

Biopharmazeutische Charakterisierung von p38 α -MAPK-Inhibitoren

Dissertation

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

vorgelegt von
Nadine Löw
aus Neustadt an der Waldnaab

Tübingen
2021

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

Tag der mündlichen Qualifikation:	28.10.2021
Dekan:	Prof. Dr. Thilo Stehle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf Daniels
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gert Fricker

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Martin A. Wahl möchte ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und seine stets offene Tür danken. Leider konnten Sie mich nur zu Beginn meiner Promotion betreuen. Ihre Meinung zu meinen Entscheidungen hätte mich sehr interessiert.

Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels möchte ich für die Erstellung des Erstgutachtens und die Möglichkeit und Selbstverständlichkeit, das Thema an seinem Lehrstuhl weiter zu bearbeiten, danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Gert Fricker bedanke ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens, die Zusendung der MDCKII Zellen, die Möglichkeit den Western Blot bei ihm am Lehrstuhl durchzuführen und die vielen hilfreichen Tipps im letzten Drittel meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer danke ich für die Überlassung der p38 α -MAPK-Inhibitoren.

Bei Frau Dr. Anne Mahringer und Frau Sarah Vicinus vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg bedanke ich mich für die großartige Hilfe beim Western Blot.

Meiner Wahlpflichtfachstudentin Chiara Gort danke ich für ihre Arbeit zur Überprüfung der Gleichgewichtsdialyseeinheiten.

Bei der Werkstatt bedanke ich mich für die Anfertigung der Gleichgewichtsdialyseeinheiten.

Bei den Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl bedanke ich mich für die angenehme Zusammenarbeit.

Danke an Ann-Kathrin, Ilka, Janosch, Johannes, Manuel, Markus, Melanie, Richard, Sabrina und Ulrike für die vielen und schönen Unternehmungen abseits vom Laboralltag.

Vielen Dank an Tobi für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden möchte ich mich bedanken, dass sie mich immer unterstützt haben und für mich da waren, wenn ich eine kleine Ablenkung gebraucht habe.

**“The greatest illusion”, said the mole,
“is that life should be perfect”.**

aus „The Boy, the Mole, the Fox and the Horse” von Charlie Mackesy

Besonderer Hinweis:

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Zielsetzung	1
1.2 p38 α MAPK	2
1.3 Permeation über Zellmembranen	6
1.3.1 Permeationsmechanismen	6
1.3.2 Bestimmung der Permeationsrate	7
1.4 Transporter	11
1.4.1 ABC-Transporter – Grundlagen	11
1.4.2 P-Glykoprotein (P-Gp, MDR1, ABCB1)	12
1.4.3 Multidrug Resistance-associated Protein 2 (MRP2, ABCC2)	15
1.4.4 Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2)	16
1.5 Plasmaproteinbindung	19
2. Material und Methoden	21
2.1 verwendete Materialien	21
2.1.1 Stammlösungen	21
2.1.2 Chemikalien und Substanzen	21
2.1.3 Materialien und Geräte	25
2.1.4 Software	28
2.2 Adsorptionsstudien	29
2.2.1 Wiederfindung von FS100 nach Lagerung in Glas- oder Plastikgefäßen bei unterschiedlichen Temperaturen	29
2.2.2 Probenaufbereitung in HPLC-Vials	29
2.2.3 Probenvorbereitung in Plastikgefäßen	30
2.2.4 Adsorption an Zellkulturplatten	30
2.2.5 Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte	31
2.3 Quantifizierung der p38 α -MAPK-Inhibitoren	32
2.4 Kultivierung der Caco-2/TC7 und MDCKII Zellen	33
2.4.1 Zellkultur	33
2.4.2 Kryokonservierung	33
2.4.3 Auftauen der Zellen	33
2.4.4 Kultivierung der Zellen	34
2.5 Permeationsstudien – grundlegende Methoden	36

2.5.1	Permeation.....	36
2.5.2	Integritätstests.....	37
2.5.3	Bestimmung der intrazellulären Menge	39
2.5.4	Bestimmung der Proteinmenge	39
2.6	<i>P-Gp-Inhibierungsassay</i>	40
2.7	<i>Permeationsstudien mit SK807 in HBSS (AP, BL)</i>	42
2.8	<i>Eignung von FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) für Permeationsstudien</i>	43
2.8.1	Herstellung FaSSIF.....	43
2.8.2	Wiederfindung.....	43
2.8.3	WST-1 Assay	45
2.9	<i>Permeationsstudien mit p38α-MAPK-Inhibitoren mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)</i>	46
2.10	<i>Fluoreszenz-Assays</i>	48
2.11	<i>Western Blot</i>	49
2.12	<i>Anisotropie-Messung</i>	51
2.13	<i>Albuminbindung</i>	52
2.13.1	Durchführung der Gleichgewichtsdialyse	52
2.13.2	Aufreinigung Proben.....	52
2.13.3	Quantifizierungsmethoden	53
3.	Ergebnisse	55
3.1	<i>P-Gp-Inhibierungsassay zur Bestimmung der geeigneten Konzentration von Zosuquidar für die P-Gp-Inhibierung</i>	55
3.2	<i>Adsorptionsstudien p38α-MAPK-Inhibitoren</i>	57
3.2.1	Wiederfindung von FS100 nach Lagerung in Glas- oder Plastikgefäßen bei unterschiedlichen Temperaturen	57
3.2.2	Probenaufbereitung im HPLC-Vial.....	58
3.2.3	Probenvorbereitung in Plastikgefäßen.....	60
3.2.4	Adsorption an Zellkulturplatten	61
3.2.5	Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte	63
3.3	<i>Permeationsstudien mit SK807 in HBSS</i>	66
3.4	<i>Permeationsstudien p38α-MAPK-Inhibitoren in FaSSIF/4 % BSA</i>	72
3.4.1	Wiederfindung in HPLC-Vials, Falcon-Tubes und Transwell	72
3.4.2	Vitalität der Caco-2/TC7 Zellen unter Verwendung von FaSSIF	73
3.4.3	P-Gp-Inhibierungsassay mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	75
3.4.4	Permeationsstudien p38 α -MAPK-Inhibitoren, 2 h, 37 °C	77
3.4.5	Inhibierungsstudie SK807, 30 min, 37 °C.....	85
3.4.6	Permeationsstudien SK807, 4 °C	86

3.4.7	Fazit Permeationsstudien p38 α -MAPK-Inhibitoren in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)..	88
3.5	Fluoreszenz-Assays	90
3.5.1	Fluoreszenz-Assays mit Caco-2/TC7 Zellen	92
3.5.2	Fluoreszenz-Assays mit MDCKII Zellen	97
3.6	Überprüfung der Ausbildung von P-Gp und BCRP in Caco-2/TC7 Zellen mittels Western Blot.....	100
3.7	Einfluss der p38 α -MAPK-Inhibitoren auf die Membranfluidität der Caco-2/TC7 Zellen.....	103
3.8	Überprüfung der Albuminbindung mittels Gleichgewichtsdialyse	105
3.8.1	Theorie zur Gleichgewichtsdialyse	105
3.8.2	Validierung der entwickelten Gleichgewichtsdialyseeinheit	105
3.8.3	Bestimmung der Albuminbindung der p38 α -MAPK-Inhibitoren und Rhodamin	108
4.	Diskussion	109
4.1	Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Klameth (2016)	109
4.1.1	Wiederfindung.....	109
4.1.2	Permeationsstudien SK807 in HBSS.....	111
4.2	Permeationsstudien in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	116
4.3	Beteiligung von apikal gelegenen Efflux-Transportern: Nachweis mittels Fluoreszenz-Assays	120
4.4	Vergleich der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen aus dem Vollblutassay	122
5.	Zusammenfassung.....	125
6.	Verzeichnisse	127
6.1	Literaturverzeichnis	127
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	139
6.3	Formelverzeichnis	141
6.4	Tabellenverzeichnis.....	142
7.	Anhang.....	144
7.1	Probenaufbereitung im HPLC-Vial, FS100 in HBSS.....	144
7.2	Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption an Zellkulturplatten, Ergebnisse FS089 und FS100	145
7.3	Kalibrierung p38 α -MAPK-Inhibitoren.....	146
7.4	Kalibrierung Ibuprofen, Lidocain, Procain	147

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström	FTC	Fumitremorgin C
ABC	ATP-binding cassette	Gly	Glycin
ACN	Acetonitril	GSMF	Glutathion-Methylfluorescein
AP	apikal	HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
AP→BL	Absorption	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
AP-BL	Absorption	HPLC	Hochleistungsflüssigkeits- chromathographie
API	active pharmaceutical ingredient	IC ₅₀	mittlere inhibitorischer Konzentration
ATP	Adenosintriphosphat	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein	LOD	Limit of Detection, Nachweisgrenze
BL	basolateral	LOQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
BL→AP	Sekretion	LTC	Leukotrien
BL-AP	Sekretion	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
BSA	Rinderserumalbumin	MAPKAPK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
Caco-2	humane kolorektale Adenokarzinom Zellen	MAPKK	MAPK Kinase
CMF	5-Chloromehtylfluorescein	MAPKKK	MAPKK Kinase
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein- Diacetat	MATE	Multidrug and Toxin Extrusion Protein
CYP	Cytochrom P450	MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
Da	Dalton	MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	MDR	Multidrug Resistance
DMSO	Dimethylsulfoxid	MeOH	Methanol
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	MRP	Multidrug Resistance-associated Protein
DPH	Diphenylhexatrien	MW	Mittelwert
DTT	Dithiothreitol	n.a.	not available, nicht verfügbar
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	NaOH	Natronlauge
EMA	Europäische Arzneimittel- Agentur	NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
ERK	extrazellulär regulierte Kinase	NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
FaSSIF	Fasted State Simulated Intestinal Fluid	OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
FBS	fötales Rinderserum	P _{app}	apparenter Permeabilitäts- koeffizient
FDA	U.S. Food and Drug Administration	PE	Polyester
GSH	Glutathion	P-Gp	P-Glykoprotein

PTFE	Polytetrafluorethylen, Teflon
R ²	Bestimmtheitsmaß
rF	relative Feuchte
rpm	revolutions per minute
RO-H ₂ O	reverse osmosis/ Umkehrosmose-Wasser
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SLC	Solute Carrier
spm	shakes per minute
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
UGT	Uridindiphosphat- Glucuronosyltransferase
v/v	volume/volume
Vitamin E	D- α -Tocopherol-Polyethylenglycol-
TPGS	1000-Succinat
w/v	weight/volume
Xaa	unbekannte Aminosäure

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Zielsetzung

In der Entwicklungsphase neuer chemisch synthetischer Arzneistoffe ist es wichtig biopharmazeutische Parameter zu bestimmen. Dazu zählen beispielsweise Löslichkeit, Permeabilität, Plasmaproteinbindung oder die Beteiligung von Transportern, die in Zusammenhang mit Arzneimittelwechselwirkungen oder Resistenzen gegenüber den aktiven pharmazeutischen Inhaltsstoffen (active pharmaceutical ingredients, APIs) stehen. Dadurch kann u.a. besser abgeschätzt werden, ob sich die neue Substanz für eine perorale Verabreichung eignet oder Wechselwirkungen zu erwarten sind.

Die p38 α Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) wird u.a. mit Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis, Krebs oder Alzheimer assoziiert (Canovas und Nebreda 2021; Margutti und Laufer 2007), weshalb es Bestrebungen gibt, spezifische Inhibitoren für diese MAPK zu entwickeln. Vom Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Tübingen wurden die p38 α -MAPK-Inhibitoren FS089, FS100 und SK807 entwickelt (Koeberle et al. 2012).

Diese zeigten *in vitro* am isolierten aktiven Enzym (p38 α MAPK) niedrige mittlere Inhibierungskonzentrationen (IC₅₀), jedoch wies ausschließlich SK807 darüber hinaus niedrige IC₅₀ *ex vivo* im humanen Vollblutassay auf. Als Ursache für die höheren Inhibierungswerte von FS089 und FS100 wurde die Beteiligung von spezifischen Membrantransportern, eine geringere Permeabilität durch die Zellmembran oder eine veränderte Plasmaproteinbindung vermutet (Koeberle et al. 2012).

Klameth (2016) hatte die Beteiligung der Efflux-Transporter BCRP, MRP2 und P-Gp und die Permeabilität in ihrer Doktorarbeit untersucht. Die Ergebnisse sollten in einer Masterarbeit mittels humanen Vollblutassays validiert werden. Jedoch reduzierte Verapamil, ein P-Gp-Inhibitor, die TNF α -Sekretion, weshalb falsch positive Ergebnisse erhalten wurden (Löw 2017).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun ein anderer P-Gp-Inhibitor verwendet und die Beteiligung der Efflux-Transporter an der Permeation der p38 α -MAPK-Inhibitoren nochmals überprüft werden. Zur weiteren biopharmazeutischen Charakterisierung sollte zusätzlich die Albuminbindung untersucht werden.

1.2 p38 α MAPK

Die p38 α MAPK gehört zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Die Aktivität der MAPK wird durch eine dreiteilige Kaskade reguliert. Diese setzt sich aus einer MAPKKK (MAPK Kinase Kinase), die eine MAPKK (MAPK Kinase) phosphoryliert, die wiederum die MAPK an einem konservierten Thr-Xaa-Tyr Motiv doppelt phosphoryliert und damit aktiviert, zusammen (Braicu et al. 2019; Chang und Karin 2001; Cuenda und Rousseau 2007). Die MAPK kann in vier Gruppen unterteilt werden (Chang und Karin 2001; Cicenas et al. 2017; Cuadrado und Nebreda 2010; Cuenda und Rousseau 2007; English et al. 1999; Schindler et al. 2007):

- ERKs (extrazellulär regulierte Kinase) mit den Isoformen ERK1 und 2
- JNKs (c-Jun N-terminale Kinase) mit den Isoformen JNK1, 2 und 3
- p38 MAPKs mit den Isoformen p38 α , β , γ und δ
- ERK5

Für p38 β werden die Splicevarianten p38 β 1 und p38 β 2 unterschieden (Enslin et al. 1998; Kumar et al. 1997).

P38 α und β stimmen zu 75 % in ihrer Aminosäuresequenz überein, wohingegen eine Übereinstimmung zwischen p38 α und p38 γ bzw. p38 δ nur zu 62 % bzw. 61 % vorliegt (Cuenda und Rousseau 2007).

Des Weiteren weisen die vier p38 Isoformen unterschiedliche Charakteristika auf (Gao und Liu 2016):

- sie vermitteln verschiedene biologische Reaktionen
- sie wirken selektiv auf Substrate
- sie werden durch verschiedene MAPKK aktiviert (Enslin et al. 1998; Brancho et al. 2003):
 - MKK6 (MAPKK6) kann p38 α , β 2, γ und δ aktivieren (Goedert et al. 1997)
 - MKK3 aktiviert p38 α , p38 γ und p38 δ , nicht aber p38 β (Cuadrado und Nebreda 2010)
 - MKK4 aktiviert p38 α
- die Verteilung ist gewebespezifisch
 - p38 α und p38 β werden in den meisten Zelltypen exprimiert (Cuenda und Rousseau 2007; Margutti und Laufer 2007; Schindler et al. 2007; Margutti und Laufer 2007)

- p38 γ wird hauptsächlich in Skelettmuskeln exprimiert (Goedert et al. 1997; Margutti und Laufer 2007)
- p38 δ ist hauptsächlich in Bauchspeicheldrüse, Dünndarm, Hoden und Nieren zu finden (Goedert et al. 1997; Margutti und Laufer 2007)

Der p38-MAPK-Signalweg wird durch verschiedene extrazelluläre Stimuli aktiviert. Dazu zählen u.a. Stress, wie oxidativer oder osmotischer Stress, UV- und γ -Strahlung sowie Zytokine und Entzündungssignale (Canovas und Nebreda 2021; Cicenias et al. 2017). Mitogene sind im Vergleich zu Stress oder Zytokinen schlechte Aktivatoren des p38-MAPK-Signalwegs (Canovas und Nebreda 2021; Faust et al. 2012). Bis zu zehn MAPKKs sind in der Aktivierung der p38 MAPK involviert, wobei einige davon auch andere MAPKs, wie z.B. JNK, aktivieren können (Canovas und Nebreda 2021, Cuadrado und Nebreda 2010). Diese MAPKKs phosphorylieren MAPKKs, wie MKK3, MKK6 oder MKK4, welche die p38 α MAPK an Thr180 und Tyr182 in der Aktivierungsschleife phosphorylieren (Cuadrado und Nebreda 2010). Durch die Doppelphosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch Substrate binden können und die katalytische Aktivität gesteigert wird (Cuadrado und Nebreda 2010; Schindler et al. 2007). Zusätzlich zu der bereits beschriebenen kanonischen Aktivierung gibt es noch zwei andere Mechanismen, die zu einer Aktivierung der p38 α MAPK führen. Dazu zählen zum einen die Autophosphorylierung, die durch eine Bindung von TAB1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1-binding protein 1) an p38 α induziert wird (Ge et al. 2002), und zum anderen die Autophosphorylierung, die nur in T-Zellen, die durch den T-Zell-Rezeptor stimuliert wurden, auftritt und die durch eine Phosphorylierung von Tyr323 durch Zap70 hervorgerufen wird (Salvador et al. 2005).

