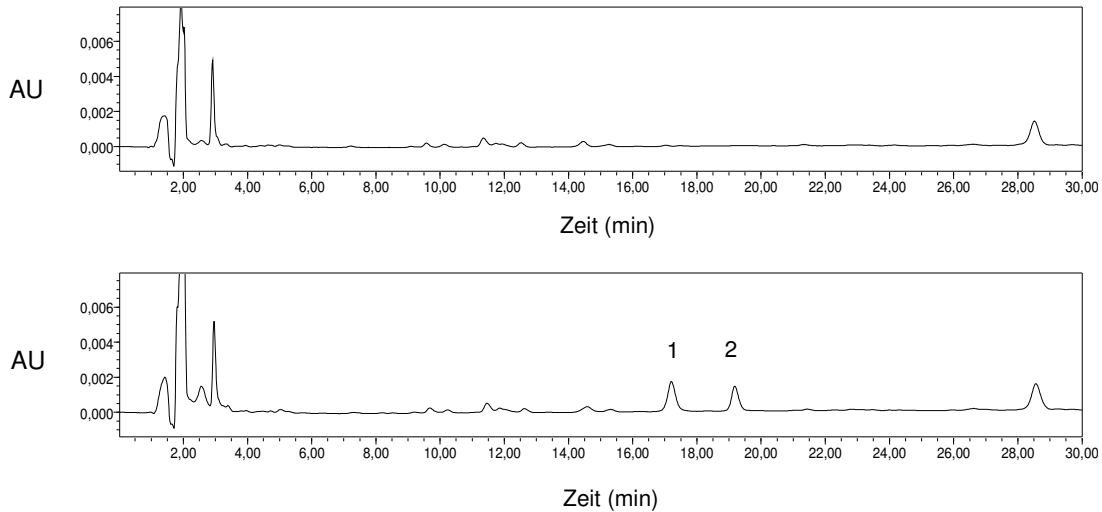


Abbildung 39: Musterchromatogramme der Bestimmung aus Humanplasma, extrahiert mit Diethylether: Oben dargestellt ist ein Chromatogramm, das nach Injektion einer Leerprobe (Humanplasma blank) entstand. Das untere Chromatogramm zeigt den Kalibrierstandard S_3 des Fluticasonfuroat (2) mit dem internen Standard Amcinonid (1).

8.2 Kalibrierfunktion

Zur Überprüfung der Linearität wurden für jede Substanz und die entsprechende zu untersuchende Matrix sechs Konzentrationen, die den zu erwartenden Konzentrationsbereich der Proben umfassen, analysiert. So wurden bei der Bestimmung der Linearität der Analytik des gelösten Glucocorticoidanteils für TCA und Bud ein Bereich von 5-80 $\mu\text{g/mL}$, für BDP und FP ein Bereich von 25-200 ng/mL sowie für MF und FF ein Bereich von 10-200 ng/mL gewählt. Für die Überprüfung der Linearität der Analytik der Löslichkeit in KNS wurden für TCA Konzentrationen von 1-40 $\mu\text{g/mL}$ und für FF Konzentrationen von 10-400 ng/mL verwendet. Unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen den Konzentrationen der jeweiligen Probenlösung und dem Quotienten aus Peakfläche der jeweiligen Probe und dem internen Standard wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Daraus ergebend lag folgende Geradengleichung vor:

$$y = a \times x + b$$

y	Quotient der Peakflächen	x	Konzentration der Probe
a	Steigung	b	Achsenabschnitt

Zur Bestätigung und Rechtfertigung des linearen Zusammenhangs sowie der Verwendung des angewandten Regressionsmodells wurden die Varianzhomogenität (Homoskedasizität, nach Bartlett), die Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov) der Residuen, Residualplot (zur Überprüfung von Trends), Güte der Anpassung sowie die Linearität überprüft (siehe *Tabelle 4* bzw. *Tabelle 5*).

Tabelle 4: Ermittelte Parameter der linearen Regression der Analytik des gelösten Glucocorticoidanteils. Der Konzentrationsbereich für TCA und Bud betrug 5-80 µg/mL, für BDP und FP 25-200 ng/mL und für MF und FF 10-200 ng/mL. Dargestellt sind jeweils die mittels GraphPad Prism Version 4.0 ermittelten Werte sowie das dazugehörige 95 % Konfidenzintervall in Klammern für die Steigung und den Achsenabschnitt. In der rechten Spalte ist der jeweilige Korrelationskoeffizient erfasst.

Arzneistoff	Steigung (a)	Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (r)
TCA	0.1307 (0.1286 – 0.1328)	-0.06999 (-0.1631 – 0.02310)	0.9989
Bud	0.1225 (0.1201 – 0.1248)	-0.09794 (-0.2037 – 0.007846)	0.9985
BDP	0.0008124 (0.0007901 – 0.0008346)	-0.0006643 (-0.003187 – 0.001858)	0.9969
FP	0.001015 (0.0009898 – 0.001040)	-0.001836 (-0.004664 – 0.0009919)	0.9975
MF	0.002057 (0.001983 – 0.002130)	0.0003153 (-0.006628 – 0.007259)	0.9948
FF	0.001858 (0.001812 – 0.001903)	-0.001578 (-0.005884 – 0.002728)	0.9975

Tabelle 5: Ermittelte Parameter der linearen Regression der Analytik der Löslichkeit in KNS. Der Konzentrationsbereich lag für TCA bei 1-40 µg/mL bzw. für FF bei 10-400 ng/mL. Dargestellt sind jeweils die mittels GraphPad Prism Version 4.0 ermittelten Werte sowie das dazugehörige 95 % Konfidenzintervall in Klammern für die Steigung und den Achsenabschnitt. In der rechten Spalte ist der jeweilige Korrelationskoeffizient erfasst.

Arzneistoff	Steigung (a)	Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (r)
TCA	3.494 (3.456 – 3.531)	0.9448 (0.1409 – 1.749)	0.9995
FF	0.01165 (0.01149 – 0.01181)	0.03439 (-0.0001993 – 0.06897)	0.9992

Die ermittelten Daten wurden mittels der Software GraphPad Prism™ Version 4.0 überprüft und stellten sich als normalverteilt heraus. Varianzhomogenität war bei den entwickelten Methoden bei allen untersuchten Glucocorticoiden gegeben. Es ergab sich kein Hinweis auf Trends. Die Linearität wurde anhand des Korrelationskoeffizienten bestätigt, der bei allen Untersuchungen größer als 0.99 war.

8.3 Präzision und Richtigkeit

Zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der untersuchten Methoden wurden Qualitätsstandards mit definierten Konzentrationen hergestellt. Die je nach Arzneistoff und Methodik gewählten drei verschiedenen Konzentrationsniveaus befanden sich im unteren, mittleren und oberen Konzentrationsbereich der Kalibrierung. Zur Bestimmung der Intraday Präzision und Richtigkeit wurden die entsprechenden Konzentrationsniveaus sechsmal an einem Tag vorbereitet und vermessen, während für die Ermittlung der Interday Präzision und Richtigkeit sechs Proben für jede Konzentration an aufeinanderfolgenden Tagen jeweils aufgearbeitet und analysiert wurden.

Die Herstellung, Vorbereitung und Vermessung der jeweiligen Proben zur Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils und zur Bestimmung der Löslichkeit in KNS wurden, wie in den entsprechenden vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.6 bzw. 3.3 Experimenteller Teil C) beschrieben, durchgeführt. Die Beurteilung der Präzision der Methoden wurde anhand der

ermittelten prozentualen relativen Standardabweichung der untersuchten Qualitätsstandards vollzogen (siehe *Tabelle 6* bzw. *Tabelle 7*) [211]. Zur Bestimmung der Konzentrationen der untersuchten Proben wurden die durch lineare Regression erhaltenen Kalibriergeraden herangezogen (siehe 7.1 Experimenteller Teil C). Anhand der ermittelten Konzentrationen konnte nach folgender Formel die Richtigkeit der Methoden bei den unterschiedlichen Konzentrationsniveaus bestimmt werden (siehe *Tabelle 6* bzw. *Tabelle 7*) [212]:

$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{\sum_{i=1}^6 [\text{ermittelte Konzentration}]^i}{6 \times [\text{eingesetzte Konzentration}]}$$

Tabelle 6: Intraday (n=6) und Interday (n= 6) Präzision und Richtigkeit der Analytik zur Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils.

Arzneistoff	Konzentration	Intraday	Intraday	Interday	Interday
		Richtigkeit (%)	Präzision (%)	Richtigkeit (%)	Präzision (%)
TCA	12.5 µg/mL	96.4	2.9	97.6	3.6
	40 µg/mL	97.6	5.0	96.0	3.1
	70 µg/mL	93.0	3.9	97.2	5.1
Bud	12.5 µg/mL	96.4	2.1	99.2	3.9
	40 µg/mL	98.1	3.0	110.1	3.2
	70 µg/mL	95.6	5.0	103.0	3.4
BDP	35 ng/mL	104.2	8.8	91.7	9.9
	100 ng/mL	107.3	5.4	109.2	6.9
	160 ng/mL	101.7	3.4	98.9	6.1
FP	35 ng/mL	100.9	4.6	91.1	12.0
	100 ng/mL	101.4	6.5	91.4	6.2
	160 ng/mL	103.5	6.8	100.0	5.4
MF	35 ng/mL	96.7	12.0	112.5	5.4
	100 ng/mL	110.4	3.6	106.4	8.2
	160 ng/mL	112.2	5.5	108.1	6.9
FF	35 ng/mL	103.8	2.1	98.1	5.7
	100 ng/mL	105.5	4.9	103.8	8.9
	160 ng/mL	106.0	6.7	106.7	3.6

Tabelle 7: Intraday (n=6) und Interday (n= 6) Präzision und Richtigkeit der Analytik der Löslichkeit in KNS

Arzneistoff	Konzentration	Intraday	Intraday	Interday	Interday
		Richtigkeit (%)	Präzision (%)	Richtigkeit (%)	Präzision (%)
TCA	3 µg/mL	97.4	4.0	97.7	2.8
	20 µg/mL	102.9	2.1	105.4	2.3
	38 µg/mL	104.9	3.6	101.6	2.7
FF	30 ng/mL	97.9	2.3	95.0	2.7
	200 ng/mL	103.0	0.6	101.4	2.2
	380 ng/mL	102.4	1.8	98.4	3.9

Sowohl die Richtigkeit (85-115 %) als auch die Präzision (relative Standardabweichung < 15 %) waren in dem angestrebten Rahmen für bioanalytische Methoden [213].

8.4 Bestimmungsgrenze

Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurde durch Vorbereitung, Aufarbeitung und Vermessung der entsprechend hergestellten Proben mit Konzentrationen, die der Bestimmungsgrenze entsprachen, wiederholt durchgeführt (n= 6), um für die untersuchten Methoden eine Aussage treffen zu können (siehe 1.6 bzw. 3.3 Experimenteller Teil C). Die untersuchten Konzentrationen zum Nachweis der ausreichend richtigen und präzisen Bestimmungsgrenze der Methoden gleichten der Konzentration der eingesetzten niedrigsten Kalibrierstandards. So wurde für die Methode des gelösten Glucocorticoidanteils für BDP und FP eine Bestimmungsgrenze von 25 ng/mL und für die Extraktion aus KNS für FF eine Bestimmungsgrenze von 10 ng/mL erreicht (siehe *Tabelle 8* bzw. *Tabelle 9*).

Tabelle 8: Bestimmungsgrenzen mit Präzision und Richtigkeit zur Analytik des bereits gelösten Glucocorticoidanteils (n= 6)

Arzneistoff	Bestimmungsgrenze	Richtigkeit (%)	Präzision (%)
BDP	25 ng/mL	95.1	2.8
FP	25 ng/mL	99.2	7.5
MF	10 ng/mL	97.1	14.1
FF	10 ng/mL	96.0	14.9

Nach Shah et al. ist für die Validierung bioanalytischer Methoden bei der Bestimmung der kleinsten quantifizierbaren Konzentration (LLOQ, lower limit of quantification) eine Richtigkeit von 80-120 % und eine Präzision in Form der relativen Standardabweichung von < 20 % gefordert. Diese Grenzen wurden bei allen untersuchten Substanzen bei den jeweiligen Methoden eingehalten (siehe *Tabelle 8* bzw. *Tabelle 9*).

Tabelle 9: Bestimmungsgrenze mit Präzision und Richtigkeit von Fluticasonfuroat nach Extraktion aus KNS (n= 6)

Arzneistoff	Bestimmungsgrenze	Richtigkeit (%)	Präzision (%)
FF	10 ng/mL	89.0	9.1

8.5 Extraktionseffektivität

Um einen Anhaltspunkt über die Effektivität des Extraktionsvorgangs aus der Proben-Matrix (KNS) zu erhalten, wurde für jedes untersuchte Glucocorticoid für drei verschiedene Konzentrationsniveaus sechs analoge Proben vorbereitet, extrahiert, aufgearbeitet und anschließend vermessen (siehe 3.3 Experimenteller Teil C). Außerdem wurden sechs weitere Standardlösungen hergestellt, die die entsprechende Konzentration des Glucocorticoids für eine direkte Injektion enthielt. Die Berechnung der Extraktionseffektivität wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Extraktionseffektivität (\%)} = \frac{\text{Peakfläche Arzneistoff nach Extraktion für } x \text{ ng / mL}}{\text{Peakfläche Arzneistoff nach direkter Injektion für } x \text{ ng / mL}}$$

Tabelle 10: Extraktionseffektivität von TCA und FF nach Flüssig-Flüssigextraktion aus der Proben-Matrix (KNS) für unterschiedliche Konzentrationen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n= 6)

Arzneistoff	Konzentration	Extraktionseffektivität (%)	Standardabweichung
TCA	2.5 $\mu\text{g/mL}$	98.5	± 8.8
	15 $\mu\text{g/mL}$	92.2	± 5.6
	30 $\mu\text{g/mL}$	93.1	± 5.4
FF	50 ng/mL	90.7	± 4.4
	150 ng/mL	93.6	± 5.7
	300 ng/mL	96.7	± 4.2

D Tabellarischer Anhang

1 Bestimmung des gelösten Glucocorticoidanteils handelsüblicher Suspensionen zur intranasalen Applikation

1.1 Nichtspezifische Bindung (NSB)

NSB (%)	I	II	III	MW ± MAbM
TCA	2	8	4	5 ± 2
Bud	5	5	9	6 ± 2
FP	62	50	58	57 ± 5
BDP	64	56	57	59 ± 3
MF	74	75	71	73 ± 1
FF	66	62	66	65 ± 2

MW Mittelwert

MAbM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

1.2 Bereits gelöster Glucocorticoidanteil

1.2.1 Wirkstoffkonzentration ohne NSB Korrektur

Konz.(µg/mL) ohne NSB Korrektur	I	II	III	IV	V	MW ± Stabw
TCA	26.54	26.90	27.36	26.16	27.36	26.86 ± 0.51
Bud	53.04	52.77	49.46	52.76	54.09	52.42 ± 1.75
FP	0.043	0.048	0.046	0.048	0.055	0.048 ± 0.004
BDP	0.057	0.059	0.048	0.051	0.056	0.054 ± 0.005
MF	0.017	0.014	0.016	0.018	0.015	0.016 ± 0.002
FF	0.018	0.018	0.020	0.021	0.019	0.019 ± 0.001

MW Mittelwert

Stabw Standardabweichung

1.2.2 Wirkstoffkonzentration mit NSB Korrektur

Konz.($\mu\text{g/mL}$) mit NSB Korrektur	I	II	III	IV	V	MW \pm Stabw.
TCA	27.86	28.24	28.72	27.46	28.72	28.20 \pm 0.55
Bud	56.59	56.30	52.76	56.29	57.71	55.93 \pm 1.86
FP	0.100	0.110	0.105	0.111	0.127	0.111 \pm 0.010
BDP	0.140	0.145	0.117	0.124	0.138	0.133 \pm 0.012
MF	0.063	0.053	0.059	0.068	0.056	0.060 \pm 0.006
FF	0.051	0.052	0.057	0.059	0.055	0.055 \pm 0.004

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

2 Bestimmung des Sprühstoßvolumens handelsüblicher Glucocorticoid-Suspensionen zur intranasalen Applikation

2.1 Wirkstoffgehalt in 50 µL Glucocorticoid-Suspension

Konz.(µg/50µL)	I	II	III	IV	V	MW ± Stabw
Nasacort® (TCA)	46.10	46.28	46.24	45.64	46.29	46.11 ± 0.27
Budes® (Bud)	36.42	36.65	36.35	36.91	35.70	36.42 ± 0.46
Flutide® Nasal (FP)	16.76	17.05	17.06	17.33	17.07	17.06 ± 0.20
ratio Allerg® (BDP)	26.93	26.60	26.21	27.21	26.27	26.65 ± 0.43
Nasonex® (MF)	24.96	24.41	23.93	24.53	25.10	24.59 ± 0.47
Avamys® (FF)	24.54	23.85	25.16	24.07	24.24	24.37 ± 0.51

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

2.2 Sprühstoßvolumen

Volumen pro Sprühstoß (µL)	I	II	III	IV	V	MW ± Stabw
Nasacort® (TCA)	60	59	59	60	59	60 ± 0.4
Budes® (Bud)	68	68	69	68	70	69 ± 0.9
Flutide® Nasal (FP)	149	147	147	144	146	147 ± 1.7
ratio Allerg® (BDP)	93	94	95	92	95	94 ± 1.5
Nasonex® (MF)	100	102	104	102	100	102 ± 1.9
Avamys® (FF)	56	58	55	57	57	56 ± 1.2

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

3 Bestimmung der Löslichkeit intranasaler Glucocorticoid-Suspensionen in Puffer und künstlichem Nasensekret

3.1 Nasacort®

Konz. ($\mu\text{g/mL}$)	I	II	III	IV	V	MW \pm Stabw
PBS 30 min	28.87	28.29	27.88	28.78	27.54	28.27 \pm 0.57
KNS 30 min	25.86	24.82	26.38	26.13	26.94	26.03 \pm 0.79
PBS 5 h	28.83	29.07	28.66	29.14	28.54	28.85 \pm 0.26
KNS 5 h	28.25	28.39	29.25	28.52	27.70	28.42 \pm 0.56

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

3.2 Budes®

Konz. ($\mu\text{g/mL}$)	I	II	III	IV	V	MW \pm Stabw
PBS 30 min	17.98	17.97	18.24	17.74	18.66	18.12 \pm 0.35
KNS 30 min	20.32	20.46	20.57	19.25	20.78	20.27 \pm 0.60
PBS 5 h	18.63	18.68	18.65	18.44	17.67	18.41 \pm 0.43
KNS 5 h	19.19	19.92	20.76	20.87	18.80	19.91 \pm 0.92

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

3.3 Flutide® Nasal

Konz. (ng/mL)	I	II	III	IV	V	MW \pm Stabw
PBS 30 min	53	55	56	56	63	57 \pm 4
KNS 30 min	122	129	121	127	122	124 \pm 4
PBS 5 h	54	54	61	52	53	55 \pm 4
KNS 5 h	130	131	133	122	131	129 \pm 5

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

3.4 ratio Allerg[®]

Konz. (ng/mL)	I	II	III	IV	V	MW ± Stabw
PBS 30 min	106	105	109	107	99	105 ± 4
KNS 30 min	216	209	217	212	209	213 ± 4
PBS 5 h	110	106	105	112	102	107 ± 4
KNS 5 h	228	231	231	226	230	229 ± 2

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

3.5 Nasonex[®]

Konz. (ng/mL)	I	II	III	IV	V	MW ± Stabw
PBS 30 min	54	42	52	43	50	48 ± 6
KNS 30 min	158	155	156	154	147	154 ± 4
PBS 5 h	38	38	44	35	41	39 ± 3
KNS 5 h	171	173	166	157	169	168 ± 6

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

3.6 Avamys[®]

Konz. (ng/mL)	I	II	III	IV	V	MW ± Stabw
PBS 30 min	69	68	66	72	69	69 ± 2
KNS 30 min	185	200	186	197	182	190 ± 8
PBS 5 h	60	65	62	62	65	63 ± 2
KNS 5 h	196	186	198	203	197	196 ± 6

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

4 Bindung intranasal angewendeter Glucocorticoide an humanes Nasengewebe

4.1 Triamcinolonacetonid

TCA	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	MW	Stabw
geb. an Gewebe (ng/g)	558	773	481	604	152
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / mL Plasma)				
10	22	29	22	24	4
20	25	27	26	26	1
30	25	27	28	27	1
45	25	28	24	26	2
60	25	27	28	27	2

MW Mittelwert

Stabw Standardabweichung

GC Glucocorticoid

4.2 Budesonid

BUD	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	MW	Stabw
geb. an Gewebe (ng/g)	1152	703	1178	1011	267
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / mL Plasma)				
10	32	30	43	35	7
20	42	46	56	48	7
30	46	48	64	53	10
45	53	54	66	58	7
60	57	56	71	62	9

MW Mittelwert

Stabw Standardabweichung

GC Glucocorticoid

4.3 Fluticasonpropionat

FP	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	Inkubation IV	MW	Stabw
geb. an Gewebe (ng/g)	2909	2493	3016	2915	2806	277
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / mL Plasma)					
10	117	74	104	62	89	26
20	163	110	151	102	131	30
30	171	120	165	142	150	23
45	171	139	192	161	166	22
60	186	150	211	182	182	25