Eine Inaktivierung der p38 MAPK erfolgt durch Phosphatasen oder einer negativen Rückkopplungsschleife, wobei die Dephosphorylierung der Schlüssel für die Inaktivierung ist und die Rückkopplungsschleife eine Feinjustierung der Aktivität zulässt (Canovas und Nebreda 2021). Bei einer negativen Rückkopplungsschleife wird eine Phosphatase direkt durch den p38 α -MAPK-Signalweg aktiviert (Canovas und Nebreda 2021).

Substrate der p38 α MAPK sind u.a. Kinasen, wie MAPKAPK2 und 3 (MK2 und 3), Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsregulatoren (Han et al. 2020). Die zellulären Antworten durch die Aktivierung der p38 α MAPK sind u.a. Zelltod, unkontrollierte

Entzündungen, anomale Zellproliferation, Zytokinproduktion oder Zelldifferenzierung. Die p38 α MAPK wird mit Krankheiten wie Alzheimer, Krebs oder Rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht (Canovas und Nebreda 2021). Es gibt ein großes Interesse, spezifische Inhibitoren zu finden. Einige Substanzen befinden sich gerade in klinischen Studien, wie Neflamapimod (VX-745) **für Alzheimer** oder Losmapimod (GW856553) **für COVID-19** (Canovas und Nebreda 2021; Han et al. 2020).

Skepinone-L, ein Dibenzosuberonderivat, ist der selektivste p38 α -MAPK-Inhibitor, der in der Literatur beschrieben wurde (Madkour et al. 2021). Die Selektivität von Skepinone-L ist auf die Interaktion mit der hydrophoben Region I (HR I) und der Induktion eines Glycin-Flips durch Gly110 zurückzuführen (Abbildung 1-1), was für die p38 α MAPK einzigartig ist. Zudem stellt das Dibenzosuberone-Grundgerüst ein starres Element dar, wodurch eine Konformationsänderung der Kinase im aktivierten Zustand möglicherweise unterbunden werden kann (Koeberle et al. 2012).

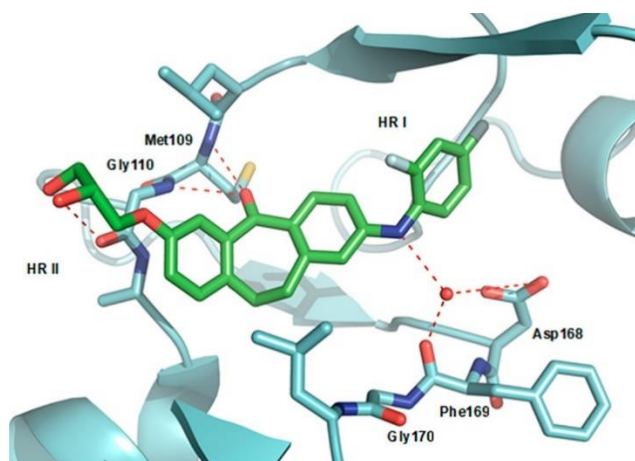


Abbildung 1-1: Bindemodus von Skepinone-L in der ATP-Bindetasche der p38 α MAPK (Tormählen et al. 2021)

Aufbauend auf der Struktur von Skepinone-L wurden die Morpholinoethoxy-substituierten Dibenzosuberonderivate FS089, FS100 und SK807 (Abbildung 1-2) entwickelt (Koeberle et al. 2012).

Diese zeigten eine gute inhibitorische Potenz für p38 α *in vitro*, jedoch nahm die inhibitorische Potenz im *ex vivo*-Assay für FS089 und FS100 ab (Tabelle 1-1).

Im *in vitro*-Assay wurde aktivierte p38 α MAPK verwendet und die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-2, einem Substrat der p38 α MAPK, überprüft (Koeberle et al. 2012, Laufer et al. 2005). Im *ex vivo*-Assay wurde verdünntes humanes Vollblut verwendet, weshalb Koeberle et al. (2012) vermuteten, dass die Unterschiede der IC₅₀ zwischen *in vitro* und *ex vivo*-Assay dadurch zustande kamen, dass die Position des Morpholinoethoxy-Substituenten die Permeabilität durch die Zellmembran oder die

Bindung an Plasmaproteine beeinflusst oder spezifische Membrantransporter beteiligt sind.

Tabelle 1-1: Inhibitionsdaten der Dibenzosuberone (aus Koeberle et al. 2012)

Substanz	p38 α IC ₅₀ \pm SEM [μ M]	TNF α IC ₅₀ \pm SEM [μ M]
Skepinone-L	0,005 \pm 0,002	0,04 \pm 0,01
SK807	0,01 \pm 0,00	0,08 \pm 0,02
FS100	0,02 \pm 0,00	40,0 \pm 13,2
FS089	0,03 \pm 0,00	200

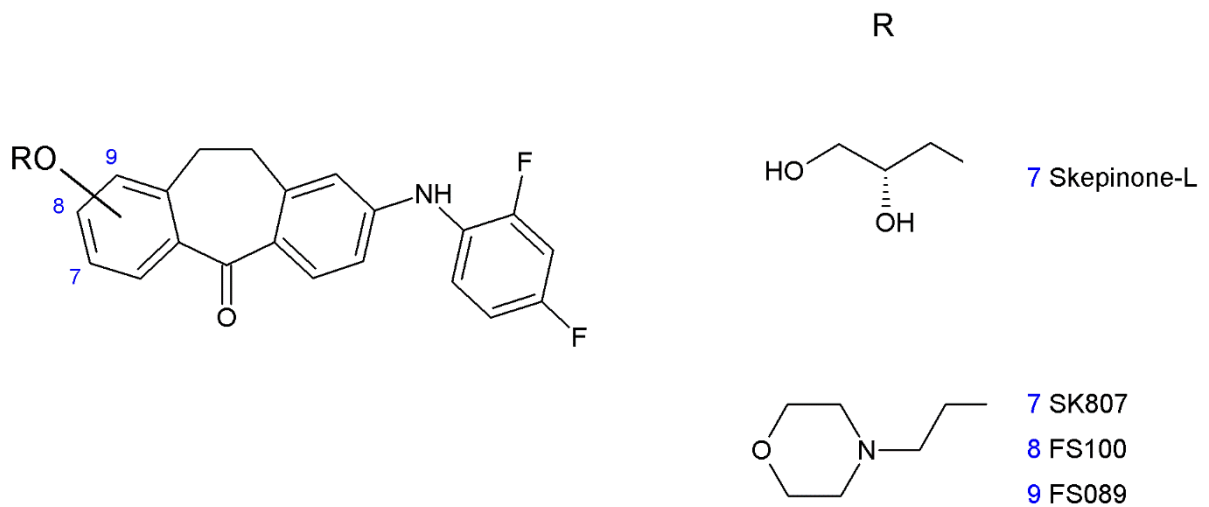


Abbildung 1-2: Struktur der Dibenzosuberonderivate (nach Koeberle et al. 2012)

1.3 Permeation über Zellmembranen

1.3.1 Permeationsmechanismen

Jeder Arzneistoff passiert, um zu seinem Wirkort zu gelangen, Zellmembranen. Die transzelluläre Permeation kann passiv, über die passiv lipoidale Diffusion mittels flip-flop (Krämer et al. 2009), entlang dem Konzentrationsgradienten oder aktiv über primär oder sekundär aktiven Transport entgegen dem Konzentrationsgradienten erfolgen (Abbildung 1-3) (Krämer et al. 2016; Smith et al. 2014).

Der sekundär aktive Transport kann nur erfolgen, wenn ein entsprechender Konzentrationsgradient geschaffen wurde, beispielsweise über eine Na^+/K^+ -ATPase. Über diese Pumpe ist die intrazelluläre Na^+ -Konzentration erniedrigt, die K^+ -Konzentration dagegen erhöht. Der Transport der Ionen erfolgt entgegen ihrem jeweiligen Konzentrationsgefälle. Aufgrund des neuen Konzentrationsgefälles kann Na^+ für den Cotransport einer anderen Substanz in die Zelle verwendet werden, beispielsweise für den Antiport mit H^+ , welches aus der Zelle geschleust wird, um den cytosolischen pH-Wert aufrecht zu erhalten (Thwaites und Anderson 2007).

Der Efflux bzw. das Ausschleusen aus der Zelle kann über einen primär oder sekundär aktiven Transport erfolgen. Beim primär aktiven Transport wird ATP hydrolysiert, wodurch eine Substanz, beispielsweise der Arzneistoff, entgegen dem Konzentrationsgradienten aus der Zelle geschleust werden kann. Beim sekundär aktiven Transport wird zwischen Antiport und Symport unterschieden. Beim Antiport wird ein Ion entlang des Konzentrationsgefälles transportiert, wodurch gleichzeitig eine Substanz entgegen ihrem Konzentrationsgefälle transportiert werden kann. Durch Cotransport, in diesem Falle Antiport, mit H^+ wird beispielsweise Metformin über MATE1 aus der Zelle geschleust (Damme et al. 2011).

Der Uptake oder die Aufnahme in die Zelle kann beispielsweise über Symport, dem zweiten sekundär aktiven Transport, erfolgen. Beim Symport wird ein Ion entlang eines Konzentrationsgradienten transportiert, wodurch zusätzlich eine zweite Substanz in die gleiche Richtung transportiert wird. Durch Cotransport, in diesem Falle Symport, mit H^+ wird beispielsweise Salicylsäure über MCT1 in die Zelle aufgenommen (Enerson und Drewes 2003).

Zusätzliche Permeationsmechanismen sind die Transcytose, also der Transport als Vesikel durch die Zelle, bei Makromolekülen oder die parazelluläre Route über die

Tight Junctions der Darmepithelzellen bei Molekülen mit einem Molekulargewicht unter 300 Da (Artursson et al. 2001; Krämer et al. 2016; Smith et al. 2014).

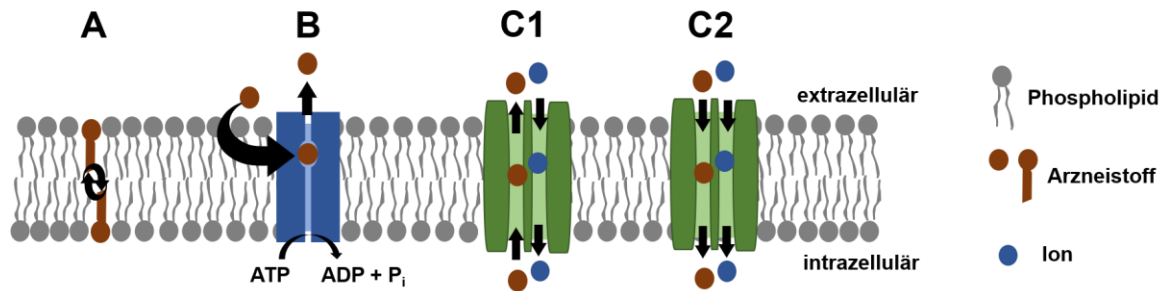


Abbildung 1-3: Permeation über die Zellmembran

A: passiv lipoidale Diffusion; B: primär aktiver Transport; C: sekundär aktiver Transport, C1: Antiport; C2: Symport

1.3.2 Bestimmung der Permeationsrate

Die transzelluläre Permeation einer Substanz kann zunächst über ihre physikochemischen Eigenschaften vorhergesagt werden. Damit eine Substanz eine akzeptable Membranpermeabilität aufweist, sollte sie beispielsweise die Parameter in Tabelle 1-2 erfüllen (Joubert et al. 2017; Lobell et al. 2006).

Tabelle 1-2: Physikochemische Parameter für die transzelluläre Permeation (Joubert et al. 2017; Lobell et al. 2006)

physikochemischer Parameter	Membranpermeabilität Einordnung		
	gut (0 Punkte)	moderat (1 Punkt)	schlecht (2 Punkte)
Molekulargewicht	≤ 400 Da	400-500 Da	> 500 Da
Lipophilie (logP)	≤ 3	> 3-5	> 5
polare Oberfläche (PSA)	≤ 120 Å ²	> 120-140 Å ²	> 140 Å ²
rotierbare Bindungen	≤ 7	≥ 8-10	≥ 11
wässrige Löslichkeit	≥ 50 mg/mL	< 10-50 mg/mL	< 10 mg/mL

Je niedriger die Punktzahl ist, die eine Substanz erreicht, desto wahrscheinlicher wird sie *in vivo* absorbiert. Jedoch gibt es hier auch Ausnahmen, die trotz einer schlechten Bewertung eine gute Bioverfügbarkeit aufweisen (Joubert et al. 2017). Der HIV Protease-Inhibitor Ritonavir beispielsweise erzielt eine Punktzahl von 9, weist aber eine 70 %-ige Bioverfügbarkeit auf (Lobell et al. 2006). Um Leitsubstanzen zu identifizieren ist dieses oder ein anderes *in silico* Screening, wie die sogenannte „Rule of Five“ (Lipinski et al. 1997) oder die „Rule of Unity“ (Sanghvi et al. 2003), gut geeignet, jedoch kann hiermit nur die passive Diffusion abgeschätzt werden. Da diese

Methoden Grenzen in der Vorhersagbarkeit aufweisen, ist dennoch ein *in vitro* Screening nötig (Joubert et al. 2017; Krämer et al. 2016).

Die Bestimmung der Permeationsrate kann mit verschiedenen Methoden, wie dem Perfusionsmodell, der Ussing Kammer, Zellkulturen oder zellfreien Methoden vorgenommen werden. Wird tierisches Gewebe verwendet, wie beim Perfusionsmodell oder der Ussing Kammer, müssen bestimmte ethische Anforderungen erfüllt werden. Zwar spiegeln diese Methoden sehr gut die *in vivo* Situation wider, jedoch sind sie sehr aufwändig und sie bieten nur einen geringen Durchsatz (Berben et al. 2018b). Dagegen bieten Zellkulturen und zellfreie Methoden einen hohen Durchsatz und eignen sich hervorragend für ein Screening, wenn noch mehrere Wirkstoffkandidaten in der Entwicklungs-Pipeline vorhanden sind.

Zu den zellfreien Methoden zählen beispielsweise PAMPA (parallel artificial membrane permeation assay) (Kansy et al. 1998), PVPA (phospholipid vesicle based permeation assay) (Flaten et al. 2006), Permeapad (Di Cagno et al. 2015) und das AMI-System (artificial membrane insert system) (Berben et al. 2018a; Berben et al. 2018b). Diese Systeme beinhalten entweder Barrieren, die die Biomembranen simulieren und aus Phospholipiden bestehen, wie es beim PAMPA, PVPA und Permeapad vorzufinden ist, oder eine Dialyse-Membran mit einem gewissen Cut-Off für das Molekulargewicht, wie es das AMI-System nutzt. Durch eine veränderte Komposition der Phospholipide, der Filtereigenschaften (hydrophil oder hydrophob) und des organischen Lösemittels können verschiedene Zellmembranen nachgeahmt werden. Mit diesen Methoden kann jedoch nur die passiv transzelluläre Permeation nachgestellt werden. Die Vorhersage dieser zellfreien Methoden für *in vivo* korreliert mit den Caco-2 Zellen für die passiv transzelluläre Permeation. Somit bieten diese Methoden dahingehend eine gute Alternative zu den Zellmethoden (Berben et al. 2018b).