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung GC Glucocorticoid

4.4 Mometasonfuroat

MF	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	Inkubation IV	MW	Stabw
geb. an Gewebe (ng/g)	2966	3063	2786	3015	2958	121
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / mL Plasma)					
10	101	126	101	127	114	15
20	155	224	141	180	175	37
30	193	225	164	209	198	26
45	213	236	201	228	220	16
60	235	234	216	239	231	10

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung GC Glucocorticoid

4.5 Fluticasonfuroat

FF	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	Inkubation IV	MW	Stabw
geb. an Gewebe (ng/g)	3543	3596	3360	3647	3536	125
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / mL Plasma)					
10	111	108	127	113	114	8
20	156	167	180	158	165	11
30	181	218	226	183	202	23
45	205	258	239	226	232	22
60	236	278	264	256	259	18

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung GC Glucocorticoid

5 Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch gewebegebundene intranasale Glucocorticoide

5.1 IL-8 Hemmung aus Gewebeproben

IL-8 Konz. (pg/mL)	I	II	III	IV	V	VI	MW ± Stabw
Kontrolle	477	503	476	503	560	469	498 ± 34
TCA	151	156	171	-	-	-	159 ± 10
Bud	158	140	111	-	-	-	137 ± 24
FP	91	79	109	-	-	-	93 ± 15
MF	209	175	208	186	-	-	195 ± 17
FF	78	78	84	88	-	-	82 ± 5

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

5.1.1 Zellviabilität

Zellzahl	I	II	III	IV	V	VI	MW
Kontrolle	1.62 * 10 ⁶	1.83 * 10 ⁶	2.34 * 10 ⁶	1.92 * 10 ⁶	2.25 * 10 ⁶	1.86 * 10 ⁶	1.97 * 10 ⁶
Kontrolle[‡]	2.43 * 10 ⁶	-	-	-	-	-	-
TCA	1.48 * 10 ⁶	1.68 * 10 ⁶	2.04 * 10 ⁶	-	-	-	1.73 * 10 ⁶
Bud	1.89 * 10 ⁶	1.92 * 10 ⁶	1.52 * 10 ⁶	-	-	-	1.78 * 10 ⁶
FP	1.5 * 10 ⁶	1.62 * 10 ⁶	1.44 * 10 ⁶	-	-	-	1.52 * 10 ⁶
MF	1.8 * 10 ⁶	2.13 * 10 ⁶	1.89 * 10 ⁶	1.5 * 10 ⁶	-	-	1.83 * 10 ⁶
FF	2.07 * 10 ⁶	1.8 * 10 ⁶	1.29 * 10 ⁶	1.44 * 10 ⁶	-	-	1.65 * 10 ⁶

MW Mittelwert ‡ ohne Stimulation, ohne Gewebe

5.2 IL-8 Hemmung aus Plasmaproben

IL-8 Konz. (pg/mL)	I	II	III	IV	MW ± Stabw
Kontrolle	271	282	248	239	260 ± 20
TCA	230	202	219	-	217 ± 14
Bud	126	118	144	-	129 ± 14
FP	76	80	88	67	78 ± 9
MF	70	63	78	68	70 ± 6
FF	58	70	80	80	69 ± 10

MW Mittelwert Stabw Standardabweichung

5.2.1 Zellviabilität

Zellzahl	I	II	III	IV	MW
Kontrolle	$0.96 \cdot 10^6$	$1.02 \cdot 10^6$	$0.99 \cdot 10^6$	$1.05 \cdot 10^6$	$1.01 \cdot 10^6$
Kontrolle[‡]	$0.93 \cdot 10^6$	-	-	-	-
TCA	$1.14 \cdot 10^6$	$0.81 \cdot 10^6$	$0.90 \cdot 10^6$	-	$0.95 \cdot 10^6$
Bud	$0.86 \cdot 10^6$	$1.38 \cdot 10^6$	$0.93 \cdot 10^6$	-	$1.06 \cdot 10^6$
FP	$0.86 \cdot 10^6$	$1.08 \cdot 10^6$	$1.02 \cdot 10^6$	$0.78 \cdot 10^6$	$0.94 \cdot 10^6$
MF	$1.14 \cdot 10^6$	$1.11 \cdot 10^6$	$1.26 \cdot 10^6$	$1.20 \cdot 10^6$	$1.18 \cdot 10^6$
FF	$1.05 \cdot 10^6$	$1.02 \cdot 10^6$	$1.32 \cdot 10^6$	$1.32 \cdot 10^6$	$1.18 \cdot 10^6$

MW Mittelwert ‡ ohne Stimulation, ohne Plasma

5.3 Stabilität im Zellkulturmedium

IL-8 Konz. (ng/mL) vor Inkubation	I	II	MW	IL-8 Konz. (ng/mL) nach Inkubation	IV	V	VI	MW ± MAbM
TCA	80	80	80		86	81	76	81 ± 3
Bud	75	78	76		73	77	78	76 ± 2
FP	77	75	76		76	73	73	74 ± 1
MF	72	77	74		50	52	49	51 ± 1
FF	80	75	77		69	70	76	72 ± 3

MW Mittelwert

MAbM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

6 Modell zur intranasalen Pharmakokinetik topisch applizierter Wirkstoffe

6.1 Budesonid

6.1.1 Bindung und Freisetzung von Bud (Gewebe-Gel)

BUD	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	MW	MABM
geb. Gewebe-Gel (ng/Gel)	3657	4676	5859	4731	752
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / mL Plasma)				
15	70	130	126	100	26
30	115	198	180	157	33
60	201	293	260	247	34

MW Mittelwert MABM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

6.1.2 Bindung und Freisetzung von Bud (Vergleichsgel)

BUD	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	MW	MABM
geb. Vergleichsgel (ng/Gel)	2954	3684	4716	3785	621
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / mL Plasma)				
15	22	48	12	35	14
30	65	78	72	72	4
60	142	184	155	163	16

MW Mittelwert MABM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

6.2 Fluticasonpropionat

6.2.1 Bindung und Freisetzung von FP (Gewebe-Gel)

FP	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	MW	MABM
geb. Gewebe-Gel (ng/Gel)	1111	1097	1257	1155	68
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / mL Plasma)				
15	32	29	29	30	1
30	47	39	35	40	5
60	48	47	50	49	1

MW Mittelwert MABM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

6.2.2 Bindung und Freisetzung von FP (Vergleichsgel)

FP	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	MW	MABM
geb. Vergleichsgel (ng/Gel)	219	201	390	270	80
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng GC / mL Plasma)				
15	17	5	6	10	5
30	20	8	9	12	5
60	16	12	16	15	2

MW Mittelwert MABM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

6.3 Azelastin-HCl

6.3.1 Bindung und Freisetzung von AZ-HCl (Gewebe-Gel)

AZ-HCl	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	MW	MABM
geb. Gewebe-Gel (ng/Gel)	6404	6364	5179	5982	536
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng AZ-HCl / mL Plasma)				
15	69	82	77	75	5
30	90	103	94	97	5
60	122	139	132	130	6

MW Mittelwert MABM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

6.3.2 Bindung und Freisetzung von AZ-HCl (Vergleichsgel)

AZ-HCl	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III	MW	MAbM
geb. Vergleichsgel (ng/Gel)	1942	2211	1811	1988	149
Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng AZ-HCl / mL Plasma)				
15	8	28	31	18	10
30	11	31	18	21	7
60	25	39	27	32	6

MW Mittelwert MAbM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

6.3.3 Verteilung von AZ-HCl in Erythrozyten

AZ-HCl	I	II	III	MW	MAbM	K (c Ery/c Pl)
Erythrozyten 1h	80	70	81	77	5	0.53
Humanplasma 1h	150	145	138	145	4	

MW Mittelwert MAbM Mittlere Abweichung vom Mittelwert K (c Ery/c Pl) Verteilungskoeffizient

7 Hemmung der IL-8 Freisetzung aus humanen Lungenepithelzellen durch wirkstoffenthaltendes Humanplasma des pharmakokinetischen Modells

7.1 IL-8 Hemmung aus Plasmaproben (1h)

IL-8 Konz. (pg/mL)	I	II	III	IV	MW \pm MAbM
Kontrolle	318	342	333	357	338 \pm 12
FP GG	59	57	52	-	56 \pm 3
FP VG	87	91	95	-	91 \pm 3
AZ GG	307	290	322	-	306 \pm 11
AZ VG	382	378	381	-	380 \pm 1
P +LPS	490	442	388	448	442 \pm 27
M -LPS	161	-	-	-	-
M +LPS	253	289	-	-	271

MW Mittelwert

MAbM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

7.1.1 Zellviabilität

IL-8 Konz. (pg/mL)	I	II	III	IV	MW
Kontrolle	1.43 * 10 ⁶	1.86 * 10 ⁶	1.74 * 10 ⁶	1.46 * 10 ⁶	1.72 * 10 ⁶
FP GG	1.46 * 10 ⁶	1.32 * 10 ⁶	1.73 * 10 ⁶	-	1.50 * 10 ⁶
FP VG	1.40 * 10 ⁶	1.58 * 10 ⁶	1.68 * 10 ⁶	-	1.55 * 10 ⁶
AZ GG	1.49 * 10 ⁶	1.40 * 10 ⁶	1.55 * 10 ⁶	-	1.48 * 10 ⁶
AZ VG	1.44 * 10 ⁶	1.83 * 10 ⁶	1.70 * 10 ⁶	-	1.66 * 10 ⁶
P +LPS	1.62 * 10 ⁶	1.64 * 10 ⁶	1.83 * 10 ⁶	1.61 * 10 ⁶	1.67 * 10 ⁶
M -LPS	1.62 * 10 ⁶	-	-	-	-
M +LPS	1.71 * 10 ⁶	1.85 * 10 ⁶	-	-	1.78 * 10 ⁶

MW Mittelwert

MAbM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

7.2 IL-8 Hemmung aus Plasmaproben (1-3h)

IL-8 Konz. (pg/mL)	I	II	III	IV	MW ± MAbM
Kontrolle	465	464	478	473	470 ± 6
FP GG	133	119	92	-	115 ± 15
FP VG	144	140	122	-	135 ± 9
AZ GG	418	409	377	-	402 ± 16
AZ VG	426	416	406	-	416 ± 7
P +LPS	456	367	478	454	439 ± 36
M -LPS	224	-	-	-	-
M +LPS	313	330	-	-	322

MW Mittelwert MAbM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

7.2.1 Zellviabilität

IL-8 Konz. (pg/mL)	I	II	III	IV	MW
Kontrolle	1.79 * 10 ⁶	1.52 * 10 ⁶	1.71 * 10 ⁶	1.49 * 10 ⁶	1.62 * 10 ⁶
FP GG	1.46 * 10 ⁶	1.44 * 10 ⁶	1.43 * 10 ⁶	-	1.44 * 10 ⁶
FP VG	1.40 * 10 ⁶	1.41 * 10 ⁶	1.64 * 10 ⁶	-	1.48 * 10 ⁶
AZ GG	1.47 * 10 ⁶	1.38 * 10 ⁶	1.49 * 10 ⁶	-	1.45 * 10 ⁶
AZ VG	1.68 * 10 ⁶	1.61 * 10 ⁶	1.37 * 10 ⁶	-	1.55 * 10 ⁶
P +LPS	1.83 * 10 ⁶	1.74 * 10 ⁶	1.67 * 10 ⁶	1.76 * 10 ⁶	1.75 * 10 ⁶
M -LPS	1.47 * 10 ⁶	-	-	-	-
M +LPS	1.56 * 10 ⁶	1.65 * 10 ⁶	-	-	1.61 * 10 ⁶

MW Mittelwert MAbM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

E Zusammenfassung

Zusammenfassung

Intranasale Glucocorticoide stellen aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften eine effektive und sichere Therapie der allergischen Rhinitis dar. Sie führen zu einer Linderung aller Symptome dieser allergischen Erkrankung, einschließlich der okularen Symptome einer Begleitkonjunktivitis. Die geringe Wasserlöslichkeit der Substanzen führte zur Einführung von wässrigen Glucocorticoid-Suspensionen. Die topische Applikation in der Nasenhöhle sorgt für hohe Wirkstoffkonzentrationen im Zielgewebe und gleichzeitig eine geringe systemische Belastung des Körpers.