Zu den Zellmethoden zählen beispielsweise die Permeation über die Caco-2 Zellen und die MDCKII Zellen.

Die Zelllinie Caco-2 wurde 1974 von J. Fogh aus einem Adenokarzinom im Colon eines männlichen Kaukasiers isoliert (Fogh et al. 1977a; Fogh et al. 1977b). Diese Zellen polarisieren, wenn sie auf einem Filter in einem Transwell-System ausgesät werden, und bilden somit eine apikale Membran mit Mikrovilli und Tight Junctions zwischen benachbarten Zellen aus (Hidalgo et al. 1989). Nach einer 21-tägigen Kultivierung können sie für Permeationsassays verwendet werden. Eine gute *in vitro-in vivo*

Korrelation wird für Substanzen erzielt, die passiv transzellulär permeieren (Artursson et al. 2001). Für Substanzen, die über die parazelluläre Route permeieren, kann eine qualitative jedoch keine quantitative Vorhersage getroffen werden, da die Permeabilität über die Tight Junctions der Caco-2 Zellen geringer ausfällt als über die im menschlichen Darm (Artursson et al. 2001; Hidalgo et al. 1989). Neben den passiven Routen kann auch der aktive Transport mit Caco-2 Zellen untersucht werden, da diese entsprechende Transporter der ABC- und SLC-Familie ausbilden (Ölander et al. 2016). Wird die Proteinmenge dieser Transporter betrachtet, so bilden Caco-2 Zellen eine größere Menge an P-Gp (Brück et al. 2017; Harwood et al. 2016), OATP4A1, MRP1, MRP2 und OATP2B1 (Vaessen et al. 2017) im Vergleich zum Dünndarm aus. Hingegen wird BCRP vergleichsweise geringer exprimiert (Harwood et al. 2016). Die Angaben von Vaessen et al. (2017) beruhen dabei auf Caco-2-Zellkulturen in Zellkulturflaschen. Jedoch konnten Ölander et al. (2016) zeigen, dass bei Zellen, die auf Filtern wachsen, die Transportproteine hochreguliert werden. Somit könnte der Unterschied zwischen den Permeationsmodellen, die auf Caco-2 Zellen basieren, und den *in vivo* Verhältnissen im Dünndarm noch größer sein, als es sich aus den Daten von Vaessen et al. (2017) ableiten lässt. Des Weiteren ist die Menge an CYP- und UGT-Enzymen in den Caco-2 Zellen im Vergleich zum Dünndarm reduziert (Vaessen et al. 2017). Entgegen ihrer Herkunft aus dem Colon gleichen die Caco-2 Zellen eher dem Jejunum (Ölander et al. 2016). Da die Proteinmengen jedoch unterschiedlich sind, sollte ein Skalierungsfaktor verwendet werden, wenn ein Transporter an der Permeation beteiligt ist, um den Einfluss des Transporters auf die Absorption im menschlichen Dünndarm vorhersagen zu können (Ölander et al. 2016). Der Subklon Caco-2/TC7 hingegen zeigt eine höhere UGT-Enzym Aktivität (Caro et al. 1995) und eine höhere CYP3A- und eine niedrigere P-Gp-Expression als die parenterale Zelllinie (Le Ferrec et al. 2001). Zusammengefasst besteht bei Permeationsmodellen, die auf Caco-2 oder Caco-2/TC7 Zellen basieren, hinsichtlich einer passiv transzellulären Permeation eine gute *in vitro-in vivo* Korrelation, die anderen Permeationsmechanismen können mit den Caco-2 oder Caco-2/TC7 Zellen untersucht werden, die Ergebnisse können jedoch nicht direkt auf die *in vivo* Situation übertragen werden.

Ein weiteres Zellmodell für die Untersuchung der Permeation von Arzneistoffen bieten die MDCK Zellen. Die Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen wurden von Madin und Darby aus der Niere eines Hundes isoliert und erstmals durch Gaush et al. (1966)

charakterisiert (Dukes et al. 2011). Werden sie auf Filtern in einem Transwell-System ausgesät, bilden sie nach 3 - 5 Tagen einen Monolayer und Tight Junctions aus (Cho et al. 1989; Irvine et al. 1999). Irvine et al. (1999) zeigten, dass eine gute Korrelation zwischen MDCK und Caco-2 Zellen für passiv permeierende Substanzen besteht. Es gibt unterschiedliche MDCK Stämme, wobei der MDCKII Stamm, der aus einer höheren Passage der parenteralen Zelllinie stammt und weniger dichte Junctions mit TEER-Werten unter $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bildet, am häufigsten verwendet wird (Dukes et al. 2011). Da die MDCK Zellen keine humanen Transporter ausbilden, können diese mit dem entsprechenden Gen transfiziert werden (Braun et al. 2000; Hämmerle et al. 2000), wodurch der entsprechende Transporter überexprimiert wird (Braun et al. 2000; Tang et al. 2002). Hämmerle et al. (2000) stellten fest, dass *MDR1* transfizierte Zellen Multilayer ausbilden, weshalb Permeationsdaten bezüglich P-Gp-vermittelten Transport schwierig zu interpretieren sind (Braun et al. 2000). Braun et al. (2000) empfehlen deshalb anstelle eines Zwei-Kammer-Systems ein Ein-Kammer-System zu verwenden, in dem nur die Aufnahme oder der Efflux untersucht wird. Somit kann mit transfizierten MDCK Zellen zwar die Beteiligung von Transportern untersucht werden, jedoch kann damit keine quantitative Aussage für die *in vivo* Situation getroffen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich bei der Untersuchung des passiv transzellulären Transports zellfreie Methoden empfehlen. Sobald eine Transporter-Beteiligung untersucht werden soll, sollten entweder Caco-2 oder entsprechend transfizierte MDCKII Zellen verwendet werden.

1.4 Transporter

Die europäische Arzneimittel-Agentur (EMA 2012) und die U.S. Food and Drug Administration (FDA 2020) nennen die nachfolgenden Transporter, die in Arzneimittelwechselwirkungen involviert sind, und für die mittels *in vitro* Tests untersucht werden soll, ob ein neuer Wirkstoff ein Substrat oder ein Inhibitor ist:

- P-Glykoprotein (P-Gp)
- Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)
- Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1/1B3 (OATP1B1/OATP1B3)
- Organic Anion Transporter 1/3 (OAT1/OAT3)
- Multidrug and Toxin Extrusion Proteins (MATE1/MATE2-K)
- Organic Cation Transporter 2 (OCT2)

P-Gp, BCRP und MATEs sind Efflux-Transporter, wohingegen die hier aufgeführten OATPs, OATs und OCTs Uptake-Transporter sind. OATP1B1 und OATP1B3 spielen vor allem bei der Aufnahme eines Arzneistoffs in die Leber eine wichtige Rolle. OAT1, OAT3 und OCT2 werden in der basolateralen Membran des proximalen Nierentubulus, MATE1 und MATE2-K in der Bürstensaummembran der Niere ausgebildet. P-Gp und BCRP sind ubiquitär vorhanden (FDA 2020).

Die aufgeführten Transporter gehören zu den zwei Hauptfamilien der Membrantransporter, der ATP-binding cassette (ABC-) Superfamilie und der Solute Carrier (SLC-) Superfamilie.

Nachfolgend wird auf die drei ABC-Transporter P-Gp, BCRP und MRP2 eingegangen, die in der Entwicklung einer Multidrug-Resistenz involviert sind und deren Beteiligung an der Permeation der p38 α -MAPK-Inhibitoren in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

1.4.1 ABC-Transporter – Grundlagen

Im Menschen wurden bisher 49 ABC (ATP-binding cassette) Gene identifiziert. Je nach sequenzieller Ähnlichkeit lassen sich diese den sieben Unterfamilien A bis G zuordnen (Juan-Carlos et al. 2021). Die ABC Transporter sind Transmembranproteine, bestehen aus zwei Transmembrandomänen (TMD) und zwei Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD) (Rice et al. 2014) und nutzen die Bindung und Hydrolyse von ATP, um Substrate entgegen dem Konzentrationsgradienten zu transportieren (Lusvardhi et al. 2020). Die NBD enthält das Walker A, Walker B und ABC-

Signaturmotiv, welche wichtig für die Bindung von ATP sind (Schneider und Hunke 1998). Die TMD Sequenz ist im Gegensatz zur NBD variabler (Rice et al. 2014; Wilkens 2015) und besteht bei den meisten Efflux-Transportern der ABC Familie aus sechs α -Helices (Wilkens 2015). Die Substrat-Erkennung und Translokation erfolgt durch die TMDs (Lusvarghi et al. 2020).

P-Gp (ABCB1), BCRP (ABCG2) und MRP1 (ABCC1) transportieren ihre Substrate, indem ein Substrat an die Bindestelle in den TMDs und zwei ATPs an die NBDs binden. Durch die ATP Bindung dimerisieren die NBDs, wodurch es zu einer konformationellen Änderung der TMDs kommt und sich diese zum Extrazellularraum hin öffnen. Das Substrat wird in den Extrazellularraum abgegeben. ATP wird hydrolysiert, wodurch das Protein wieder die sogenannte „nach innen geöffnete“ Konformation einnimmt (Alam et al. 2019; Johnson und Chen 2017; Kodan et al. 2021; Lusvarghi et al. 2020; Taylor et al. 2017).

1.4.2 P-Glykoprotein (P-Gp, MDR1, ABCB1)

P-Gp ist ein 170 kDa schweres glykosyliertes Membranprotein (Juliano und Ling 1976). Wie auch MRP2 und BCRP transportiert es Xenobiotika aus der Zelle, wodurch es in der Entwicklung einer Resistenz gegenüber vielen Arzneistoffen (Multidrug-Resistenz, MDR) involviert ist. Das Polypeptid formt zwei NBDs und zwei TMDs, welche aus jeweils sechs α -Helices bestehen (Abbildung 1-7 A) (Chen et al. 1986; Chen et al. 2016; Schinkel und Jonker 2003). Es ist in der apikalen Membran des Dünndarms lokalisiert sowie auch in Niere, Leber, Plazenta und der Blut-Hirn-Schranke zu finden (Chen et al. 2016; Juan-Carlos et al. 2021). Eine N-Glykosylierung tritt an der ersten extrazellulären Schleife auf (Chen et al. 2016; Schinkel und Jonker 2003). Die Membranzusammensetzung spielt eine wichtige Rolle für die ordnungsgemäße Funktion von P-Gp. Cholesterol und Phospholipide binden an P-Gp und können dieses modulieren (Alam et al. 2019).

Für den Transportmechanismus hydrophober Arzneistoffe wurde von Kodan et al. (2021) ein „twist-and-squeeze“-Mechanismus beschrieben (Abbildung 1-4). Hierbei gelangt ein hydrophobes Substrat über die Membran in den inneren Hohlraum von P-Gp, der durch die beiden TMDs gebildet wird, und bindet an die hydrophoben Regionen am oberen Ende des Hohlraums, wodurch eine Änderung hin zu einer „nach außen geöffneten“ Konformation (outward-open) ausgelöst wird. Durch die Bindung von zwei ATP-Molekülen und zwei Mg^{2+} in den NBDs, liegen die NBDs dichter

aneinander gepackt vor, wodurch die TMD Helices nach außen geneigt werden. Dies führt zu einer Verkleinerung des Hohlraums, einem Verschließen von „Klappen“ (non-return valves), die verhindern, dass das Substrat in das Cytopsol gelangt, und einer Öffnung des Ausgangstors. Die Adenin-Gruppe des ATPs ist in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken involviert, wodurch es zu einer Rigidisierung des Proteins – ausgehend von den NBDs über die TMDs – kommt. Durch den resultierenden Twist wird das Substrat direkt in den Extrazellulärraum abgegeben (Kodan et al. 2021).

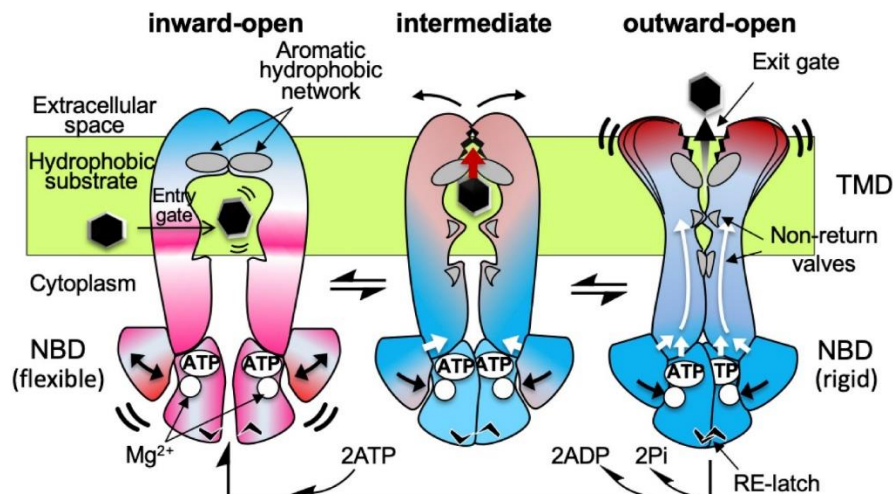


Abbildung 1-4: Der „twist-and-squeeze“ Mechanismus für den Export hydrophober Substanzen durch P-Gp (aus Kodan et al. 2021)

Die meisten P-Gp Substrate sind schwach amphiphil und einigermaßen hydrophob. Meistens weisen sie als Strukturmerkmale aromatische Ringe und ein positiv geladenes Stickstoffatom auf (Chen et al. 2016; Schinkel und Jonker 2003). Zu den P-Gp-Substraten zählen beispielsweise Arzneistoffe aus den Klassen der Chemotherapeutika, Antiarrhythmika, Calcium-Kanal-Blocker, Analgetika, Immunsuppressiva, Antibiotika, aber auch Naturstoffe, wie Flavonoide, Fluoreszenzfarbstoffe und Pestizide (Chen et al. 2016; Estudante et al. 2013).

Die Inhibitoren für P-Gp lassen sich in drei Generationen einteilen (Chen et al. 2016; Ecker und Chiba 2009; Palmeira et al. 2012; Schinkel und Jonker 2003; Zhang et al. 2021). Zur ersten Generation zählen beispielsweise der Calcium-Kanal-Blocker Verapamil und das Immunsuppressivum Cyclosporin A, welche Substrate von P-Gp sind, weshalb ein kompetitiver Mechanismus vermutet wurde. Da diese Substanzen selbst pharmakologische Wirkungen haben, ist die zu verabreichende Dosis und damit die erzielte Plasmakonzentration begrenzt, da sonst unerwünschte Nebenwirkungen auftreten würden. Aus diesem Grund gelten diese Substanzen *in vivo* als schlechte Inhibitoren für P-Gp. Die zweite Generation bilden Analoga der ersten Generation, wie

Valspodar (PSC 833), ein Cyclosporin Analogon, oder Dexverapamil, das R-Enantiomer von Verapamil. Diese Generation weist eine höhere Potenz und Selektivität für P-Gp auf und zeichnet sich durch eine niedrigere Toxizität aus. Da sie allerdings auch mit CYP-Enzymen interagieren, ist die Wahrscheinlichkeit für klinische Arzneimittelwechselwirkungen erhöht. Durch kombinatorische Chemie und der Analyse von Struktur-Wirk-Beziehungen wurden Inhibitoren der dritten Generation, wie Elacridar (GF120918), Tariquidar (XR9576) oder Zosuquidar (LY335979), synthetisiert. Diese Inhibitoren bewirken zwar eine verbesserte Sensitivität von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika, jedoch führten sie in einer klinischen Studie nicht zu einer Lebensverlängerung bei Krebspatienten (Chen et al. 2016; Ecker und Chiba 2009; Palmeira et al. 2012; Schinkel und Jonker 2003; Zhang et al. 2021). Zosuquidar ist im Vergleich zu Elacridar und Tariquidar ein selektiver P-Gp-Inhibitor (Dantzig et al. 1996; Dantzig et al. 1999; Mease et al. 2012; Shepard et al. 2003). Elacridar und Tariquidar inhibieren zusätzlich BCRP (Allen et al. 1999; Bruin et al. 1999; Kannan et al. 2011).

Alam et al. (2019) konnten mittels Kryo-Elektronenmikroskopie zeigen, wie Substrate und kompetitive Inhibitoren des P-Gps zu unterschiedlichen Effekten der ATPase Aktivität führen. Bindet ein Inhibitor, in diesem Fall zwei Zosuquidar-Moleküle (Abbildung 1-5), ist die Distanz zwischen den NBDs erhöht, wodurch die ATPase Aktivität abnimmt. P-Gp wird in der verschlossenen Konformation gehalten, wodurch es nicht in die nach außen geöffnete Konformation wechseln kann. Die Autoren vermuteten, dass, im Vergleich zu Substraten, Inhibitoren weniger oder nur einen einzigen Bindemodus aufweisen, die Bindetasche besser ausfüllen und mehr Kontakte mit P-Gp eingehen.

Nosol et al. (2020) untersuchten ebenfalls mittels Kryo-Elektronenmikroskopie wie Inhibitoren mit P-Gp interagieren.

Dabei betrachteten sie die Bindemodi von Vincristin, Elacridar, Tariquidar und Zosuquidar. Sie konnten zwei Inhibierungsmodi identifizieren:

- Im ersten Fall bindet ein Molekül in der zentralen Bindetasche des P-Gps und füllt diese vollständig aus. Zudem geht es starke Wechselwirkungen ein. Diesen

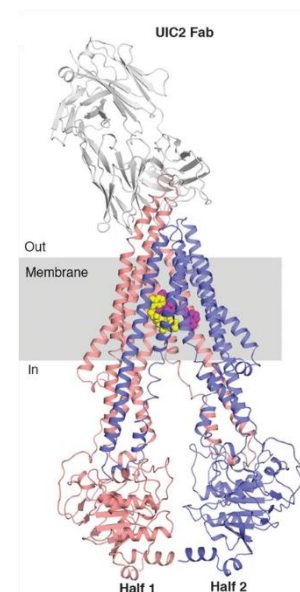


Abbildung 1-5: Struktur von P-Gp mit zwei Zosuquidar-Molekülen (aus Alam et al. 2019)

Modus nutzt Vincristin, welches ein Substrat des P-Gps ist und in höheren Konzentrationen die ATPase Aktivität inhibiert.

- Im zweiten Fall bindet ein weiteres Molekül in Verlängerung zur zentralen Bindetasche und interagiert mit zusätzlichen Regionen des P-Gps. Dies konnte für Elacridar und Tariquidar – für höhere Konzentrationen im mikromolaren Bereich – gezeigt werden. Ist bei niedrigeren Konzentrationen nur ein Molekül gebunden, können Elacridar oder Tariquidar dagegen transportiert werden.

1.4.3 Multidrug Resistance-associated Protein 2 (MRP2, ABCC2)

MRP2 wird zwar nicht wie P-Gp und BCRP bei den Transportern aufgezählt, für die während der Entwicklung neuer Arzneistoffe untersucht werden soll, ob sie in Arzneimittelwechselwirkungen involviert sind (EMA 2012; FDA 2020), jedoch ist es ebenfalls in der Entwicklung von MDRs involviert (Chen et al. 2016). Es ist ein 190 kDa schweres Polypeptid (Büchler et al. 1996), das aus zwei TMDs und zwei NBDs besteht. Zusätzlich hat es jedoch eine N-terminale Verlängerung, die sogenannte terminale Transmembrandomäne (TMD₀), die aus fünf helikalen Transmembranfragmenten besteht (Abbildung 1-7 B) (Chen et al. 2016, Schinkel und Jonker 2003). Die Glykosylierung tritt an der sechsten extrazellulären Schleife und am extrazellulär gelegenen N-Terminus auf (Schinkel und Jonker 2003). MRP2 wird in Enterozyten auf der apikalen Seite ausgebildet. Es wird unter anderem in Leber, Gallenblase, Lunge, Niere, Dünndarm, Kolon und Plazenta exprimiert (Bandler et al. 2008; Chen et al. 2016; Juan-Carlos et al. 2021).

Zu den Substraten zählen hauptsächlich organische Anionen, schwach basische Arzneistoffe werden mit Glutathion (GSH) cotransportiert. Zu den Chemotherapeutika, die Substrate von MRP2 sind, zählen beispielsweise Methotrexat, Mitoxantron, Vincristin oder Vinblastin. MRP2 transportiert aber auch reduziertes oder oxidiertes GSH, LTC₄ (Leukotrien C₄), Estradiol-17β-Glucuronid oder Pravastatin (Chen et al. 2016; Estudante et al. 2013; Juan-Carlos et al. 2021; Schinkel und Jonker 2003).

Wissel et al. (2017) untersuchten 114 neue Verbindungen bezüglich einer inhibitorischen Aktivität gegenüber MRP2. Jedes Gerüst enthielt als Strukturmerkmale mindestens zwei hydrophobe Funktionen und einen Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor. Sie fanden heraus, dass die Aromatizität und Lipophilie die inhibitorische Aktivität beeinflussten, eine anionische Ladung aber für eine Inhibierung nicht

essenziell war. Zudem begünstigten Halogensubstituenten die Inhibition. Sie konnten allerdings keinen Inhibitor mit allen genannten Merkmalen konstruieren.

Kompetitive Inhibitoren von MRP2 sind beispielsweise LTC₄, MK571, Phenolphthalein oder Fluorescein-Methotrexat (Schinkel und Jonker 2003).

Im Vergleich zu P-Gp und BCRP ist MRP2 weniger untersucht, weshalb die Struktur bisher noch nicht mittels Röntgendiffraktometrie oder Kryo-Elektronenmikroskopie aufgeklärt wurde und es noch nicht in der Proteindatenbank zu finden ist (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>; letzter Zugriff 02.06.2021).

1.4.4 Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2)

BCRP ist ein 72 kDa schweres Transmembranprotein (Diestra et al. 2002), das im Gegensatz zu P-Gp und MRP2 ein Homodimer aus zwei Polypeptidketten mit einer Gesamtmasse von ~144 kDa formt (Taylor et al. 2017). BCRP als Halbtransporter besteht aus sechs Transmembran-Helices und einer NBD (Abbildung 1-6 c und Abbildung 1-7) (Chen et al. 2016; Nakanishi und Ross 2012; Schinkel und Jonker 2003; Taylor et al. 2017), wobei die Helices und die intrazellulären Schleifen kürzer sind als bei P-Gp, was in einer kürzeren Distanz zwischen den NBDs und der Membran resultiert (Taylor et al. 2017). Die Glykosylierung tritt an der dritten extrazellulären Schleife auf (Chen et al. 2016; Schinkel und Jonker 2003; Taylor et al. 2017). BCRP ist unter anderem in Darm, Leber, Niere und Gehirn und auf der apikalen Seite anderer polarisierter Zellen lokalisiert (Chen et al. 2016; Juan-Carlos et al. 2021; Schinkel und Jonker 2003). Substrate gehören beispielsweise den Arzneistoffklassen der Antibiotika, Chemotherapeutika, Antihypertensiva oder Calcium-Kanal-Blocker an (Chen et al. 2016; Juan-Carlos et al. 2021; Schinkel und Jonker 2003), wobei der Transporter eine Präferenz für flache, polyzyklische und hydrophobe Substanzen zeigt (Jackson et al. 2018). Inhibitoren sind Elacridar, Tariquidar, Fumitremorgin C (FTC) oder die FTC Analoga Ko132, Ko134 oder Ko143 (Allen et al. 2002; Jackson et al. 2018; Schinkel und Jonker 2003).

Bindet kein Nukleotid an die NBDs berühren sich diese trotzdem (Taylor et al. 2017). Mittels Kryo-Elektronenmikroskopie konnten Taylor et al. (2017) zeigen, dass BCRP in einer nach innen geöffneten Konformation eine schlitzförmige Bindetasche besitzt, welche zum Cytoplasma und zur inneren Seite der Lipiddoppelschicht hin öffnet (Abbildung 1-6 b). Unterhalb der dritten extrazellulären Schleife befindet sich ein zweiter, kleinerer Hohlraum, der durch eine Art Klappe – geformt von Leucin-Resten –

von der ersten Bindetasche getrennt ist. In der nach innen geöffneten Konformation ist diese zweite Tasche unzugänglich. Zudem vermuten die Autoren, dass diese Tasche eine geringere Affinität für Substrate aufweist, da es eine weniger stark ausgeprägte hydrophobe Oberfläche besitzt. Während der Bindung von ATP und dem Substrat, wechselt BCRP in die nach außen gerichtete Konformation, wodurch das Substrat in die zweite Tasche gelangt, von wo es in den Extrazellularraum abgegeben wird. Es wird vermutet, dass die Substratbindung in der ersten Bindetasche die ATPase Aktivität stimuliert, indem die TMD-Schnittstelle stabilisiert wird, wodurch die NBDs näher zusammen kommen (Taylor et al. 2017).

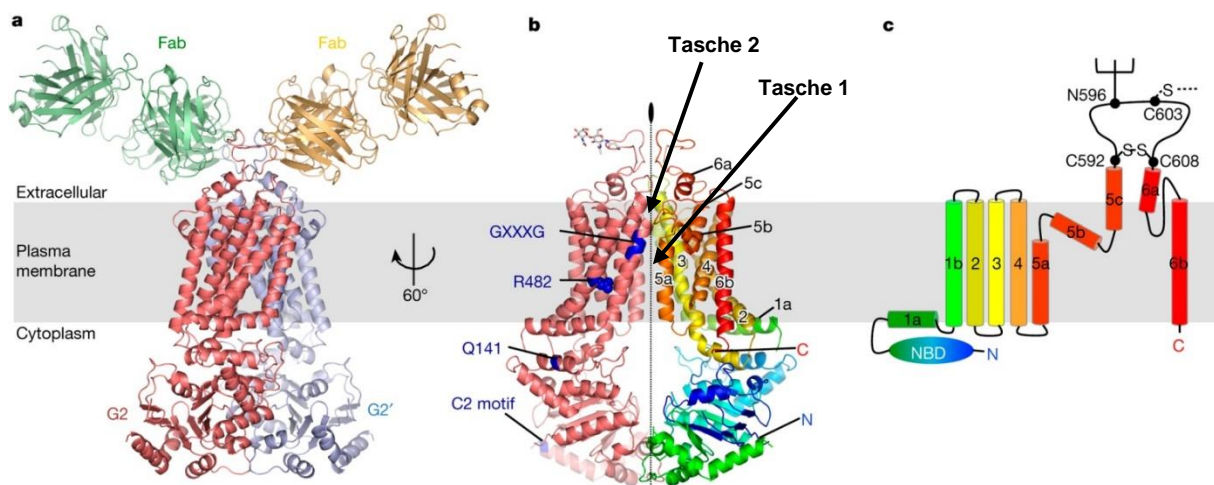


Abbildung 1-6: Struktur von BCRP (ABCG2) (modifiziert nach Taylor et al. 2017)

a: Banddiagramm des ABCG2-5D3(Fab)-Komplex; b: ABCG2 Struktur ohne 5D3 Fab; c: Topologie von ABCG2, TMD im gleichen Farbschema wie in b, N-Glykosylierung am Rest von N596

Jackson et al. (2018) klärten mittels Kryo-Elektronenmikroskopie den Bindemechanismus von BCRP-Inhibitoren auf. Der Transporter unterscheidet zwischen Substrat und Inhibitor, wenn ATP präsent ist. Es binden entweder ein oder zwei Inhibitormoleküle in der ersten Bindetasche. Die Autoren vermuten, dass die Inhibitoren im Gegensatz zu den Substraten in der ersten Bindetasche gebunden bleiben und nicht in die zweite weitertransportiert werden. Die Inhibitoren füllen das gesamte Volumen der ersten Bindetasche aus, wodurch sie BCRP kompetitiv hemmen. Außerdem bleiben die TMDs in der nach innen gerichteten Konformation, wodurch das Schließen der NBDs verhindert wird. Dies resultiert in einer Inhibierung der ATPase Aktivität.

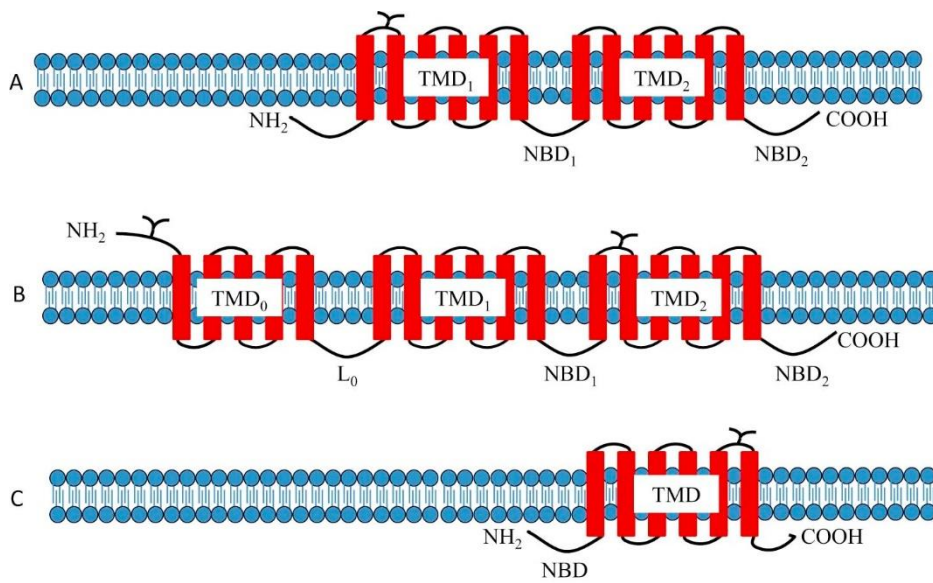


Abbildung 1-7: Topologie der ABC-Transporter P-Gp (A), MRP2 (B) und BCRP (C) (aus Chen et al. 2016)
TMD: Transmembrandomäne, NBD: Nukleotid-Bindungsdomäne, L₀: Schleife 0

1.5 Plasmaproteinbindung

Die Plasmaproteinbindung spielt im Zusammenhang mit der pharmakologischen Wirksamkeit eines Arzneistoffs eine wichtige Rolle (Bohnert und Gan 2013; Howard et al. 2010; Schmidt et al. 2010; Smith et al. 2010; Zeitlinger et al. 2011). Das Konzept, das hierbei Anwendung findet, ist die sogenannte „free drug hypothesis“ (Bohnert und Gan 2013; Howard et al. 2010; Smith et al. 2010; Trainor 2007). Diese Theorie besagt, dass die freien Konzentrationen eines Arzneistoffs im Plasma und Gewebe bzw. intrazellulär gleich sind und nur die freie Konzentration im Gewebe bzw. intrazellulär für die Bindung an das Zielprotein zur Verfügung steht und somit pharmakologisch aktiv ist (Bohnert und Gan 2013; Smith et al. 2010). Dies trifft allerdings nur zu, wenn keine aktiven Prozesse beteiligt sind, wie Uptake- oder Efflux-Transporter oder ein pH-Gradient, und ein stationäres Gleichgewicht vorhanden ist (Bohnert und Gan 2013; Howard et al. 2010; Smith et al. 2010; Trainor 2007). D.h. die Permeation eines Arzneistoffs beruht auf passiver Diffusion, weshalb der Konzentrationsgradient über eine Biomembran die treibende Kraft darstellt (Smith et al. 2010; Howard et al. 2010). Nur Substanzen, die eine hohe Permeationsrate aufweisen, können im Körper dieses Gleichgewicht erreichen (Smith et al. 2010; Trainor 2007).