Ziel dieser Arbeit war es, die intranasalen pharmakokinetischen Abläufe nach topischer Applikation mittels *in vitro* und *ex vivo* Experimenten zu charakterisieren und ihre Auswirkungen auf die Pharmakodynamik zu beschreiben. Es wurden hierbei die nasal angewendeten Glucocorticoide Triamcinolonacetonid (TCA), Budesonid (Bud), Beclomethasondipropionat (BDP), Fluticasonpropionat (FP), Mometasonfuroat (MF) und Fluticasonfuroat (FF) sowie ihre handelsüblichen Präparate Nasacort® (TCA), Budes® (Bud), ratioAllerg® (BDP), Flutide® Nasal (FP), Nasonex® (MF) und Avamys® (FF) untersucht. Dazu wurden Modelle entwickelt, die die Zusammenhänge zwischen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der untersuchten Wirkstoffformulierungen in größtmöglicher Annäherung an physiologische Verhältnisse simulierten.

Zum Aufbringen der Wirkstoffsuspension auf die nasale Mukosa durch den Patienten kommen Dosierpumpsprays zum Einsatz, deren Dosiervorrichtung das Applikationsvolumen festlegen. Die Bestimmung des Sprühstoßvolumens unterschiedlicher handelsüblicher Präparate ergab Werte zwischen 56 und 147 µL/Sprühstoß. Das Applikationsvolumen ist zunächst entscheidend für die Verteilung der Wirkstoffsuspension auf der respiratorischen Schleimhaut. Andererseits kann ein Übermaß an Arzneistoffformulierung in der Nasenhöhle zu einem verstärkten Ausfließen in den Rachenraum führen, was von den Patienten als unangenehm empfunden wird und die Compliance negativ beeinflussen kann.

Zum ersten Mal wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte die Glucocorticoidkonzentration in den wässrigen Überständen handelsüblicher Präparate zu bestimmen. Die Wasserlöslichkeit der unterschiedlichen Glucocorticoide sowie die galenische Zusammensetzung der Formulierungen konnten als mögliche Einflussfaktoren für den bereits gelösten Wirkstoffanteil ermittelt werden.

Nach der Applikation der Wirkstoffsuspension auf die Nasenschleimhaut müssen sich zunächst die deponierten Wirkstoffkristalle im Nasensekret lösen. Es wurde ein künstliches Nasensekret (KNS) entwickelt, welches den Einfluss von im nasalen Mukus befindlichen

Proteinen auf die Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit der Arzneistoffkristalle erfassen konnte. So konnte erstmals gezeigt werden, dass die Löslichkeit der Wirkstoffkristalle der lipophileren Substanzen wie BDP, FP, MF und FF durch das KNS signifikant verbessert wurde. Die Löslichkeit der hydrophileren Wirkstoffe wie TCA und Bud wurde durch das KNS dagegen nur leicht beeinflusst.

Nach der Auflösung der Wirkstoffkristalle können die gelösten Moleküle zur cytoplasmatischen Zielstruktur, dem Glucocorticoidrezeptor diffundieren und spezifisch binden. Neben der Rezeptorbindung erfolgt auch eine unspezifische Bindung an Nasengewebe. Eine hohe Gewebefixierung ist zum einen vorteilhaft, da die Wahrscheinlichkeit für eine Rezeptorassoziation über einen längeren Zeitraum nach Applikation erhöht wird. Daneben kommt es zu einer langsamen Umverteilung des gewebegebundenen Wirkstoffs in die systemische Zirkulation, wodurch erwünschte geringe Plasmakonzentrationen erreicht werden. So wurde zunächst mit einem einfachen, bereits etablierten Versuchsaufbau erstmalig die Bindung von FF an Nasengewebe im Vergleich zu anderen Glucocorticoiden *in vitro* untersucht. Die lipophileren Substanzen wie FF, MF und FP grenzten sich hierbei durch eine höhere Gewebefixierung von den hydrophileren TCA und Bud ab. Die Bestimmung der AUC über eine Stunde ergab folgende Klassifikation der Gewebefixierung: FF > FP > MF > Bud > TCA.

Die antiinflammatorische Aktivität intranasaler Glucocorticoide ist verantwortlich für den therapeutischen Nutzen. Deshalb wurde ein neues Modell entwickelt, welches die pharmakokinetische Untersuchung zur Gewebefixierung mit der Pharmakodynamik der Wirkstoffe in Form ihres antiinflammatorischen Effektes im Zellkulturmodell verknüpfen sollte. So wurde wirkstoffgesättigtes Gewebe einer extensiven Auswaschphase in Humanplasma ausgesetzt, um es anschließend mit humanen Lungenepithelzellen zu inkubieren. Es konnte gezeigt werden, dass alle Gewebeproben den Wirkstoff in das Zellkulturmedium freisetzen, was eine Hemmung der IL-8 Sekretion aus Lungenepithelzellen zur Folge hatte. Die Stärke des antiinflammatorischen Effektes der IL-8 Hemmung durch FF, FP, Bud und TCA entsprach der Kombination aus Gewebefixierung und intrinsischer Aktivität (Rezeptoraffinität) der Wirkstoffe. Gewebeproben des MF führten zur geringsten IL-8 Hemmung, was durch die chemische Instabilität der Substanz erklärt werden konnte.

Um eine weitere Annäherung an physiologische Verhältnisse zu erreichen, wurde erfolgreich ein Modell entwickelt, welches nach Applikation der Suspension auf die Mukosa die pharmakokinetischen Abläufe der Auflösung der Kristalle im Nasensekret, der mukoziliären Clearance, der Diffusion und Retention der Wirkstoffe im Zielgewebe, sowie der Umverteilung der gebundenen Substanz in das Blutkompartiment gleichzeitig simulieren sollte. Dafür entscheidend war die Einbettung respiratorischen Gewebes in eine Gel-Matrix, wodurch eine

zusammenhängende Mukosa-ähnliche Oberfläche erreicht werden konnte. Als Modellsubstanzen wurden Bud aus Budes[®]-Nasenspray und FP aus Flutide[®] Nasal sowie als Vertreter der Antihistaminika Azelastin-HCl (AZ-HCl) aus Vividrin[®] akut eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Gewebefindung des AZ-HCl im Vergleich zu den Glucocorticoiden am höchsten war, was zum einen mit der Zubereitungsform des AZ als wässrig gelöstes Salz, zum anderen durch die höhere Lipophilie des Wirkstoffs erklärt werden konnte. Die gute Korrelation der Gewebefindung der Substanzen mit ihrem Verteilungsvolumen und der Vergleich von FP mit Bud zeigte die erfolgreiche Etablierung des Modells. Beide Glucocorticoide zeigten nach Applikation der Wirkstoff suspension zunächst eine ähnliche Assoziation an das Gewebe. Bei der Inkubation der Gewebe-Gel-Matrix mit Humanplasma wurde schließlich Fluticasonpropionat aus der Gewebe-Gel-Bindung im Vergleich zu Budesonid langsam freigesetzt.

Weiterhin wurde im Gewebe-Gel-Modell die Bedeutung der Pharmakokinetik der Wirkstoffe auf die Pharmakodynamik ermittelt. Es wurden Freisetzungspuren der Gewebe-Gel-Matrices von AZ-HCl und FP auf ihre antiinflammatorische Aktivität untersucht. Die deutlich höhere Bindung des AZ-HCl an die Gewebe-Gel-Matrix äußerte sich auch in höheren Plasmakonzentrationen bei der Freisetzung im Vergleich zu FP. Jedoch konnte im Zellkulturmodell gezeigt werden, dass die Hemmung der IL-8 Freisetzung des FP, trotz der geringeren Konzentration in der Freisetzungsmatrix, das antiinflammatorische Potential des AZ-HCl übertraf. Damit wurde erstmals erfolgreich ein Modell entwickelt, welches die pharmakokinetischen Vorgänge nach nasaler Applikation in größtmöglicher Annäherung an physiologische Verhältnisse erfasst und gleichzeitig Untersuchungen zur Pharmakodynamik der Wirkstoffe ermöglicht.

Summary

Intranasal glucocorticoids allow an efficacious and safe therapy of allergic rhinitis due to their pharmacologic properties. They alleviate all symptoms of this allergic disease, including the ocular symptoms of concomitant conjunctivitis. The poor water solubility of the compounds led to the introduction of aqueous glucocorticoid suspensions. Topical administration in the nasal cavity causes high drug concentration at the target site, which is simultaneously associated with a low systemic drug exposure.

The aim of this thesis was to characterize the intranasal pharmacokinetics after topical administration using *in vitro* and *ex vivo* experiments and to assess their impact on pharmacodynamic effects. Therefore the nasal glucocorticoids triamcinolone acetonide (TCA), budesonide (Bud), beclomethasone dipropionate (BDP), fluticasone propionate (FP), mometasone furoate (MF) and fluticasone furoate (FF) and their commercially available preparations Nasacort[®] (TCA), Budes[®] (Bud), ratioAllerg[®] (BDP), Flutide[®] Nasal (FP), Nasonex[®] (MF) and Avamys[®] (FF) were part of the analysis. For this purpose models were established to elucidate the relation between the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the glucocorticoid suspensions in an approach close to physiologic conditions.