Die pharmakologische Aktivität eines Arzneistoffs wird zunächst *in vitro* bestimmt. Eine Übertragung auf die *in vivo* Situation ist allerdings schwierig, da die Arzneistoffe *in vitro* unspezifisch an die Apparatur adsorbieren können und häufig Zellen verwendet werden, die das Zielprotein überexprimieren, weshalb eine höhere Arzneistoffkonzentration eingesetzt werden muss. Somit besteht nicht zwingend eine Korrelation zwischen der freien Arzneistoffkonzentration, die *in vitro* bestimmt wurde, und der Effektivität dieses Arzneistoffs *in vivo* (Smith et al. 2010). Smith et al. (2010) schlussfolgerten zudem in einem Review über Plasmaproteinbindung, dass die Bindung eines Arzneistoffs an Plasmaproteine nur wenig Einfluss auf die Wirksamkeit dieses Arzneistoffs *in vivo* hat und die freie Konzentration dieses Arzneistoffs im Zielgewebe wichtiger ist. Es muss somit zwischen der ungebundenen Fraktion und der freien Konzentration unterschieden werden. Die freie Konzentration eines Arzneistoffs kann beispielsweise gesteigert werden, indem die Löslichkeit, die Permeationsrate oder die metabolische Stabilität des Arzneistoffs verbessert werden (Smith et al. 2010). Der Körper stellt ein dynamisches Zusammenspiel mehrerer Prozesse dar, weshalb die Plasmaproteinbindung nicht allein für die pharmakologische Wirksamkeit eines

Arzneistoffs betrachtet werden darf (Bohnert und Gan 2013; Smith et al. 2010). Nichtsdestotrotz ist es wichtig die Plasmaproteinbindung zu bestimmen, da diese beispielsweise bei der renalen Clearance eine wichtige Rolle spielt. Nur ungebundener Arzneistoff kann glomerulär filtriert und aktiv sekretiert werden (Bohnert und Gan 2013; Zeitlinger et al. 2011). Für die hepatische Clearance ist die Plasmaproteinbindung nur für Arzneistoffe mit einer niedrigen Extraktionsrate von Bedeutung (Bohnert und Gan 2013). Änderungen in der Plasmaproteinbindung können ebenso das Verteilungsvolumen eines Arzneistoffs beeinflussen (Zeitlinger et al. 2011).

Zwei Proteine im Blut sind hauptsächlich verantwortlich für die Plasmaproteinbindung: saures α_1 -Glykoprotein (AAG) und humanes Serumalbumin (HSA) (Howard et al. 2010; Schmidt et al. 2010; Trainor 2007). Arzneistoffe können aber auch an Lipoproteine oder Erythrozyten binden (Bohnert und Gan 2013; Schmidt et al. 2010). Die Plasmakonzentration der Lipoproteine ist variabel und liegt unter 0,5 g/dL (Mehvar 2005). Beispiele für Arzneistoffe, die an Lipoproteine binden, sind Cyclosporin und Tacrolimus, die mit einem Anteil von 98 % bzw. 97 % binden (Dasgupta 2007). Erythrozyten agieren neben den Plasmaproteinen als sekundäres Transport-System im Blut. Im Gegensatz zu den Plasmaproteinen nehmen sie Xenobiotika schlechter auf und geben diese auch schneller ab. Nur wenn eine hohe Plasmakonzentration eines Xenobiotikums vorliegt, spielen Erythrozyten eine physiologische oder klinisch relevante Rolle (Highley und De Bruijn 1996).

HSA kommt im Blut in einer Konzentration von ca. 600 μM vor, AAG dagegen in einer Konzentration von ca. 12 - 31 μM (Trainor 2007). Der Gewichtsanteil von HSA entspricht ca. 3,5 - 5 %, AAG hat dagegen nur einen Anteil von 0,04 - 0,1 % im humanen Blut, weshalb HSA die Hauptproteinkomponente darstellt (Schmidt et al. 2010; Trainor 2007). Saure Arzneistoffe weisen eine höhere Affinität für die Bindung an HSA auf, wohingegen basische Arzneistoffe eher an AAG binden (Bohnert und Gan 2013; Howard et al. 2010; Schmidt et al. 2010).

Die Plasmaproteinbindung kann mittels verschiedener *in vitro*-Methoden bestimmt werden, wobei am häufigsten die Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltration oder Ultrazentrifugation verwendet werden (Bohnert und Gan 2013; Howard et al. 2010). Die Gleichgewichtsdialyse findet hierbei häufig als „Referenzmethode“ Anwendung (Trainor 2007; Zeitlinger et al. 2011) und wurde auch in der vorliegenden Arbeit für die Bestimmung der Albuminbindung verwendet. Die Theorie zur Methode ist unter 3.8.1 beschrieben.

2. Material und Methoden

2.1 verwendete Materialien

2.1.1 Stammlösungen

Von den p38 α -MAPK-Inhibitoren und Transporter-Inhibitoren wurden Stammlösungen in DMSO hergestellt (vgl. Tabelle 2-1), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2-1: Konzentrationen der Stammlösungen der verwendeten Inhibitoren in DMSO

Substanz	Inhibitionstarget	Konz. der Stammlösung in DMSO
FS089	p38 α MAPK	10 mM
FS100	p38 α MAPK	10 mM
Ko143	BCRP	10 mM
MK571	MRP2	20 mM
SK807	p38 α MAPK	10 mM
Valspodar	P-Gp	5 mM
Verapamil	P-Gp	20 mM
Zosuquidar	P-Gp	5 mM

2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Tabelle 2-2: verwendete Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	ausführliche Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Acetonitril	Acetonitrile HPLC grade	J. T. Baker; Riedel-de Haen
Anti-BCRP Antikörper	Rabbit monoclonal to BCRP/ABCG2, Isotype IgG	Abcam
Anti-P-Gp Antikörper	P-Glycoprotein Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody, IgG	Thermo Scientific
Anti-β-Actin Antikörper	β -Actin (C4): sc-47778	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Blockpuffer	Blocking buffer (TBST, 1 % (w/v) Milchpulver, 1 % (w/v) BSA)	Pharmazeutische Technologie, Uni Heidelberg
BSA	Bovine Serum Albumin, heat shock fraction, protease free, essentially globulin free, pH 7, \geq 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Bezeichnung	ausführliche Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Calcein AM	Calcein AM (1 mM solution in anhydrous DMSO)	MoBiTec GmbH
CellLytic MT	CellLytic™ MT Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cholesterol	Cholesterol, Ph. Eur. 8.2, Ausgangsm. Wollfett	Caesar & Loretz GmbH
CMFDA	CellView Green CMFDA	ABP Biosciences
CO₂	Kohlendioxid, Schutzgas ISO 14175-C1-C	Westfalen AG
cComplete Mini	cComplete Mini, EDTA-free, Protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics GmbH
DMEM + GlutaMAX	DMEM (1x) + GlutaMAX™, Dulbecco's Modified Eagle Medium	gibco, Life Technologies Corporation
DMSO	DMSO, Dimethylsulfoxid, SPECTRONORM	VWR Prolabo
DPBS	DPBS (1x), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, (-) CaCl ₂ , (-) MgCl ₂	gibco, Life Technologies Corporation
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DTT	DL-Dithiothreitol for molecular biology, ≥ 98 % (HPLC), ≥ 99 % titration	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Einfriermedium	Recovery™ Cell Culture Freezing Medium	gibco, Life Technologies Corporation
Ethanol	Ethanol HPLC grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FaSSIF	FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF	biorelevant.com
FBS	FBS, Fetal Bovine Serum, EU Approved Origin, Origin: South America	gibco, Life Technologies Corporation
Fluorescein	Fluorescein-Na	Merck KGaA
FS089	FS089, LN1060	Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen
FS100	FS100, LN1061	Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen
Gentamicin	Gentamicin (50 mg/mL)	gibco, Life Technologies Corporation
Goat anti-Mouse Antikörper	KPL Peroxidase-Labeled Affinity Purified Antibody To Mouse IgG (H+L) Produced in Goat	LGC SeraCare

Bezeichnung	ausführliche Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Goat anti-Rabbit Antikörper	Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Superclonal Recombinant Secondary Antibody, HRP	Thermo Scientific
HBSS	HBSS (10x) Hank's Balanced Salt Solution, [+] CaCl ₂ , [+] MgCl ₂	gibco, Life Technologies Corporation
HEPES	HEPES, BioXtra	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ibuprofen	Ibuprofen	Vivatis Pharma GmbH, Hamburg
Isopropanol	2-Propanol, puriss. p.a., ACS reagent, ≥ 99,8 % (GC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kalibrierlösung pH-Meter pH 4,01	Certipur®, Pufferlösung, Kaliumhydrogenphthalat, pH 4,01 (25 °C)	Merck KGaA
Kalibrierlösung pH-Meter pH 7,00	Certipur®, Pufferlösung, Kaliumdihydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat, pH 7,00 (25 °C)	Merck KGaA
Kalibrierlösung pH-Meter pH 9,00	Certipur®, Pufferlösung, Borsäure/Kaliumchlorid/Natriumhydroxid-Lösung, pH 9,00 (25 °C)	Merck KGaA
Ko143	Ko143	Cayman Chemical Company
Laufpuffer	Running buffer pH 8,3; Tris base 3 g/L, Glycin 14,4 g/L, SDS 1 g/L	Pharmazeutische Technologie, Uni Heidelberg
Lidocain	Lidocain	Caesar & Loretz GmbH
Methanol	Methanol for HPLC, gradient grade, ≥ 99.9 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Milchpulver	Milchpulver, Blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth
Mitoxantron	Mitoxantrone dihydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
MK571	MK571 sodium salt	MedChemtronica AB
Molekulargewichts-Marker	Precision Plus Protein All Blue	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Mykoplasmen Detektionskit	Venor®GEM Advance - Pre-aliquoted Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR	Minerva Biolabs GmbH
NaCl	NaCl	Caesar & Loretz GmbH
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth

Bezeichnung	ausführliche Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
NaOH 1 M	NaOH 1 M	Fisher Scientific, Belgium
NEAA	MEM NEAA (100x), Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids	gibco, Life Technologies Corporation
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL, 10,000 µg/mL)	Thermo Scientific
Phosphorsäure	ortho-Phosphorsäure, reinst	Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen
Pierce BCA Protein Assay Kit	Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Polysorbat 80	Kolliphor® PS 80	BASF SE, Ludwigshafen
Probenpuffer	Gel loading (sample) buffer 2x 10 % SDS, 25 % Glycerol, 25 % β-Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau	Pharmazeutische Technologie, Uni Heidelberg
Procain	Procainhydrochlorid	Caesar & Loretz GmbH
Rhodamin	Rhodamin 123 HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SK807	SK807, LN811	Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen
Tariquidar	Tariquidar	MedChemtronica AB
TBST	Tris-buffered Saline mit Polysorbat 20	Pharmazeutische Technologie, Uni Heidelberg
TFA	TFA, Trifluoressigsäure, Chromosolv® for HPLC, ≥ 99.0 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Transferpuffer	Transfer buffer pH 8,3 mit 20 % (V/V) Methanol Tris base 5,8 g/L, Glycin 2,9 g/L, SDS 0,37 g/L	Pharmazeutische Technologie, Uni Heidelberg
Triton X-100	Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin	0,25 % Trypsin-EDTA (1x)	gibco, Life Technologies Corporation
Valspodar	Valspodar ≥98 % (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Verapamil	Verapamil HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Bezeichnung	ausführliche Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Western Lightning	Western Lightning Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate	PerkinElmer
WST-1	Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Zosuquidar	Zosuquidar (LY335979) 3HCl	Selleckchem.com

2.1.3 Materialien und Geräte

Tabelle 2-3: verwendete Materialien und Geräte

Bezeichnung	ausführliche Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
12-Well-Platte	Cell Culture Plate, 12-Well, Tissue Culture Treated, Nonpyrogenic, Polystyrene	Corning Incorporated
8-Kanal-Pipette	8-Kanal-Pipette, Research pro, 300 µL	Eppendorf GmbH
96-Well-Platte, klar	Cell Culture Plate, 96-Well, Tissue culture treated, with lid, flat bottom	Eppendorf AG
96-Well-Platte, schwarz	PP-Microplate, black, 96-Well	Greiner Bio-One GmbH
96-Well-Platte, schwarz, klarer Boden	Assay Plate, 96-Well, With Lid, Black with Clear Flat Bottom, Tissue Culture Treated, Polystyrene	Corning Incorporated
Analysenwaage	Waage CP2245	Sartorius AG
Analysenwaage	Waage Mettler AE 200	Mettler-Toledo GmbH
Autoklav	LabStar 3-4-7	Zirbus technology GmbH
Celluloseacetat Filter	Celluloseacetat Filter, 0,2 µm Porenweite	Sartorius Stedim Biotech GmbH
ChemiDoc Imager	ChemiDoc Imager	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Chopstick-Elektrode	EVOM Chopstick-Elektrode	World Precision Instruments Inc.
Chopstick-Voltohmmeter	EVOM Chopstick-Voltohmmeter	World Precision Instruments Inc.
CO₂-Inkubator	HERAcell vios 160i	Thermo Scientific
Cryovials	Cryovials True North™, 2 mL, 49 mm Länge, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG
Deckgläser	Deckgläser (15x15 mm)	VWR
Dialysemembran	Spectra/Por® 3 Dialysis Membrane, MWCO: 3,5 kD, Nominal Flath Width 45 mm, Diameter 29 mm, Volume/Length 6,4 mL/cm	Spectrum Laboratories, Inc.

Bezeichnung	ausführliche Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Falcon-Tubes 15 mL	Cellstar® Tubes Reaktionsgefäße PP 15 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH
Falcon-Tubes 50 mL	Cellstar® Tubes Reaktionsgefäße PP 50 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH
Filterpapier für Westernblot	Filterpapier	Pharmazeutische Technologie, Uni Heidelberg
Gelkammer	Mini PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
HPLC	DGU-20A 5R, Degassing Unit	Shimadzu Corporation
	LC-20AT, Pump	Shimadzu Corporation
	SIL-20AC HT, Autosampler	Shimadzu Corporation
	SPD-20A, UV/Vis Detector	Shimadzu Corporation
	CBM-20A, Communication Bus Module	Shimadzu Corporation
	CTO-10AS VP, Column Oven	Shimadzu Corporation
HPLC-Vials	Vials N8, konisch, Gewinde, 1,1 mL, 11,6 x 32 mm, klar	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Kanüle 21 G	Sterican® Einmal-Injektions-Kanüle, 0,80x120 mm BL/LB, 21 G 4 ³ / ₄ ", steril	B. Braun Melsungen AG
LAF-Box	Sicherheitswerkbank HERA safe, Klasse 2, Typ H	Heraeus/Kendro Laboratory Products
Magnetrührer	IKA-COMBIMAG RCT	IKA Werke GmbH & Co. KG
Magnetrührer	MR Hei-Mix L	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Mikroskop	Inverses Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG
Mikrozentrifugenröhrchen 0,5 mL	Micro-Centrifuge Tubes 0,5 mL, with Graduations	VWR International
Mikrozentrifugenröhrchen 1,7 mL	Micro-Centrifuge Tubes 1,7 mL, with Graduations	VWR International
Mikrozentrifugenröhrchen 2 mL	Micro-Centrifuge Tubes 2,0 mL, with Graduations	VWR International
Neubauer-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm, gemäß DIN 12874)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Parafilm	Parafilm® "M" Laboratory Film	Bemis Company, Inc.
pH-Meter	SevenEasy pH Meter	Mettler-Toledo GmbH
Pipette 0,5-10 µL	Eppendorf-Research-Pipette 10 µL	Eppendorf GmbH
Pipette 10-100 µL	Eppendorf-Research-Pipette 100 µL	Eppendorf GmbH
Pipette 100-1000 µL	Transferpipette S 1000 µL	Brand GmbH & Co. KG

Bezeichnung	ausführliche Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Pipette 20-200 µL	Transferpipette S 200 µL	Brand GmbH & Co. KG
Pipette 500-2500 µL	Eppendorf-Research-Pipette 2500 µL	Eppendorf GmbH
Pipette 500-5000 µL	Eppendorf-Research-Pipette 5000 µL	Eppendorf GmbH
Pipetten 10 mL	Cellstar® Pipetten 10 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH
Pipetten 25 mL	Cellstar® Pipetten 25 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitzen	epT.I.P.S	Eppendorf GmbH
Pipettierhilfe	Easypet 3	Eppendorf GmbH
Platereader BioTek	BioTek SynergyHT	BioTek Instruments
Platereader Spark	Platereader Spark	Tecan Trading AG
Platereader Varioskan	Varioskan LUX	Thermo Scientific
Präzisionswaage	XP205 DeltaRange®	Mettler-Toledo GmbH
Präzisionswaage	XPE205 DeltaRange®	Mettler-Toledo GmbH
PVDF-Membran	PVDF Membran	Merck Millipore, (Pharmazeutische Technologie, Uni Heidelberg)
RO-H₂O-Anlage	PURELAB Option-Q	ELGA LabWater
Schraubkappen HPLC-Vials	Schraubkappen N8, schwarz, 1,3 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Schüttelwasserbad	Schüttelwasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik
Schüttler	Vibrofix VF1 Electronic	IKA Werke GmbH & Co. KG
SDS-Page	Mini-PROTEAN Precast Gels	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Skalpellsäge	Sterile Skalpellsäge	C. Bruno Bayha GmbH
Spritze 2 mL	Injekt® Luer Solo, 2 mL, steril	B. Braun Melsungen AG
Stoppuhr	Timer Labsolute®	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Stromversorgung Gelkammer	Power Pac Universal	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Thermocycler	Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Tischschüttler	neoLab Cat SF5	neoLab Migge GmbH

Bezeichnung	ausführliche Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Transwell	Transwell®, 12 mm Inserts, 12 Well Plate, Polyester Membrane, 0,4 µm Pore Size, Polystyrene Plates, Tissue Culture Treated	Corning Incorporated
UV-Star Platte	UV-STAR® Microplatte, 96-Well, F-Boden, µClear	Greiner Bio-One GmbH
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.
Zellkulturflasche 25 cm²	Nunc™ behandelte Zellkulturkolben mit Filterkappen, 25 cm ² , steril	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflasche 80 cm²	TC Flask, 80 cm ² SI, Filter Cap N	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
Zentrifuge mini Spin	Eppendorf mini Spin	Eppendorf AG

2.1.4 Software

Tabelle 2-4: verwendete Software

Bezeichnung	Versionsnummer	Hersteller/Vertrieb
GraphPadPrism	Version 8.2.1	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	Version 1.53c	National Institute of Health, USA
LabSolutions	Version 5.87 SP1	Shimadzu Corporation
Quantity One	Version 4.6.9	Bio-Rad Laboratories, Inc.
SkantIt	Software 5.0 for Microplate Readers	Thermo Fisher Scientific Oy
Spark Control	Version 2.3	Tecan Trading AG

2.2 Adsorptionsstudien

2.2.1 Wiederfindung von FS100 nach Lagerung in Glas- oder Plastikgefäßen bei unterschiedlichen Temperaturen

Es wurden Proben in HBSS in HPLC-Vials und Mikrozentrifugenröhrchen bei 4 °C und 37 °C für 2 h inkubiert. Für die Quantifizierung mittels HPLC wurden Proben vor und nach der Inkubation aus den Mikrozentrifugenröhrchen in HPLC-Vials gezogen bzw. direkt aus den HPLC-Vials injiziert.

Stellvertretend für die p38 α -MAPK-Inhibitoren wurde FS100 in einer Konzentration von 10 μ M in HBSS mit DMSO in einer Endkonzentration von 0,5 % eingesetzt. FS100 wurde mit den Transporter-Inhibitoren Ko143, MK571 oder Tariquidar in den Konzentrationen 5 μ M, 10 μ M bzw. 5 μ M kombiniert. Zusätzlich wurde eine Probe aus FS100 und einem Cocktail aus den Transporter-Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen getestet. Da die Proben nach der Inkubation nicht gleichzeitig vermessen werden konnten, erfolgte eine zwischenzeitliche Lagerung auf Eis. Die Quantifizierung mittels HPLC erfolgte wie unter 2.3 beschrieben. Allerdings wurde der anfängliche Gradient um eine Minute und die Äquilibrierungszeit am Ende um zwei Minuten verkürzt. Die Wiederfindung wird in Prozent angegeben und bezieht sich auf die jeweilige Anfangskonzentration in den einzelnen Proben.

2.2.2 Probenaufbereitung in HPLC-Vials

Zu den Proben für die HPLC, bestehend aus FS100 10 μ M in HBSS mit 0,5 % DMSO, wurden 85 %-ige Phosphorsäure und Acetonitril (ACN) in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt.

Zusätzlich wurden Cocktails aus p38 α -MAPK und Transporter-Inhibitoren in HBSS hergestellt. Die Cocktails enthielten die Substanzen in den folgenden Konzentrationen: p38 α -MAPK-Inhibitor 10 μ M, MK571 10 μ M, Ko143 5 μ M und Tariquidar 5 μ M. Die Endkonzentration an DMSO betrug 0,5 %. In die HPLC-Vials wurden 200 μ L H₃PO₄ 85 % und ACN in einem Verhältnis 1+3 vorgelegt. Anschließend wurden 400 μ L des Cocktails hinzu pipettiert, so dass die Endkonzentration an H₃PO₄ 7,1 % und an ACN 25 % betrug. Die Proben wurden viermal über einen Zeitraum von 10 h injiziert. Für die Quantifizierung wurde die unter 2.3 beschriebene Methode verwendet.

2.2.3 Probenvorbereitung in Plastikgefäßen

Für die Überprüfung der Wiederfindung wurden zwei Ansätze näher verfolgt: Zum einen der klassische Ansatz mit den p38 α -MAPK-Inhibitoren in einer Konzentration von 10 μ M in HBSS pH 7,4 und zum anderen ein alternativer Ansatz mit den p38 α -MAPK-Inhibitoren in einer Konzentration von 100 μ M in isotoner Kochsalzlösung pH 4,1.

Die Lösungen wurden 1 h bei 37 °C inkubiert und es wurden Proben von 200 μ L zu Beginn und am Ende der Inkubationszeit gezogen und entsprechend 2.2.2 (Cocktail) aufbereitet. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC entsprechend 2.3.

2.2.4 Adsorption an Zellkulturplatten

Für die Überprüfung der Adsorption an Zellkulturplatten wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA inkubiert. Dazu wurden 1 % (w/v), 2 % (w/v) und 4 % (w/v) BSA in RO-H₂O gelöst und 4 mL pro Well appliziert. Die Zellkulturplatten wurden über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Vorverdünnung mit SK807 in einer Konzentration von 100 μ M in isotoner Kochsalzlösung pH 4,1 mit DMSO in einer Endkonzentration von 0,5 % hergestellt. Die Zellkulturplatten, welche mit einer BSA-Lösung vorinkubiert wurden, und zum Vergleich welche, die nicht mit einer BSA-Lösung behandelt wurden, wurden zweimal mit auf 37 °C temperierter HBSS gespült und es wurde temperierte HBSS vorgelegt. Die Stammlösung wurde hinzugefügt, wodurch eine 1:10 Verdünnung in der Platte erfolgte. 200 μ L Probe wurden gezogen und entsprechend 2.2.2 aufbereitet. Die Platte wurde 2 h im Schüttelwasserbad bei 37 °C und 67 rpm inkubiert. Am Ende wurden nochmals 200 μ L Probe gezogen und ebenfalls entsprechend 2.2.2 mit 100 μ L H₃PO₄/ACN (3+1) aufbereitet. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC entsprechend 2.3.

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellkulturplatten über Nacht mit 2 mL 2 % (w/v) BSA in RO-H₂O bzw. Medium (2.4.1.1) gefüllt bei Raumtemperatur bzw. im CO₂-Inkubator gelagert und am Folgetag zweimal mit 2 mL vortemperierter HBSS (37 °C) gespült. Vorverdünnungen von SK807 in Konzentrationen von 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M wurden in 0,9 % NaCl pH 4,1 hergestellt. In die gespülten Zellkulturplatten wurden 1530 μ L HBSS (37 °C) und 170 μ L der entsprechenden Vorverdünnung pipettiert. Sofort wurde eine Anfangsprobe von 200 μ L in HPLC-Vials mit 100 μ L ACN/H₃PO₄ (3+1) gezogen. Die Platten wurden verschlossen und 2 h im

Schüttelwasserbad (37 °C, 67 rpm) inkubiert. Anschließend wurde erneut eine 200 µL Probe gezogen. Die Zellkulturplatten wurden zweimal mit 2 mL temperierter HBSS (37 °C) gespült. In jedes Well wurden 1,5 mL 70 % ACN (v/v) pipettiert. Eine Probe davon wurde mittels HPLC entsprechend 2.3 quantifiziert. Pro Versuchsansatz wurden zwei Wells verwendet.

2.2.5 Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte

Eine Kalibrierung mit den p38α-MAPK-Inhibitoren wurde entsprechend den zuvor gewonnenen Erkenntnissen durchgeführt. Dabei wurde die Methode gleichfalls validiert. Der Konzentrationsbereich der p38α-MAPK-Inhibitoren betrug 0,5 - 10 µM. Zunächst wurde eine 12-Well-Zellkulturplatte mit 2 % (w/v) BSA in RO-H₂O über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die BSA Lösung abgesaugt, einmal mit 4 mL HBSS (37 °C) und einmal mit 2 mL HBSS (37 °C) gespült. Die Proben für die Kalibrierung wurden in isotoner Kochsalzlösung pH 4,1 in zehnfacher Konzentration der eigentlichen Kalibrierkonzentration hergestellt. 1 530 µL HBSS (37 °C) wurden pro Well vorgelegt und 170 µL Kalibrierlösung zugefügt. 200 µL Probe wurden in ein HPLC-Vial, in dem 100 µL ACN/H₃PO₄ (3+1) vorgelegt wurden, gezogen. Die Wells wurden im 30 s Takt befüllt. Die Zellkulturplatte wurde verschlossen und 2 h bei 37 °C und 67 rpm im Schüttelwasserbad inkubiert. Eine Probe der Vorverdünnung (Kalibrierlösung) wurde ebenfalls in ein HPLC-Vial gezogen. Dazu wurden 100 µL ACN/H₃PO₄ (3+1) mit 180 µL HBSS vorgelegt und 20 µL der Vorverdünnung hinzugefügt. Die Endproben von 200 µL wurden im 30 s Takt in HPLC-Vials mit 100 µL ACN/H₃PO₄ (3+1) gezogen. Die Quantifizierung erfolgte wie unter 2.3 beschrieben.

2.3 Quantifizierung der p38 α -MAPK-Inhibitoren

Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC. Als stationärer Phase wurde eine EC 125/4 Nucleosil 100-5 C18 Säule mit einer EC 4/3 Universal RP Vorsäule verwendet. Es wurde ein Gradient entsprechend Tabelle 2-5 gefahren.

Tabelle 2-5: HPLC-Gradient für die Quantifizierung der p38 α -MAPK-Inhibitoren

Zeitpunkt [min]	Konz. A [%]	Konz. B [%]
0	100	0
13	0	100
14	0	100
15	100	0
20	100	0

Fließmittel A: RO-H₂O, 10 % Acetonitril, 0,1 % TFA, B: Acetonitril, 0,1 % TFA

Die Flussrate betrug 1 mL/min, die Temperatur des Säulenofens 25 °C, die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 und 370 nm, das Injektionsvolumen betrug 100 μ L. Die Injektionsnadel wurde vor und nach der Injektion mit 500 μ L Autosampler-Spüllösung (MeOH:RO-H₂O, 50:50) gespült.

2.4 Kultivierung der Caco-2/TC7 und MDCKII Zellen

2.4.1 Zellkultur

2.4.1.1 Caco-2/TC7

Bei den Caco-2/TC7 Zellen handelt es sich um einen Subklon der Caco-2 Zellen, der aus Passage 198 generiert wurde (Chantret et al. 1994).

Die in dieser Arbeit verwendeten Caco-2/TC7 Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. K.-W. Bok vom Toxikologischen Institut der Eberhard Karls Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

Die Zellkultivierung erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Als Medium wurde DMEM GlutaMax mit 10 % FBS, 1 % NEAA und 0,1 % Gentamicin verwendet.

2.4.1.2 MDCKII

Die MDCKII MDR1-High2 und MDCKII BCRP Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. G. Fricker vom Pharmazeutischen Institut der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Als Medium wurde DMEM GlutaMax mit 10 % FBS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin verwendet.

2.4.2 Kryokonservierung

Für die Vorratshaltung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei einer Konfluenz von 80 - 90 % in einer Zellkulturflasche (80 cm²) wurden die Zellen zunächst mit 10 mL auf 37 °C temperierter DPBS gespült und anschließend für 5 - 8 min bei 37 °C trypsinisiert (4 mL Trypsin + DPBS (1+3)). Zum Abstoppen der Trypsinisierung wurde 11 mL Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension bei 1 300 rpm für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 10 mL 4 °C kaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde à 1,8 mL auf Kryoröhrchen verteilt und sofort auf Eis gelagert. Die Röhrchen wurden für 2 h bei -20 °C und danach für 24 h bei -80 °C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.4.3 Auftauen der Zellen

Für das Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen in der Hand leicht erwärmt und in 14 mL temperiertem Medium (37 °C) überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt

(1 300 rpm, 5 min, Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 7 mL temperiertem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt und anschließend im CO₂-Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % rF) bis zu einer 70 - 90 %-igen Konfluenz inkubiert.

2.4.4 Kultivierung der Zellen

Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 - 90 % in der Zellkulturflasche wurden die Zellen subkultiviert.

Dafür wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen zunächst mit 10 mL auf 37 °C temperierter DPBS gespült und anschließend für 5 - 8 min bei 37 °C trypsinisiert (4 mL Trypsin + DPBS (1+3)). Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 11 mL Medium unterbrochen und die Suspension zentrifugiert (1 300 rpm, 5 min, Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde in frischem, temperiertem Medium resuspendiert und die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Für die entsprechenden Kulturgefäße kann die Aussaatdichte und die Kultivierungsdauer Tabelle 2-6 und Tabelle 2-7 entnommen werden. Die Kultivierung erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Feuchte. Das Medium wurde 12 - 24 h nach der Subkultivierung, alle 2 - 3 Tage und am Tag vor dem Zellversuch gewechselt.

Tabelle 2-6: Kultivierung der Caco-2/TC7 Zellen, Aussaatdichte und Zeitraum

Kulturgefäß	Aussaatdichte	Kultivierungszeitraum	Verwendung
Zellkulturflasche 80 cm ²	200 000 Zellen/Flasche	ca. 5 Tage	Subkultur
Transwell	60 000 Zellen/Well	21 - 28 Tage	Permeationsstudien
12-Well	100 000 Zellen/Well	14; 21 - 28 Tage	Western Blot
96-Well, schwarz, klarer Boden	35 000 Zellen/Well	21 - 28 Tage	Fluoreszenz Assay
96-Well, schwarz, klarer Boden	15 000 Zellen/Well	21 - 28 Tage	Fluoreszenz Assay
96-Well, klar	15 000 Zellen/Well	8 Tage	WST-1 Assay

Tabelle 2-7: Kultivierung der MDCKII MDR1-High2 und MDCKII BCRP Zellen, Aussaatdichte und Zeitraum

Kulturgefäß	Aussaatdichte	Kultivierungs- zeitraum	Verwendung
Zellkulturflasche 80 cm ²	200 000 Zellen/Flasche	3 - 4 Tage	Subkultur
12-Well	100 000 Zellen/Well	4; 7 Tage	Western Blot
96-Well, schwarz, klarer Boden	15 000 Zellen/Well	7 - 8 Tage	Fluoreszenz-Assay

2.5 Permeationsstudien – grundlegende Methoden

In dieser Arbeit wurden verschiedene Permeationsstudien durchgeführt. Um eine Beteiligung von Efflux-Transportern an der Permeation von APIs nachzuweisen, wurde die Permeation in absorptiver bzw. sekretorischer Richtung betrachtet. Der apparente Permeabilitätskoeffizient wurde nach Formel 2-1 berechnet. Aus den daraus gewonnenen Daten konnte die Effluxrate nach Formel 2-2 berechnet werden. Zusätzlich wurde die Wiederfindung nach Formel 2-3 berechnet.

$$P_{app} \left[\frac{cm}{s} \right] = \frac{dc_A}{dt} * \frac{V_A}{A * c_{D(0)}}$$

c_A	Konzentration Akzeptorkompartiment
$c_{D(0)}$	Konzentration Donorkompartiment, t=0 s
t	Zeit [s]
A	Fläche der PE-Membran, 1,13 cm ²
V_A	Volumen Akzeptorkompartiment

Formel 2-1: Berechnung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten

$$ER = \frac{P_{app;BL \rightarrow AP}}{P_{app;AP \rightarrow BL}}$$

Formel 2-2: Berechnung der Effluxrate

$$WF [\%] = \frac{c_{D(fin)} * V_D + c_{A(fin)} * V_A}{c_{D(0)} * V_D} * 100$$

$c_{A(fin)}$	finale Konzentration Akzeptorkompartiment
$c_{D(fin)}$	finale Konzentration Donorkompartiment
$c_{D(0)}$	Konzentration Donorkompartiment, t=0 s
m_{int}	intrazelluläre Menge
V_A	Volumen Akzeptorkompartiment
V_D	Volumen Donorkompartiment

Formel 2-3: Berechnung der Wiederfindung Permeationsexperimente

2.5.1 Permeation

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie ein Zellversuch im Allgemeinen durchgeführt wurde.