As delivery device metered-dose pump sprays are used to deposit the drug suspension on the nasal mucosa. Their dosing system defines the volume of administration. The determination of the spray volume of different commercially available nasal pump sprays revealed results between 56 and 147 $\mu\text{L}/\text{volume}$ per spray. The volume of administration is important for the distribution of the drug suspension on the respiratory mucosa. Any excess of application volume in the nasal cavity results in nose runoff or drip down the throat, which causes an unpleasant sensation by the patient and possibly impairs compliance.

For the first time a method was developed which permitted the determination of glucocorticoid concentrations in the aqueous supernatants of commercially available drug suspensions. Both water solubility of the different compounds and the galenics of the formulation were found to affect the proportion of solute glucocorticoid in the supernatant.

After administration of the drug suspension on the nasal mucosa the drug crystals have to dissolve in the epithelial fluid mucus layer. An artificial nasal fluid (ANF) was developed to determine the impact of proteins in the nasal mucus on the solubility and the dissolution rate of drug crystals. For the first time it was shown that the solubility of the more lipophilic compounds BDP, FP, MF and FF was significantly enhanced in ANF. In contrast, the solubility of the more hydrophilic drugs TCA and Bud was only slightly influenced by ANF.

After dissolution of the drug crystals the solubilised molecules can reach their

cytoplasmatic target, the glucocorticoid receptor, and bind specifically. Beside the receptor binding a nonspecific tissue binding to nasal tissue occurs. On the one hand a high tissue binding is desirable to increase the probability of occupying the receptor for a prolonged time. In addition, tissue-bound glucocorticoid slows down the redistribution of the drug into the systemic circulation delivering desired low plasma concentrations. In an established experimental set-up the binding of FF compared to different glucocorticoids to nasal tissue *in vitro* was analysed for the first time. The more lipophilic compounds FP, MF and FF revealed higher tissue binding and differed from the more hydrophilic TCA and Bud with less tissue-bound drug. The analysis of AUC for one hour revealed the highest tissue binding for FF followed by $FP > MF > Bud > TCA$.

The anti-inflammatory activity of intranasal glucocorticoids is responsible for their therapeutic benefit. A new model was established connecting the pharmacokinetic assay of tissue binding with the anti-inflammatory activity of the drugs in cell culture. Therefore, glucocorticoid-saturated tissue samples were extensively washed in human plasma and then incubated with human lung epithelial cells. All tissue samples released tissue bound drug into cell culture medium and decreased the IL-8 secretion of the cells. The intensity of the anti-inflammatory effect of IL-8 inhibition by FF, FP, Bud and TCA was in good correlation with both their tissue retention and their intrinsic activity (receptor affinity). Tissue samples of MF resulted in the least IL-8 inhibition. The chemical instability of MF explained this observation of lower anti-inflammatory activity.

To converge physiologic conditions a new model was successfully established which allowed the simulation of the pharmacokinetic course of events after administration of the formulation on the mucosa, the dissolution of crystals in nasal mucus, the mucociliary clearance, the diffusion and retention of drugs at the target tissue and the redistribution of the bound drug into the blood compartment. The hallmark of this approach was the embedding of respiratory tissue in a gel matrix simulating a coherent mucosa-like surface. Both glucocorticoids Bud (Budes[®] nasal spray) and FP (Flutide[®] Nasal) and Azelastine-HCl (AZ-HCl, Vividrin[®] akut) as a representative of antihistamines were analysed. The experiments showed highest tissue binding for AZ-HCl compared to the glucocorticoids. On the one hand this was due to the application of AZ as a salt in solution, on the other hand it was ascribed to the high lipophilicity of the drug. Good correlation of drug tissue binding with the drug's volume of distribution reflected the successful introduction of the model. After application of drug suspensions both glucocorticoids showed a similar association to the tissue. Incubation of the tissue-gel matrix in human plasma revealed in a slower release of FP compared to Bud.

Moreover, the impact of pharmacokinetics for the pharmacodynamic effect was analysed

in the tissue-gel-model. Samples of tissue gel incubation in human plasma from both AZ-HCl and FP were analysed for their anti-inflammatory activity. The clearly higher binding of AZ-HCl to the tissue-gel matrix yielded higher plasma concentrations compared to FP. However, the experiments revealed that the inhibition of the IL-8 release by FP samples exceeded the anti-inflammatory potential of AZ-HCl samples. Thus, for the first time an experimental model was successfully developed which simulated the pharmacokinetic course of events after nasal application in an approach close to physiologic conditions and additionally enabled pharmacodynamic investigations of the compounds.

F Abkürzungsverzeichnis

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

Amci	Amcinonid
AP	activator protein
APC	antigenpräsentierende Zellen
AUC	area under the curve
BDP	Beclomethasondipropionat
17-BMP	Beclomethason-17-monopropionat
BSA	Bovines Serumalbumin
Bud	Budesonid
CD	cluster of differentiation
Da	Dalton
9,11-Epoxy-MF	Mometason-17-(2-furoat)-9,11-epoxid
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe
FP	Fluticason-17-propionat
FF	Fluticasonfuroat
<i>g</i>	mittlere Erdbeschleunigung ($1g = 9.81 \text{ m/s}^2$)
GC	Glucocorticoid(e)
GG	Gewebe-Gel
GI	gastrointestinal
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPLC	high performance liquid chromatography
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
ISD	interner Standard
KNS	künstliches Nasensekret
MABM	mittlere Abweichung vom Mittelwert
MeOH	Methanol
MF	Mometasonfuroat
MHC	major histocompatibility complex
MMAD	mass median aerodynamic diameter
MW	Mittelwert
MWCO	molecular weight cut off

NFκB	nuclear factor “kappa light chain enhancer” of activated B cells
NSB	nichtspezifische Bindung
PBS	phosphate buffered saline
rpm	round per minute
Stabw	Standardabweichung
TCA	Triamcinolonacetonid
TF	Transkriptionsfaktor
VG	Vergleichsgel

G Literaturverzeichnis

1. Boenninghaus HG, Lenarz T: HNO. ed 13, Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2007.
2. Dahl R, Mygind N: Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29:3-12.
3. Thews G, Mutschler E, Vaupel P: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. ed 5, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999.
4. Saloga J, Klimek L, Buhl R, Knop J: Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis. ed 1, Stuttgart, Schattauer, 2006.
5. Beule AG: [Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses]. *Laryngorhinootologie* 2010;89 Suppl 1:15-34.
6. Jones N: The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;51:5-19.
7. Junqueira LC, Carneiro J: Histologie. ed 6, Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2005.
8. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Baena-Cagnani CE, Canonica GW, van Weel C, Agache I, Ait-Khaled N, Bachert C, Blaiss MS, Bonini S, Boulet LP, Bousquet PJ et al.: Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63 Suppl 86:8-160.
9. Bachert C, Borchard U, Wedi B, Klimek L, Rasp G, Riechelmann H, Schultze-Werninghaus G, Wahn U, Ring J: Leitlinie der DGAI zur allergischen Rhinokonjunktivitis. *Allergologie* 2003;26:147-162.
10. Canonica GW, Compalati E: Minimal persistent inflammation in allergic rhinitis: implications for current treatment strategies. *Clin Exp Immunol* 2009;158:260-271.
11. Ciprandi G, Passalacqua G: Emerging anti-inflammatory agents for allergic rhinitis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2005;10:689-705.
12. Poulsen LK, Hummelshoj L: Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med* 2007;39:440-456.
13. Hansen I, Klimek L, Mosges R, Hormann K: Mediators of inflammation in the early and the late phase of allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:159-163.
14. Min YG: The pathophysiology, diagnosis and treatment of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2010;2:65-76.
15. Okano M: Mechanisms and clinical implications of glucocorticosteroids in the treatment of allergic rhinitis. *Clin Exp Immunol* 2009;158:164-173.

16. Rasp G: [Eosinophil inflammation of the nasal mucosa]. *Laryngorhinootologie* 2002;81:491-498.
17. Shaaban R, Zureik M, Soussan D, Neukirch C, Heinrich J, Sunyer J, Wjst M, Cerveri I, Pin I, Bousquet J, Jarvis D, Burney PG, Neukirch F, Leynaert B: Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study. *Lancet* 2008;372:1049-1057.
18. Rimmer J, Ruhno JW: Rhinitis and asthma: united airway disease. *Med J Aust* 2006;185:565-571.
19. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Meier C, Taeumer T, Buhl R: A single nasal allergen challenge increases induced sputum inflammatory markers in non-asthmatic subjects with seasonal allergic rhinitis: correlation with plasma interleukin-5. *Clin Exp Allergy* 2003;33:475-482.
20. Braunstahl GJ, Kleinjan A, Overbeek SE, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ: Segmental bronchial provocation induces nasal inflammation in allergic rhinitis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:2051-2057.
21. Crim C, Pierre LN, Daley-Yates PT: A review of the pharmacology and pharmacokinetics of inhaled fluticasone propionate and mometasone furoate. *Clin Ther* 2001;23:1339-1354.
22. Szeffler SJ: Pharmacokinetics of intranasal corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S26-31.
23. Derendorf H, Meltzer EO: Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: clinical and therapeutic implications. *Allergy* 2008;63:1292-1300.
24. Biggadike K, Bledsoe RK, Coe DM, Cooper TW, House D, Iannone MA, Macdonald SJ, Madauss KP, McLay IM, Shipley TJ, Taylor SJ, Tran TB, Uings IJ, Weller V, Williams SP: Design and x-ray crystal structures of high-potency nonsteroidal glucocorticoid agonists exploiting a novel binding site on the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18114-18119.
25. Corren J: Intranasal corticosteroids for allergic rhinitis: how do different agents compare? *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:S144-149.
26. Demoly P: Safety of intranasal corticosteroids in acute rhinosinusitis. *Am J Otolaryngol* 2008;29:403-413.
27. Chaplin MD, Cooper WC, Segre EJ, Oren J, Jones RE, Nerenberg C: Correlation of flunisolide plasma levels to eosinopenic response in humans. *J Allergy Clin Immunol* 1980;65:445-453.
28. Daley-Yates PT, Price AC, Sisson JR, Pereira A, Dallow N: Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:400-409.
29. Allen DB: Systemic effects of intranasal steroids: an endocrinologist's perspective. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:S179-190.

30. Thorsson L, Borga O, Edsbacker S: Systemic availability of budesonide after nasal administration of three different formulations: pressurized aerosol, aqueous pump spray, and powder. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47:619-624.
31. Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland: Fachinformation Budes[®] Nasenspray. Stand der Information: Februar 2010.
32. Daley-Yates PT, Richards DH: Relationship between systemic corticosteroid exposure and growth velocity: development and validation of a pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Clin Ther* 2004;26:1905-1919.
33. Klimek L, Bachert C: [Current aspects of nasal glucocorticosteroid therapy]. *HNO* 2000;48:544-555.
34. Daley-Yates PT, Baker RC: Systemic bioavailability of fluticasone propionate administered as nasal drops and aqueous nasal spray formulations. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:103-105.
35. Essex Pharma GmbH, München, Deutschland: Fachinformation Nasonex[®]. Stand der Information: August 2008.
36. GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München, Deutschland: Fachinformation Avamys[®]. Stand der Information: Dezember 2009.
37. Lipworth BJ, Jackson CM: Safety of inhaled and intranasal corticosteroids: lessons for the new millennium. *Drug Saf* 2000;23:11-33.
38. Dr. Gerhard Mann, Chemisch pharmazeutische Fabrik GmbH, Berlin, Deutschland: Fachinformation Dexa-Rhinospray[®] N sine. Stand der Information: Dezember 2008.
39. Hogger P: [What happens in the body with glucocorticoids? Pharmacokinetics and pharmacodynamics]. *Pharm Unserer Zeit* 2003;32:296-301.
40. Bernstein DI, Levy AL, Hampel FC, Baidoo CA, Cook CK, Philpot EE, Rickard KA: Treatment with intranasal fluticasone propionate significantly improves ocular symptoms in patients with seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2004;34:952-957.
41. Naclerio R: Intranasal corticosteroids reduce ocular symptoms associated with allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;138:129-139.
42. Högger P, Rohdewald P: Glucocorticoid receptors and fluticasone propionate. *Rev Contemp Pharmacother* 1998;9:501-522.
43. Hatz HJ: Glucocorticoide, Immunologische Grundlagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien. ed 2, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2005.
44. Stahn C, Buttgerit F: Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4:525-533.
45. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G: The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 2003;24:488-522.

46. Day JH, Briscoe MP, Rafeiro E, Ellis AK, Pettersson E, Akerlund A: Onset of action of intranasal budesonide (Rhinocort aqua) in seasonal allergic rhinitis studied in a controlled exposure model. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:489-494.
47. Tillmann HC, Stuck BA, Feuring M, Rossol-Haseroth K, Tran BM, Losel R, Schmidt BM, Hormann K, Wehling M, Schultz A: Delayed genomic and acute nongenomic action of glucocorticosteroids in seasonal allergic rhinitis. *Eur J Clin Invest* 2004;34:67-73.
48. Lumry WR: A review of the preclinical and clinical data of newer intranasal steroids used in the treatment of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:S150-158.
49. Verret DJ, Marple BF: Effect of topical nasal steroid sprays on nasal mucosa and ciliary function. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:14-18.
50. Schenkel EJ, Skoner DP, Bronsky EA, Miller SD, Pearlman DS, Rooklin A, Rosen JP, Ruff ME, Vandewalker ML, Wanderer A, Damaraju CV, Nolop KB, Mesarina-Wicki B: Absence of growth retardation in children with perennial allergic rhinitis after one year of treatment with mometasone furoate aqueous nasal spray. *Pediatrics* 2000;105:E22.
51. Gradman J, Caldwell MF, Wolthers OD: A 2-week, crossover study to investigate the effect of fluticasone furoate nasal spray on short-term growth in children with allergic rhinitis. *Clin Ther* 2007;29:1738-1747.
52. Skoner DP, Gentile DA, Doyle WJ: Effect on growth of long-term treatment with intranasal triamcinolone acetonide aqueous in children with allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;101:431-436.
53. Murphy K, Uryniak T, Simpson B, O'Dowd L: Growth velocity in children with perennial allergic rhinitis treated with budesonide aqueous nasal spray. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:723-730.
54. Allen DB, Meltzer EO, Lemanske RF, Jr., Philpot EE, Faris MA, Kral KM, Prillaman BA, Rickard KA: No growth suppression in children treated with the maximum recommended dose of fluticasone propionate aqueous nasal spray for one year. *Allergy Asthma Proc* 2002;23:407-413.
55. Skoner DP, Rachelefsky GS, Meltzer EO, Chervinsky P, Morris RM, Seltzer JM, Storms WW, Wood RA: Detection of growth suppression in children during treatment with intranasal beclomethasone dipropionate. *Pediatrics* 2000;105:E23.
56. Mygind N, Andersson M: Topical glucocorticosteroids in rhinitis: clinical aspects. *Acta Otolaryngol* 2006;126:1022-1029.
57. Newman SP, Moren F, Clarke SW: Deposition pattern from a nasal pump spray. *Rhinology* 1987;25:77-82.
58. Hallworth GW, Padfield JM: A comparison of the regional deposition in a model nose of a drug discharged from metered aerosol and metered-pump nasal delivery systems. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:348-353.
59. Mygind N, Vesterhauge S: Aerosol distribution in the nose. *Rhinology* 1978;16:79-88.

60. Block LH, Patel RN: Solubility and dissolution of triamcinolone acetonide. *J Pharm Sci* 1973;62:617-621.
61. Lexmuller K, Gullstrand H, Axelsson BO, Sjolín P, Korn SH, Silberstein DS, Miller-Larsson A: Differences in endogenous esterification and retention in the rat trachea between budesonide and ciclesonide active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1788-1796.
62. Pham S, Wiedmann TS: Note: dissolution of aerosol particles of budesonide in Survanta, a model lung surfactant. *J Pharm Sci* 2001;90:98-104.
63. Newman SP, Moren PF, Clarke SW: The nasal distribution of metered dose inhalers. *J Laryngol Otol* 1987;101:127-132.
64. Lieberman H, Rieger M, Banker G: *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*. ed 2, New York, Marcel Dekker, 1996.
65. Guo Y, Laube B, Dalby R: The effect of formulation variables and breathing patterns on the site of nasal deposition in an anatomically correct model. *Pharm Res* 2005;22:1871-1878.
66. Harris AS, Svensson E, Wagner ZG, Lethagen S, Nilsson IM: Effect of viscosity on particle size, deposition, and clearance of nasal delivery systems containing desmopressin. *J Pharm Sci* 1988;77:405-408.
67. Sikora C: *Einfluss von Rezepturverbesserungen auf die Zytotoxizität von Nasalia*. Medizinische Fakultät, Universität Greifswald, 2004.
68. Hong-xun H, Jing-kang W, Wang Y-l: Solubility of Dexamethasone Sodium Phosphate in Different Solvents. *J Chem Eng Data*, 2004;49:1697-1698.
69. Bonsmann U, Bachert C, Delank KW, Rohdewald P: 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;56:532-535.
70. Alsenz J, Kansy M: High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:546-567.
71. Dokoumetzidis A, Macheras P: A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *Int J Pharm* 2006;321:1-11.
72. Kerns EH, Di L, Carter GT: In vitro solubility assays in drug discovery. *Curr Drug Metab* 2008;9:879-885.
73. Hunnius C, Burger A, Wachter H: *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*. ed 8, Berlin, De Gruyter, 1998.
74. Högger P, Rawert J, Rohdewald P: Dissolution, tissue binding and kinetics of receptor binding of inhaled glucocorticoids. *Eur Respir J* 1993;6 Suppl 17:584.
75. Melin T, Rautenbach R: *Membranverfahren*. ed 2, Berlin, Springer-Verlag, 2003.

76. Taylor S, Harker A: Modification of the ultrafiltration technique to overcome solubility and non-specific binding challenges associated with the measurement of plasma protein binding of corticosteroids. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41:299-303.
77. Day J, Carrillo T: Comparison of the efficacy of budesonide and fluticasone propionate aqueous nasal spray for once daily treatment of perennial allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:902-908.
78. Berkowitz RB, Bernstein DI, LaForce C, Pedinoff AJ, Rooklin AR, Damaraju CR, Mesarina-Wicki B, Nolop KB: Onset of action of mometasone furoate nasal spray (NASONEX) in seasonal allergic rhinitis. *Allergy* 1999;54:64-69.
79. Munk ZM, LaForce C, Furst JA, Simpson B, Feiss G, Smith JA: Efficacy and safety of triamcinolone acetonide aqueous nasal spray in patients with seasonal allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;77:277-281.
80. Kaiser HB, Naclerio RM, Given J, Toler TN, Ellsworth A, Philpot EE: Fluticasone furoate nasal spray: a single treatment option for the symptoms of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1430-1437.
81. Day JH, Buckeridge DL, Clark RH, Briscoe MP, Phillips R: A randomized, double-blind, placebo-controlled, controlled antigen delivery study of the onset of action of aerosolized triamcinolone acetonide nasal spray in subjects with ragweed-induced allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1050-1057.
82. Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, Buttgereit F: Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275:71-78.
83. Goulding NJ: The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation - a four-ring circus. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:629-636.
84. Bachert C, Geveart P: Effect of intranasal corticosteroids on release of cytokines and inflammatory mediators. *Allergy* 1999;54 Suppl 57:116-123.
85. Junghanns JU, Muller RH: Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine* 2008;3:295-309.
86. Keck CM, Muller RH: Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;62:3-16.
87. Simonelli AP, Mehta SC, Higuchi WI: Inhibition of sulfathiazole crystal growth by polyvinylpyrrolidone. *J Pharm Sci* 1970;59:633-638.
88. Grant DJW, Brittain HG: Solubility of pharmaceutical solids. in Brittain HG (ed): *Physical characterization of pharmaceutical solids*. New York, Marcel Dekker, 1995, 321-386.
89. Voigt R: *Pharmazeutische Technologie*. ed 10, Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag, 2006.
90. Torrado G, Fraile S, Torrado S, Torrado S: Process-induced crystallite size and dissolution changes elucidated by a variety of analytical methods. *Int. J. Pharm.* 1998;166:65-63.