Es wurden Caco-2/TC7 Zellen der Passagen 30 - 38 verwendet.

Lösungen, die während des Versuchs eingesetzt wurden, wurden auf 4 °C oder 37 °C temperiert.

Ein Transwell, in dem die Zellen 21 - 28 Tage kultiviert wurden (2.4.4), wurde aus dem Inkubator genommen und der TEER gemessen (2.5.2.1). Anschließend wurden die Zellen 2 - 3-mal mit temperierter HBSS gespült und die Inserts in eine neue Zellkulturplatte überführt. Die Lösungen für die Vorinkubation wurden zuerst apikal,

dann basolateral aufgetragen. Wurden Transporter-Inhibitoren eingesetzt, so befanden sich diese bereits in entsprechender Konzentration in den Vorinkubationslösungen. Das apikale Volumen betrug 500 μL , das basolaterale 1 500 μL . Die Zellen wurden bei entsprechender Temperatur 30 min äquibriert. Anschließend wurde erneut der TEER überprüft und die Versuchslösungen – im Abstand von 30 s zwischen den einzelnen Wells – aufgetragen. Dabei wurde im Donorkompartiment 200 μL mehr im Vergleich zur Vorinkubation aufgetragen und sofort mittels Eppendorf-Pipette eine Probe von 200 μL gezogen. Die Platte wurde entsprechend der für den Versuch festgelegten Bedingungen inkubiert. Am Ende wurden – im Abstand von 30 s – Proben mittels Eppendorf-Pipette aus dem Akzeptor- und Donorkompartiment gezogen. Die Versuchslösungen wurden abgesaugt und es wurde entweder ein Integritätstest mit Fluorescein-Na (2.5.2.2) durchgeführt oder die Zellen wurden für die Bestimmung der intrazellulären Menge vorbereitet. Dazu wurden diese mit kalter (4 °C) HBSS gespült. Zuerst wurden 1 000 μL im ersten Well apikal aufgetragen und sofort abgesaugt und anschließend entsprechend mit den anderen Wells verfahren. Danach wurde in jedem Well 500 μL HBSS apikal aufgetragen und zusammen abgesaugt. Zum Schluss wurden 500 μL HBSS apikal und 1 500 μL basolateral aufgetragen und der TEER bei 4 °C bestimmt. Die HBSS wurde abgesaugt und die Zellen wurden im Kühlschrank bis zur Bestimmung der intrazellulären Menge (2.5.3) gelagert.

2.5.2 Integritätstests

2.5.2.1 TEER-Messung

Standardmäßig wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) zu Beginn in Medium bei 37 °C, nach der Vorinkubation und am Ende des Zellversuchs in temperierter HBSS vorgenommen. Dazu wurden die EVOM-Chopstick-Elektroden in das entsprechende Medium senkrecht eingetaucht, so dass das kürzere Elektrodenpaar ins apikale Kompartiment und das längere ins basolaterale Kompartiment ragte. Der Widerstand wurde abgelesen und der TEER nach Formel 2-4 berechnet. Nur Zellen, die einen TEER von mind. 160 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ aufwiesen (Turco et al. 2011, Caro et al. 1995), wurden für die Permeationsversuche verwendet.

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

R_{Zellen} Widerstand über bewachsene PE-Membran
 R_0 Widerstand über unbewachsene PE-Membran
 A Fläche der PE-Membran, 1,13 cm²

Formel 2-4: Berechnung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

2.5.2.2 Permeation von Fluorescein-Natrium

Anschließend an einen Permeationsversuch wurden die noch vorhandenen Lösungen im Transwell abgesaugt und die Zellen zweimal mit auf 37 °C temperierter HBSS gespült. Die Platte wurde mit frischer temperierter HBSS für 20 min im Schüttelwasserbad (37 °C, 67 rpm) inkubiert. Nach der Vorinkubation wurde erneut der TEER überprüft und die HBSS abgesaugt. Die Inserts wurden in eine neue Zellkulturplatte überführt. Nun wurden 500 µL einer temperierten 100 µg/mL Fluorescein-Natrium-Lösung in HBSS apikal im ersten Well aufgetragen und die Zeit gestartet. Basolateral wurden 1 500 µL temperierte HBSS hinzugefügt. Nach 30 s wurde mit dem zweiten Well analog verfahren, bis alle Wells befüllt waren. Die Platte wurde 60 min im Schüttelwasserbad (37 °C, 67 rpm) inkubiert. Anschließend erfolgte ein Probenzug von 200 µL aus dem basolateralen Akzeptorkompartiment in eine schwarze 96-Well-Fluoreszenzplatte. Eine 5-Punkt-Kalibrierung erfolgte im Bereich von 0,2 - 1,0 µg/mL. Die Quantifizierung erfolgte mittels Platereader (BioTek Synergy HT) entsprechend Tabelle 2-8. Es wurden nur P_{app}-Werte kleiner 1,5x10⁻⁶ cm/s akzeptiert. Laut Ingels et al. (2002; 2004) sind Werte kleiner 0,5 %/h*cm² (1,8x10⁻⁶ cm/s) akzeptabel.

Tabelle 2-8: Quantifizierungsmethode Fluorescein-Natrium für Platereader BioTek Synergy HT

Reading Type		End Point
Dectection Method		Fluorescence
Filters:	Excitation	485 nm
	Emission	528 nm
Optics Position		Top
Plate		96 Well, flat bottom, black
Shaking Intensity		2
Duration		10 s
Sensitivity		35

2.5.3 Bestimmung der intrazellulären Menge

Zusätzlich zur permeierten Menge wurde die intrazelluläre Menge, also die Menge an API, die sich intrazellulär anreichert, bestimmt. Dazu wurden die Caco-2/TC7 Zellen lysiert.

Zunächst wurde die PE-Membran des Transwell-Systems aus den Inserts mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten. In Mikrozentrifugenröhrchen wurden 500 µL 2 %-iger (w/v) Triton X-100-Lösung in RO-H₂O mit 0,5 % DMSO vorgelegt, die bewachsenen PE-Membranen hineingegeben und 10 s auf höchster Stufe gevortext. Anschließend wurden die Röhrchen mit den PE-Membranen 20 min auf dem Bioshaker bei Raumtemperatur und 1 500 rpm geschüttelt. Die Röhrchen wurden noch weitere zweimal 10 s auf höchster Stufe gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13 400 rpm für 10 min wurden 100 µL aus dem Überstand für die Proteinbestimmung (2.5.4) und 100 µL für die weitere Quantifizierung der intrazellulären Menge abgenommen. Die Probe für die Proteinbestimmung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung der intrazellulären Menge wurden 200 µL eiskaltes auf -20 °C vorgekühltes Acetonitril zu 100 µL Probe gegeben, 10 s auf höchster Stufe gevortext, um das Protein auszufällen, und 20 min bei 13 400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Quantifizierung mittels HPLC (2.3) verwendet.

Die intrazelluläre Menge an API wurde auf die Proteinmenge bezogen.

2.5.4 Bestimmung der Proteinmenge

Die Proteinmenge wurde mittels Pierce BCA Protein Assay bestimmt.

Die Proben (2.5.3) und zuvor hergestellte und eingefrorene Standards (25 - 2 000 µg Protein/mL) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und 10 s auf höchster Stufe gevortext. 25 µL je Probe wurden auf eine 96-Well UV-Star-Platte übertragen und 200 µL des Working Reagent (Reagent A:B, 50:1) hinzugefügt. Die Platte wurde leicht geschwenkt und verschlossen 30 min im CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde sie 20 min auf Raumtemperatur abkühlen gelassen, bevor die Absorption am Platerader bei 562 nm gemessen wurde. Eine Standardkurve wurde in dreifacher Bestimmung bei jeder Messung mitgeführt.

2.6 P-Gp-Inhibierungsassay

Für den P-Gp-Inhibierungsassay wurde die Sekretion von Rhodamin bei 37 °C untersucht.

Versuchslösungen mit Rhodamin 80 µM wurden ohne Inhibitor oder mit Verapamil 100 µM bzw. Zosuquidar 0,5 µM, 1 µM, 5 µM oder 10 µM in HBSS mit DMSO in einer Endkonzentration von 0,5 % hergestellt. Zusätzlich wurden Vorinkubationslösungen ohne Rhodamin hergestellt, in denen bereits die P-Gp-Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen enthalten waren. Diese Vorinkubationslösungen wurden auch als Versuchslösungen für das Akzeptorkompartiment verwendet. Alle im Versuch eingesetzten Lösungen wurden auf 37 °C temperiert.

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu 2.5.1. Proben, die aus dem Donorkompartiment gezogen wurden, wurden in 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gelagert. Zu Beginn wurde eine 200 µL Probe mittels Eppendorf-Pipette aus dem Donorkompartiment entnommen. Die Hauptinkubation erfolgte im Schüttelwasserbad (37 °C, 67 rpm) für insgesamt 2 h. Ein Probenzug von jeweils 200 µL mittels Eppendorf-Pipette aus dem Akzeptorkompartiment erfolgte nach 20, 40, 60, 80, 100 und 120 min in eine schwarze 96-Well-Fluoreszenzplatte. Das Probenzugsvolumen wurde durch die entsprechende Menge an Vorinkubationslösung zu jedem Zeitpunkt, außer beim letzten Probenzug, ersetzt. Nach 120 min wurden zusätzlich 500 µL Probe aus dem Donorkompartiment gezogen. Die Proben aus dem Donorkompartiment wurden mit HBSS 1:50 verdünnt und ebenfalls in die 96-Well-Fluoreszenzplatte pipettiert. Eine 6-Punkt-Kalibrierung erfolgte im Bereich von 7,2 - 902,7 ng/mL. Die Quantifizierung erfolgte mittels Platerader (BioTek Synergie HT) entsprechend Tabelle 2-9.

An den Permeationsversuch mit Rhodamin anschließend wurde ein Integritätstest mit dem parazellulär permeierenden Marker Fluorescein-Natrium (100 µg/mL) durchgeführt (siehe 2.5.2.2).

Tabelle 2-9: Quantifizierungsmethode Rhodamin für Platerader BioTek Synergy HT

Reading Type	End Point
Detection Method	Fluorescence
Filters:	Excitation 485 nm
	Emission 528 nm
Optics Position	Top
Plate	96 Well, flat bottom, black
Shaking Intensity	2
Duration	10 s
Sensitivity	50

2.7 Permeationsstudien mit SK807 in HBSS (AP, BL)

Am Vortag wurde eine Zellkulturplatte mit 4 mL/Well 2 % (w/v) BSA in RO-H₂O befüllt. Am Versuchstag wurde eine Vorverdünnung von SK807 in isotoner Kochsalzlösung pH 4,1 mit einer Konzentration von 80 µM in einem 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen hergestellt. Die Endkonzentration von SK807 im Transwell betrug 8 µM. Es erfolgte eine Temperierung bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Die Zellkulturplatte wurde zweimal mit temperierter HBSS gespült.

Das Vorgehen war analog wie unter 2.5.1. beschrieben. Die Inserts wurden in die zuvor mit BSA behandelte Zellkulturplatte überführt. Die Inkubation erfolgte im Schüttelwasserbad bei 37 °C und 67 rpm. Die Versuchslösungen bestanden entweder aus HBSS oder HBSS mit MK571 10 µM. Für Studien in absorptiver Richtung wurden 630 µL Versuchslösung und 70 µL Vorverdünnung SK807 apikal aufgetragen. Wurde die Sekretion untersucht, so wurden 1 530 µL Versuchslösung und 170 µL Vorverdünnung SK807 basolateral aufgetragen. Die Hauptinkubation betrug 2 h. Für die Proben (200 µL) wurden HPLC-Vials zuvor mit 100 µL H₃PO₄/ACN (3+1) befüllt, in die die Proben direkt gezogen wurden. Nach dem letzten Probenzug wurde das Transwellssystem für die Bestimmung der intrazellulären Menge vorbereitet (2.5.3, 2.5.4). Die Proben wurden entsprechend 2.3 quantifiziert.

2.8 Eignung von FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) für Permeationsstudien

2.8.1 Herstellung FaSSIF

Die Zusammensetzung von FaSSIF kann Tabelle 2-10 entnommen werden.

Tabelle 2-10: Zusammensetzung FaSSIF (biorelevant.com)

Substanz	Konzentration [mM]
Natriumtaurocholat	3
Lecithin	0,75
NaH ₂ PO ₄	28,65
NaCl	105,85

Zunächst wurde ein Phosphatpuffer pH 6,5 hergestellt:

NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	2,235 g
NaCl	3,093 g
RO-H ₂ O	ad 500 mL

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 6,5 eingestellt.

0,2240 g FaSSIF-Pulver wurden in 100 mL Phosphatpuffer pH 6,5 gelöst und konnten nach 2 h verwendet werden. FaSSIF ist laut Hersteller (biorelevant.com) 48 h bei lichtgeschützter Lagerung bei Raumtemperatur verwendbar.

2.8.2 Wiederfindung

2.8.2.1 Aufbereitung Proben 4 % BSA/HBSS

1 Teil Probe wurde mit 2 Teilen Acetonitril (-20 °C) versetzt und 10 s auf höchster Stufe gevortext. Anschließend wurde die Probe 20 min bei 13 400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Quantifizierung mittels HPLC (2.3) verwendet.

2.8.2.2 HPLC-Vials

SK807 8 µM wurde in 4 % (w/v) BSA/HBSS oder FaSSIF hergestellt. Die Probenaufbereitung für die BSA-Proben erfolgte wie unter 2.8.2.1 beschrieben. Die FaSSIF bzw. aufgearbeiteten BSA-Proben wurden in HPLC-Vials gelagert. Eine Quantifizierung erfolgte durch mehrmalige Injektion aus einem Vial über 19 bzw. 24 h entsprechend 2.3.

2.8.2.3 Falcon-Tubes

SK807 8 μM bzw. SK807 8 μM mit MK571 10 μM wurde in 4 % (w/v) BSA/HBSS oder FaSSIF in Falcon-Tubes für 1 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad (67 spm) gelagert. Proben von 200 μL bzw. 500 μL wurden zu Beginn oder am Ende der Inkubation mittels Eppendorf-Pipette in ein HPLC-Vial gezogen und mittels HPLC (2.3) quantifiziert. Die BSA-Proben wurden vor der Quantifizierung aufbereitet.

Des Weiteren wurde für SK807 8 μM in 4 % (w/v) BSA/HBSS eine Wiederfindung über die Zeit durchgeführt, d.h. aus einem Falcon-Tube wurden Proben nach 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 min mittels Eppendorf-Pipette in ein HPLC-Vial gezogen. Aus einem weiteren Falcon-Tube erfolgte ein Probenzug nach 0 bzw. 60 min. Die Aufbereitung der Proben wurde, wie unter 2.8.2.1 beschrieben, durchgeführt.

2.8.2.4 Transwell

Es wurde eine Transwell-Platte zunächst für einen Tag mit Medium (0,5 mL AP, 1,5 mL BL) im CO₂-Inkubator (37 °C, 95 % rF, 5 % CO₂) inkubiert.

Anschließend wurden die Inserts in eine neue Zellkulturplatte überführt und die Kompartimente zweimal mit den entsprechenden Puffern gespült: AP 0,5 mL Phosphatpuffer pH 6,5; BL 1,5 mL HBSS pH 7,4.

Lösungen für die Vor- und Hauptinkubation wurden in den entsprechenden Puffern hergestellt. Der Versuch war, wie in Tabelle 2-11 dargestellt, aufgebaut.