91. Burgess DJ, Duffy E, Etzler F, Hickey AJ: Particle size analysis: AAPS workshop report, cosponsored by the Food and Drug Administration and the United States Pharmacopeia. *AAPS J* 2004;6:e20.
92. Arora P, Sharma S, Garg S: Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discov Today* 2002;7:967-975.
93. Doub WH, Adams WP, Spencer JA, Buhse LF, Nelson MP, Treado PJ: Raman chemical imaging for ingredient-specific particle size characterization of aqueous suspension nasal spray formulations: a progress report. *Pharm Res* 2007;24:934-945.
94. Jacobs C: Neue Nanosuspensionsformulierungen für verschiedene Applikationsformen Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin, 2003.
95. Howard SA, Mauger J, Hsieh JW, Amin K: Suspending agent effects on steroid suspension dissolution profiles. *J Pharm Sci* 1979;68:1475-1479.
96. Furrer P, Mayer JM, Gurny R: Ocular tolerance of preservatives and alternatives. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;53:263-280.
97. Vidgren MT, Kublik H: Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29:157-177.
98. Kircher W: Nasensprays richtig anwenden. *DAZ* 2008;45. <http://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-ausgabe/artikel/articlesingle/2008/45/27533.html>
99. Berger WE, Godfrey JW, Slater AL: Intranasal corticosteroids: the development of a drug delivery device for fluticasone furoate as a potential step toward improved compliance. *Expert Opin Drug Deliv* 2007;4:689-701.
100. Shah SR, Miller C, Pethick N, Uryniak T, Jones MK, O'Dowd L: Two multicenter, randomized, single-blind, single-dose, crossover studies of specific sensory attributes of budesonide aqueous nasal spray and fluticasone propionate nasal spray. *Clin Ther* 2003;25:2198-2214.
101. Stokes M, Amorosi SL, Thompson D, Dupclay L, Garcia J, Georges G: Evaluation of patients' preferences for triamcinolone acetonide aqueous, fluticasone propionate, and mometasone furoate nasal sprays in patients with allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:225-231.
102. Mahadevia PJ, Shah S, Leibman C, Kleinman L, O'Dowd L: Patient preferences for sensory attributes of intranasal corticosteroids and willingness to adhere to prescribed therapy for allergic rhinitis: a conjoint analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:345-350.
103. Harding SM: The human pharmacology of fluticasone propionate. *Respir Med* 1990;84 Suppl A:25-29.
104. Winkler J, Hochhaus G, Derendorf H: How the lung handles drugs: pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:356-363.

105. Goyal N, Hochhaus G: Fluticasone furoate nasal spray in allergic rhinitis. *Drugs Today (Barc)* 2008;44:251-260.
106. Hughes SC, Shardlow PC, Hollis FJ, Scott RJ, Motivaras DS, Allen A, Rousell VM: Metabolism and disposition of fluticasone furoate, an enhanced-affinity glucocorticoid, in humans. *Drug Metab Dispos* 2008;36:2337-2344.
107. McLean JA, Bacon JR, Mathews KP, Thrall JH, Banas JM, Hedden J, Bayne NK: Distribution and clearance of radioactive aerosol on the nasal mucosa. *Rhinology* 1984;22:65-75.
108. Newman SP, Moren F, Clarke SW: Deposition pattern of nasal sprays in man. *Rhinology* 1988;26:111-120.
109. Hardy JG, Lee SW, Wilson CG: Intranasal drug delivery by spray and drops. *J Pharm Pharmacol* 1985;37:294-297.
110. Harris AS, Nilsson IM, Wagner ZG, Alkner U: Intranasal administration of peptides: nasal deposition, biological response, and absorption of desmopressin. *J Pharm Sci* 1986;75:1085-1088.
111. Khanna P, Shah A: Assessment of sensory perceptions and patient preference for intranasal corticosteroid sprays in allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 2005;19:316-321.
112. Meltzer EO, Bardelas J, Goldsobel A, Kaiser H: A preference evaluation study comparing the sensory attributes of mometasone furoate and fluticasone propionate nasal sprays by patients with allergic rhinitis. *Treat Respir Med* 2005;4:289-296.
113. Herman H: Once-daily administration of intranasal corticosteroids for allergic rhinitis: a comparative review of efficacy, safety, patient preference, and cost. *Am J Rhinol* 2007;21:70-79.
114. Meltzer EO, Stahlman JE, Leflein J, Meltzer S, Lim J, Dalal AA, Prillaman BA, Philpot EE: Preferences of adult patients with allergic rhinitis for the sensory attributes of fluticasone furoate versus fluticasone propionate nasal sprays: a randomized, multicenter, double-blind, single-dose, crossover study. *Clin Ther* 2008;30:271-279.
115. Sharpe SA, Sandweiss V, Tuazon J, Giordano M, Witchey-Lakshmanan L, Hart J, Sequeira J: Comparison of the flow properties of aqueous suspension corticosteroid nasal sprays under differing sampling conditions. *Drug Dev Ind Pharm* 2003;29:1005-1012.
116. Quraishi MS, Jones NS, Mason JD: The nasal delivery of drugs. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1997;22:289-301.
117. Junginger HE, Lehr CM: Bioadhäsive Arzneistoffabgabesysteme und Arzneiformen für perorale und rektale Anwendung. *DAZ* 1990;130:791-797.
118. Lorin MI, Gaerlan PF, Mandel ID: Quantitative composition of nasal secretions in normal subjects. *J Lab Clin Med* 1972;80:275-281.
119. Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR: Drug transfer through mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;48:173-193.

120. Kornfeld R, Kornfeld S: Comparative aspects of glycoprotein structure. *Annu Rev Biochem* 1976;45:217-237.
121. Paulsen F: [Mucins in otorhinolaryngology]. *HNO* 2002;50:209-216.
122. Merkus FW, Verhoef JC, Schipper NG, Marttin E: Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29:13-38.
123. Sanderson MJ, Sleight MA: Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony. *J Cell Sci* 1981;47:331-347.
124. Clary-Meinesz CF, Cosson J, Huitorel P, Blaive B: Temperature effect on the ciliary beat frequency of human nasal and tracheal ciliated cells. *Biol Cell* 1992;76:335-338.
125. Cole P: Physiology of the nose and paranasal sinuses. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998;16:25-54.
126. Gizurarson S: Animal models for intranasal drug delivery studies. A review article. *Acta Pharm Nord* 1990;2:105-122.
127. Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, Pue CA, Mentz WM, Wager GC, Gatzky JT, Boucher RC: Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest* 1997;100:2588-2595.
128. Verkman AS, Song Y, Thiagarajah JR: Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C2-15.
129. Igarashi Y, Skoner DP, Doyle WJ, White MV, Fireman P, Kaliner MA: Analysis of nasal secretions during experimental rhinovirus upper respiratory infections. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:722-731.
130. Ruocco L, Fattori B, Romanelli A, Martelloni M, Casani A, Samolewska M, Rezzonico R: A new collection method for the evaluation of nasal mucus proteins. *Clin Exp Allergy* 1998;28:881-888.
131. Eichner H: Present possibilities for diagnosis in human nasal secretions. *Rhinology* 1983;21:223-228.
132. Lindemann J, Keck T, Scheithauer MO, Leiacker R, Wiesmiller K: Nasal mucosal temperature in relation to nasal airflow as measured by rhinomanometry. *Am J Rhinol* 2007;21:46-49.
133. Hochhaus G: Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of mometasone furoate nasal spray: potential effects on clinical safety and efficacy. *Clin Ther* 2008;30:1-13.
134. Wang J, Bu G: Influence of the nasal mucociliary system on intranasal drug administration. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:647-649.
135. Berridge MS, Heald DL, Muswick GJ, Leisure GP, Voelker KW, Miraldi F: Biodistribution and kinetics of nasal carbon-11-triamcinolone acetonide. *J Nucl Med* 1998;39:1972-1977.

136. Harris AS, Ohlin M, Svensson E, Lethagen S, Nilsson IM: Effect of viscosity on the pharmacokinetics and biological response to intranasal desmopressin. *J Pharm Sci* 1989;78:470-471.
137. Washington N, Steele RJ, Jackson SJ, Bush D, Mason J, Gill DA, Pitt K, Rawlins DA: Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. *Int J Pharm* 2000;198:139-146.
138. Bhat PG, Flanagan DR, Donovan MD: Drug binding through gastric mucus glycoproteins. *Int J Pharm* 1996;134:15-25.
139. Franz JM, Vonderscher JP, Voges R: Contribution to the intestinal absorption of ergot peptide alkaloids *Int J Pharm* 1980;7:19-28.
140. Fahr A, Guitard P, Matthes I, Nimmerfall F, Nuesch E, Sucker H: [Mucus models for investigation of intestinal absorption mechanisms. 3. A mathematical simulation model of drug diffusion through enteral mucus]. *Pharmazie* 1992;47:699-704.
141. Matthes I, Nimmerfall F, Sucker H: [Mucus models for investigation of intestinal absorption mechanisms. 2. Mechanisms of drug interactions with intestinal mucus]. *Pharmazie* 1992;47:609-613.
142. Pires A, Fortuna A, Alves G, Falcao A: Intranasal drug delivery: how, why and what for? *J Pharm Pharm Sci* 2009;12:288-311.
143. Lin H, Yoo JW, Roh HJ, Lee MK, Chung SJ, Shim CK, Kim DD: Transport of anti-allergic drugs across the passage cultured human nasal epithelial cell monolayer. *Eur J Pharm Sci* 2005;26:203-210.
144. McDowall JE, Mackie AE, Bye A, Ventresca GP: Very low systemic exposure to intranasal fluticasone propionate. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:194.
145. Miller-Larsson A, Mattsson H, Hjertberg E, Dahlback M, Tunek A, Brattsand R: Reversible fatty acid conjugation of budesonide. Novel mechanism for prolonged retention of topically applied steroid in airway tissue. *Drug Metab Dispos* 1998;26:623-630.
146. Berger G, Bernheim J, Ophir D: Epithelial shedding of the inferior turbinate in perennial allergic and nonallergic rhinitis: a riddle to solve. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:78-82.
147. Petersen H, Kullberg A, Edsbacker S, Greiff L: Nasal retention of budesonide and fluticasone in man: formation of airway mucosal budesonide-esters in vivo. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:159-163.
148. Valotis A, Hogger P: Human receptor kinetics and lung tissue retention of the enhanced-affinity glucocorticoid fluticasone furoate. *Respir Res* 2007;8:54.
149. Rohdewald P, Bonsmann U, Högger P: Die Bindung inhalativer Glukokortikoide an menschliches Lungengewebe in vitro. in Leupold W, Nolte D (eds): *Neue Aspekte der inhalativen Glukokortikoid-Therapie des Asthma bronchiale*. München-Deisenhofen: Dustri-Verlag, 1995, 14-27.

150. Hogger P: Comparison of the tissue affinity of glucocorticoids to human lung, nasal and skin tissue in vitro. *Arzneimittelforschung* 2001;51:825-831.
151. Esmailpour N, Hogger P, Rohdewald P: Binding of glucocorticoids to human nasal tissue in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:151-154.
152. Wurthwein G, Rohdewald P: Activation of beclomethasone dipropionate by hydrolysis to beclomethasone-17-monopropionate. *Biopharm Drug Dispos* 1990;11:381-394.
153. Würthwein G, Rehder S, Rohdewald P: Lipophilicity and receptor affinity of glucocorticoids. *Pharm Ztg Wiss* 1992;137:161-167.
154. Esmailpour N, Hogger P, Rohdewald P: Binding kinetics of budesonide to the human glucocorticoid receptor. *Eur J Pharm Sci* 1998;6:219-223.
155. Valotis A, Neukam K, Elert O, Hogger P: Human receptor kinetics, tissue binding affinity, and stability of mometasone furoate. *J Pharm Sci* 2004;93:1337-1350.
156. Sachs L: *Angewandte Statistik*. ed 6, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, Springer-Verlag, 1984.
157. Salter M, Biggadike K, Matthews JL, West MR, Haase MV, Farrow SN, Uings IJ, Gray DW: Pharmacological properties of the enhanced-affinity glucocorticoid fluticasone furoate in vitro and in an in vivo model of respiratory inflammatory disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L660-667.
158. Argenti D, Shah B, Heald D: A pharmacokinetic study to evaluate the absolute bioavailability of triamcinolone acetonide following inhalation administration. *J Clin Pharmacol* 1999;39:695-702.
159. Donnelly R, Seale JP: Clinical pharmacokinetics of inhaled budesonide. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:427-440.
160. Derendorf H, Hochhaus G, Meibohm B, Mollmann H, Barth J: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:S440-446.
161. Kelly HW: Pharmaceutical characteristics that influence the clinical efficacy of inhaled corticosteroids. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;91:326-334; quiz 334-325, 404.
162. Allen A, Down G, Newland A, Reynard K, Rousell V, Salmon E, Scott R: Absolute bioavailability of intranasal fluticasone furoate in healthy subjects. *Clin Ther* 2007;29:1415-1420.
163. Pipkorn U, Proud D, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Naclerio RM: Inhibition of mediator release in allergic rhinitis by pretreatment with topical glucocorticosteroids. *N Engl J Med* 1987;316:1506-1510.
164. Waddell AN, Patel SK, Toma AG, Maw AR: Intranasal steroid sprays in the treatment of rhinitis: is one better than another? *J Laryngol Otol* 2003;117:843-845.

165. Okubo K, Nakashima M, Miyake N, Komatsubara M, Okuda M: Comparison of fluticasone furoate and fluticasone propionate for the treatment of Japanese cedar pollinosis. *Allergy Asthma Proc* 2009;30:84-94.
166. Pujols L, Mullol J, Torrego A, Picado C: Glucocorticoid receptors in human airways. *Allergy* 2004;59:1042-1052.
167. Pujols L, Mullol J, Picado C: Glucocorticoid receptor in human respiratory epithelial cells. *Neuroimmunomodulation* 2009;16:290-299.
168. Erin EM, Zacharasiewicz AS, Nicholson GC, Tan AJ, Higgins LA, Williams TJ, Murdoch RD, Durham SR, Barnes PJ, Hansel TT: Topical corticosteroid inhibits interleukin-4, -5 and -13 in nasal secretions following allergen challenge. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1608-1614.
169. Erin EM, Leaker BR, Zacharasiewicz AS, Higgins LA, Williams TJ, Boyce MJ, de Boer P, Durham SR, Barnes PJ, Hansel TT: Single dose topical corticosteroid inhibits IL-5 and IL-13 in nasal lavage following grass pollen challenge. *Allergy* 2005;60:1524-1529.
170. Kleinjan A, Holm AF, Dijkstra MD, Boks SS, Severijnen L, Mulder PG, Fokkens WJ: Preventive treatment of intranasal fluticasone propionate reduces cytokine mRNA expressing cells before and during a single nasal allergen provocation. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1476-1485.
171. Miyahara S, Miyahara N, Matsubara S, Takeda K, Koya T, Gelfand EW: IL-13 is essential to the late-phase response in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1110-1116.
172. Strandberg K, Palmberg L, Larsson K: Effect of budesonide and formoterol on IL-6 and IL-8 release from primary bronchial epithelial cells. *J Asthma* 2008;45:201-203.
173. Korn SH, Jerre A, Brattsand R: Effects of formoterol and budesonide on GM-CSF and IL-8 secretion by triggered human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 2001;17:1070-1077.
174. Ohkubo K, Ikeda M, Pawankar R, Gotoh M, Yagi T, Okuda M: Mechanisms of IL-6, IL-8, and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge. *Rhinology* 1998;36:156-161.
175. Gosset P, Tillie-Leblond I, Malaquin F, Durieu J, Wallaert B, Tonnel AB: Interleukin-8 secretion in patients with allergic rhinitis after an allergen challenge: interleukin-8 is not the main chemotactic factor present in nasal lavages. *Clin Exp Allergy* 1997;27:379-388.
176. Rohatagi S, Appajosyula S, Derendorf H, Szeffler S, Nave R, Zech K, Banerji D: Risk-benefit value of inhaled glucocorticoids: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *J Clin Pharmacol* 2004;44:37-47.
177. Teng XW, Cutler DJ, Davies NM: Mometasone furoate degradation and metabolism in human biological fluids and tissues. *Biopharm Drug Dispos* 2003;24:321-333.
178. Valotis A, Hogger P: Significant receptor affinities of metabolites and a degradation product of mometasone furoate. *Respir Res* 2004;5:7.

-
179. Baumann D, Bachert C, Hogger P: Dissolution in nasal fluid, retention and anti-inflammatory activity of fluticasone furoate in human nasal tissue ex vivo. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1540-1550.
 180. Johnson M: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inhaled glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:169-176.
 181. Bur M, Rothen-Rutishauser B, Huwer H, Lehr CM: A novel cell compatible impingement system to study in vitro drug absorption from dry powder aerosol formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;72:350-357.
 182. Lin H, Li H, Cho HJ, Bian S, Roh HJ, Lee MK, Kim JS, Chung SJ, Shim CK, Kim DD: Air-liquid interface (ALI) culture of human bronchial epithelial cell monolayers as an in vitro model for airway drug transport studies. *J Pharm Sci* 2007;96:341-350.
 183. Meda Pharma GmbH, Wangen-Brüttisellen, Schweiz: Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz, Allergodil®/-saisonal Nasenspray. Stand der Information: Juni 2008.
 184. Benninger MS, Hadley JA, Osguthorpe JD, Marple BF, Leopold DA, Derebery MJ, Hannley M: Techniques of intranasal steroid use. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:5-24.
 185. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frokiss A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC, Wishart DS: DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res* 2011;39:D1035-1041.
 186. Bernstein JA: Azelastine hydrochloride: a review of pharmacology, pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability. *Curr Med Res Opin* 2007;23:2441-2452.
 187. Edsbacker S, Andersson KE, Ryrfeldt A: Nasal bioavailability and systemic effects of the glucocorticoid budesonide in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1985;29:477-481.
 188. Astra Zeneca LP, Wilmington, USA: Rhinocort Aqua® (package insert). Stand der Information: Dezember 2010.
 189. Algorta J, Pena MA, Francisco S, Abajo Z, Sanz E: Randomised, crossover clinical trial, in healthy volunteers, to compare the systemic availability of two topical intranasal budesonide formulations. *Trials* 2008;9:34.
 190. Daley-Yates PT, Kunka RL, Yin Y, Andrews SM, Callejas S, Ng C: Bioavailability of fluticasone propionate and mometasone furoate aqueous nasal sprays. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:265-268.
 191. Horak F, Ziegelmayer UP: Azelastine nasal spray for the treatment of allergic and nonallergic rhinitis. *Expert Rev Clin Immunol* 2009;5:659-669.
 192. van Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Fokkens WJ, Howarth PH, Lund V, Malling HJ, Mygind N, Passali D, Scadding GK, Wang DY: Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. *European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy* 2000;55:116-134.

193. Davies RJ, Bagnall AC, McCabe RN, Calderon MA, Wang JH: Antihistamines: topical vs oral administration. *Clin Exp Allergy* 1996;26 Suppl 3:11-17.
194. Drouin MA, Yang WH, Horak F: Faster onset of action with topical levocabastine than with oral cetirizine. *Mediators Inflamm* 1995;4:S5-S10.
195. Yanez A, Rodrigo GJ: Intranasal corticosteroids versus topical H1 receptor antagonists for the treatment of allergic rhinitis: a systematic review with meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:479-484.
196. Ratner PH, Hampel F, Van Bavel J, Amar NJ, Daftary P, Wheeler W, Sacks H: Combination therapy with azelastine hydrochloride nasal spray and fluticasone propionate nasal spray in the treatment of patients with seasonal allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100:74-81.
197. Hampel FC, Ratner PH, Van Bavel J, Amar NJ, Daftary P, Wheeler W, Sacks H: Double-blind, placebo-controlled study of azelastine and fluticasone in a single nasal spray delivery device. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;105:168-173.
198. Howarth PH: A comparison of the anti-inflammatory properties of intranasal corticosteroids and antihistamines in allergic rhinitis. *Allergy* 2000;55 Suppl 62:6-11.
199. Nettis E, Colanardi MC, Ferrannini A, Tursi A: Antihistamines as important tools for regulating inflammation. *Curr Med Chem* 2005;4:81-89.
200. Lee C, Corren J: Review of azelastine nasal spray in the treatment of allergic and non-allergic rhinitis. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:701-709.
201. McNeely W, Wiseman LR: Intranasal azelastine. A review of its efficacy in the management of allergic rhinitis. *Drugs* 1998;56:91-114.
202. Arnold R, Rihoux J, Konig W: Cetirizine counter-regulates interleukin-8 release from human epithelial cells (A549). *Clin Exp Allergy* 1999;29:1681-1691.
203. Weiner JM, Abramson MJ, Puy RM: Intranasal corticosteroids versus oral H1 receptor antagonists in allergic rhinitis: systematic review of randomised controlled trials. *BMJ* 1998;317:1624-1629.
204. Eichner H, Behbehani AA, Hochstrasser K: [Diagnostic value of nasal secretions, current state: normal values. 1]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1983;62:561-565.
205. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
206. Mehl E, Plambeck J, Lottspeich F: Probenvorbereitung von Protein-Mikromengen: Maßnahmen gegen Adsorptionsverluste. in *Kapillarelektrophorese - Chromatographie, Würzburger Kolloquium*. Bertsch Verlag, 1993, 189-195.
207. Dykstra MJ, Reuss LE: *Biology, electron microscopy: theory, techniques and troubleshooting*. ed 2, New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

208. Wetzig K: In situ scanning electron microscopy in materials research. ed 1, Berlin, John Wiley & Sons Inc, 1995.
209. Reimer L: Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis. ed 2, Berlin, Springer Verlag, 1998.
210. Jansohn M: Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. ed 4, Heidelberg, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
211. Langevin CN, Pivonka J, Wichmann JK, Kucharczyk N, Sofia RD: High performance liquid chromatography performance of azelastine and desmethylazelastine in guinea pig plasma and lung tissue. *Biomed Chromatogr* 1993;7;1:7-11
212. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M: A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 1996;14:375-388.
213. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, et al.: Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991;16:249-255.
214. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A: Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000;17:1551-1557.
215. Bak A, Gore A, Yanez E, Stanton M, Tufekcic S, Syed R, Akrami A, Rose M, Surapneni S, Bostick T, King A, Neervannan S, Ostovic D, Koparkar A: The co-crystal approach to improve the exposure of a water-insoluble compound: AMG 517 sorbic acid co-crystal characterization and pharmacokinetics. *J Pharm Sci* 2008;97(9):3942-56.