Tabelle 2-11: Versuchsaufbau Wiederfindung Transwell, FaSSIF/4 % BSA

Spalte Transwell	AP	BL	Richtung
1	SK807 10 μM in FaSSIF	4 % BSA/HBSS	AP → BL
2	SK807 10 μM + MK571 10 μM in FaSSIF	MK571 10 μM in 4 % BSA/HBSS	AP → BL
3	FaSSIF	SK807 10 μM in 4 % BSA/HBSS	BL → AP
4	MK571 10 μM in FaSSIF	SK807 10 μM + MK571 10 μM in 4 % BSA/HBSS	BL → AP

alle Lösungen enthielten zusätzlich 0,5 % DMSO

Die Durchführung erfolgte analog wie unter 2.5.1 beschrieben. Die Inkubationen erfolgten im Schüttelwasserbad (37 °C, 67 rpm) für 30 min für die Vorinkubation bzw. 2 h für die Hauptinkubation. Proben aus dem basolateralen Kompartiment wurden, wie unter 2.8.2.1 beschrieben, aufbereitet. Eine Quantifizierung erfolgte mittels HPLC wie unter 2.3 beschrieben.

2.8.3 WST-1 Assay

Die Caco-2/TC7 Zellen wurden entsprechend 2.4.4 in einer klaren 96-Well-Platte für 8 Tage kultiviert.

Am Versuchstag wurden die Zellen dreimal mit 100 µL temperierter DPBS (37 °C) gespült. Anschließend wurden jeweils 100 µL der Versuchslösungen (Tabelle 2-12) aufgetragen und die Platte für 60 min im Schüttelwasserbad (37 °C, 67 rpm) inkubiert. Es wurden 10 µL WST-1 hinzugefügt und nochmals 60 min im CO₂-Inkubator (37 °C, 95 % rF, 5 % CO₂) inkubiert. Abschließend wurde die Absorption am Platerader (Varioskan) bei 440 nm (Formazan) und 600 nm gemessen. Die erhaltenen Werte wurden in Relation zur Referenz (= unbehandelte Zellen) gesetzt. Als Negativkontrolle diente 2 % (w/v) Triton X-100 in RO-H₂O.

Tabelle 2-12: Versuchslösungen für WST-1 Assay

Versuchslösung	Funktion
HBSS	mit WST-1: Referenz/Positivkontrolle ohne WST-1: Blank
FaSSIF	mit WST-1: Testlösung ohne WST-1: Blank
FaSSIF 1:2	Testlösung
FaSSIF 1:5	Testlösung
FaSSIF 1:10	Testlösung
SK807 10 µM in FaSSIF	Testlösung
FS089 10 µM in FaSSIF	Testlösung
FS100 10 µM in FaSSIF	Testlösung
2 % Triton X-100 in RO-H ₂ O	Negativkontrolle

alle Lösungen enthielten 0,5 % DMSO

2.9 Permeationsstudien mit p38 α -MAPK-Inhibitoren mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

Die Permeationsstudien wurden analog zu 2.5.1 durchgeführt. Als Lösung zum Spülen wurde entsprechend temperierte HBSS verwendet. Apikal befanden sich die Substanzen in FaSSIF, basolateral in 4 % (w/v) BSA in HBSS. Die Vorinkubationszeit betrug 30 min. Die Lösungen für die Vorinkubation wurden in HBSS hergestellt. Die Hauptinkubationszeit und die Temperaturen variierten. Bei Versuchen bei 4 °C wurde die Platte bei 4 °C und 250 rpm auf dem Bioshaker im Kühlschrank inkubiert. Eine Übersicht über die entsprechenden Versuchsbedingungen ist in Tabelle 2-13 zu finden. Proben aus dem basolateralen Kompartiment wurden entsprechend 2.8.2.1 aufbereitet. Für jeden Versuchsansatz wurde die intrazelluläre Menge (2.5.3) bestimmt.

Die Quantifizierung der Proben erfolgte mittels HPLC (2.3). Um eine Trennung zwischen FS089 bzw. FS100 und MK571 zu erhalten, wurde der Gradient 15 min statt 13 min gefahren. Diese Änderung hatte keinen Einfluss auf die Peakflächen.

Tabelle 2-13: Übersicht Permeationsstudien p38 α -MAPK-Inhibitoren mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

p38-Inh.	Konz. p38-Inh. [μ M]	Transp.-Inh.	Konz. Transp.-Inh. [μ M]	Richtung	T [$^{\circ}$ C]	t [min]
SK807	10	-**	-	AB, BA	37	120
		-	-	AB	37	60
		-	-	AB, BA	37	30
		-	-	AB, BA	4	120
		-	-	AB***	4	60
		-	-	AB***	4	30
		MK571**	10	AB, BA	37	120
		MK571	10	AB, BA	37	30
		MK571	10	AB, BA	4	120
		Ko143**	5	AB, BA	37	120
		Ko143	5	AB, BA	37	30
		Ko143	5	AB, BA	4	120
		Zosuquidar**	5	AB, BA	37	120
		Zosuquidar	5	AB, BA	37	30
		Zosuquidar	5	AB, BA	4	120
Cocktail**	*	AB, BA	37	120		
FS089	10	-	-	AB, BA	37	120
		MK571	10	AB, BA	37	120
		Ko143	5	AB, BA	37	120
		Zosuquidar	5	AB, BA	37	120
		Cocktail	*	AB, BA	37	120
FS100	10	-	-	AB, BA	37	120
		MK571	10	AB, BA	37	120
		Ko143	5	AB, BA	37	120
		Zosuquidar	5	AB, BA	37	120
		Cocktail	*	AB, BA	37	120

p38-Inh.: p38 α -MAPK-Inhibitor; Transp.-Inh.: Transporter-Inhibitor; T: Temperatur, bei der der Versuch durchgeführt wurde; t: Hauptinkubationszeit; AB: AP \rightarrow BL; BA: BL \rightarrow AP

* Cocktail Konz.: MK571 10 μ M, Ko143 5 μ M, Zosuquidar 5 μ M

** zusätzlich zur Bestimmung der intrazellulären Menge wurde in einem separaten Versuch ein Integritätstest mit Fluorescein-Natrium (2.5.2.2) durchgeführt

*** zusätzlich wurde ein Integritätstest mit Fluorescein-Natrium ohne vorherige Zugabe von SK807 durchgeführt

2.10 Fluoreszenz-Assays

Die Fluoreszenz-Assays für die Überprüfung der Beteiligung von BCRP, P-Gp und MRP2 an der Permeation der p38 α -MAPK-Inhibitoren basieren auf Arbeiten von Bauer et al. (2003), Förster et al. (2008) und Mahringer et al. (2009).

Es wurden 15 000 bzw. 35 000 Zellen/Well in einer schwarzen 96-Well-Platte mit klarem Boden ausgesät und 21 - 28 Tage bzw. 7 - 8 Tage kultiviert (siehe 2.4.4).

Die Zellen wurden dreimal mit auf 37 °C vortemperierter HBSS gespült. Anschließend wurden 100 μ L der Testlösungen mittels Eppendorf-Pipette aufgetragen und 15 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C und 67 spm vorinkubiert. Jeweils 100 μ L der Testlösungen mit dem entsprechenden Fluorophor wurden hinzu pipettiert. Das Fluorophor wurde somit 1:2 verdünnt. Es erfolgte eine Inkubation für eine entsprechende Zeit im Schüttelwasserbad unter den vorherigen Bedingungen. Abschließend wurde die Platte auf eiskalte Alublöcke gestellt und die Zellen dreimal mit kalter HBSS (4 °C) gewaschen. Für die Lyse der Zellen wurden 200 μ L 1 % (w/v) Triton X-100 in HBSS pro Well zugegeben und die Platte 30 min bei 700 rpm auf dem Bioshaker bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Fluoreszenz wurde bei entsprechender Anregungs- und Emissionswellenlänge am Platerreader (Varioskan) gemessen. Die Parameter können Tabelle 2-14 entnommen werden.

Tabelle 2-14: Parameter für die Fluoreszenz-Assays

Fluorophor	Konz. [μM]	Inkubationszeit [min]	Efflux-transporter	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]
Calcein AM	1; 0,25	30, 120, 240	P-Gp	485	520
CMFDA	1	90	MRP2	485	516
Mitoxantron	15	60	BCRP	614	689
Rhodamin	80; 10	120	P-Gp	485	528

2.11 Western Blot

Für den Western Blot wurden Zellen entsprechend 2.4 kultiviert. Die Durchführung erfolgte analog zu Förster et al. (2008) und Mahringer et al. (2009).

Für die Lyse wurde eine Tablette cOmpete Mini in 10 mL CelLytic MT gelöst. Der Zellmonolayer wurde zweimal mit DPBS (2 mL) gespült. Pro Well wurden 125 μ L des Lysepuffers verwendet. Die Platte wurde verschlossen und zunächst 15 min bei 700 rpm und anschließend 10 min bei 1 000 rpm bei Raumtemperatur auf dem Bioshaker geschüttelt. Das Lysat von jeweils 3 Wells wurde in zuvor autoklavierte Mikrozentrifugenröhrchen gesammelt und mit einer Pipettenspitze (2 - 200 μ L) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat bei 3 800 rpm (1 000xg) für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues zuvor autoklaviertes Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei 12 200 rpm (10 000xg) für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die Pellets in 150 μ L Lysepuffer resuspendiert.

Es wurden vom resuspendiertem Pellet und Überstand (jeweils Proben ohne DTT) der Proteingehalt mittels Pierce BCA Protein Assay bestimmt.

Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -28 °C eingefroren¹.

Für die SDS-PAGE wurden je Probe 18 μ g Protein mit Probenpuffer (1:2) und DTT 50 mM, falls in der Probe noch nicht enthalten, bei 95 °C und 1 400 rpm im Thermocycler für 10 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert und 15 μ g Protein auf das Gel aufgetragen. Das Sammelgel enthielt 4 % Acrylamid, das Trenngel 7,5 %.

Um die Proben zu sammeln, wurde für 30 min eine Spannung von 80 V angelegt, für die Trennung der Banden anschließend für ca. 1,5 h 150 V.

Anschließend erfolgte ein Wet-Blot auf eine PVDF-Membran bei 300 mA für 1,5 h.

Das Blocken erfolgte in TBST mit 1 % (w/v) BSA und 1 % (w/v) Milchpulver für 30 min. Danach wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen.

Die Membran wurde für die Detektion von P-Gp zwischen der 100 kDa und der 150 kDa Bande geschnitten, bei ca. 50 kDa für BCRP und der dritte Abschnitt wurde für die Detektion von β -Actin verwendet. Die Abschnitte wurden jeweils in ein 50 mL

¹ Die nachfolgenden Schritte wurden am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Heidelberg durchgeführt.

Falcon-Tube überführt und mit dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 2-15).

Tabelle 2-15: verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	RRID	Spezies	Verdünnung
P-Glycoprotein Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody	ab_2809567	Rabbit	1:500
Anti-BCRP/ABCG2 antibody	ab_207732	Rabbit	1:500
β-Actin Antikörper (C4)	ab_2714189	Mouse	1:50
Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	ab_2536099	Goat	1:10 000
Peroxidase-labeled Affinity Purified Antibody to Mouse IgG (H+L)	n.a.	Goat	1:10 000

Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal mit TBST gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2-15) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Membranen wurden erneut zweimal gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels ChemiDoc Imager nach Zugabe von Western Lightning.

Die Auswertung erfolgte mit Quantity One und ImageJ.

2.12 Anisotropie-Messung

Für die Bestimmung der Membranfluidität wurden Caco-2/TC7 Zellen in einer Zellkulturflasche (80 cm²) 5 Tage kultiviert und anschließend trypsinisiert (vgl. 2.4.4). Das Pellet wurde in 10 mL vortemperierter HBSS mittels Eppendorf-Pipette resuspendiert und erneut zentrifugiert (1 300 rpm, 5 min, 22 °C). Anschließend wurde das Pellet in vortemperierter HBSS resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

Pro Probenansatz betrug die Zellkonzentration 200 000 Zellen/mL. Zunächst wurden Cholesterol 20 µM, Cholesterol 50 µM bzw. Ethanol 0,1 % (v/v) zum entsprechenden Probenansatz gegeben. Cholesterol-Stammlösungen wurden zuvor in Ethanol hergestellt.

Alle Ansätze – auch Zellen ohne Zusatz – wurden 30 min auf dem Bioshaker bei 500 rpm und 37 °C geschüttelt. Zu den Zellen ohne bisherigen Zusatz wurden nun DMSO (0,5 % (v/v)), Polysorbat 80 (0,1 % (v/v)) bzw. die p38α-MAPK-Inhibitoren (10 µM) gegeben. Zu allen Ansätzen wurde DPH in einer finalen Konzentration von 1 µM gegeben und im Bioshaker für 1 h bei vorherigen Bedingungen im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden auf eine schwarze 96-Well-Platte (6 Wells pro Ansatz) übertragen und die Fluoreszenzpolarisation wurde am Tecan Platereader bei einer Anregung von 355 nm und einer Emission von 430 nm bestimmt. Die Anzahl der Flashes betrug 15, der Gain wurde als optimal eingestellt und die Z-Position aus einem Well, in dem sich die Kontrolle befand, bestimmt.

Die Anisotropie wurde nach Formel 2-5 berechnet.

$$r_s = \frac{(I_{parallel} - I_{parallel, Blank}) - G * (I_{perpendikular} - I_{perpendikular, Blank})}{(I_{parallel} - I_{parallel, Blank}) + 2 * G * (I_{perpendikular} - I_{perpendikular, Blank})}$$

r_s Anisotropie einer Probe

I_x gemessene Intensität in paralleler oder perpendikularer Anordnung des Polarisators

G Grating factor, Gerätespezifischer Korrekturfaktor für die selbstinduzierte Polarisation

Formel 2-5: Berechnung der Anisotropie

Für die Darstellung der Ergebnisse wurde die berechnete Anisotropie der Proben auf die Anisotropie in der Kontrolle (0,5 % DMSO) bezogen.

2.13 Albuminbindung

Die Überprüfung der Albuminbindung erfolgte mittels Gleichgewichtsdialyse.

2.13.1 Durchführung der Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyseeinheiten wurden vor der Benutzung mit Isopropanol 70 % (v/v) desinfiziert und trocken gelassen. Anschließend wurden sie verschlossen und 30 min im Schüttelwasserbad (67 rpm, 37 °C) vortemperiert. Der Dialyseschlauch wurde für 30 min in RO-H₂O befeuchtet, mit einer zuvor desinfizierten Schere auf eine Größe von ca. 3x3 cm geschnitten und anschließend so in der Gleichgewichtsdialyseeinheit platziert, dass der äußere Dichtungsring nicht berührt wurde. Der kleine Dichtungsring wurde aufgelegt und die Einheit verschlossen und befüllt. Die API-Lösungen in 4 % (w/v) BSA/HBSS und 0,5 % DMSO in HBSS wurden ebenfalls im Schüttelwasserbad (67 rpm, 37 °C) 30 min vortemperiert.

Für die Befüllung wurden 1,1 mL der entsprechenden Lösung mit einer 2 mL Spritze und einer Kanüle (21 G, 0,80x120 mm) aufgezogen und in eine Kammer gegeben. Die API-Lösung in BSA wurde auf die Seite gegeben, auf der die Lösung direkten Kontakt mit dem kleinen Dichtungsring hatte. Die HBSS wurde auf die entsprechend gegenüberliegende Seite gegeben. Die Öffnungen wurden mit Parafilm abgedeckt und die Einheit im Schüttelwasserbad (67 rpm, 37 °C) entsprechend inkubiert. Anschließend wurden die Proben vollständig in 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gezogen und aufgereinigt. Für Rhodamin erfolgte keine weitere Aufreinigung der Proben.

2.13.2 Aufreinigung Proben

Die Präzipitation von BSA erfolgte mittels Acetonitrils. Dazu wurden 200 µL der Proben in ein separates Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und 400 µL Acetonitril (-20 °C) hinzugefügt. Anschließend wurde die Suspension 10 s auf höchster Stufe gevortext und 20 min bei 13 400 rpm zentrifugiert.

Für Proben mit Lidocain, Procain oder Ibuprofen musste anschließend das Acetonitril wieder entfernt werden. 300 µL des zuvor erhaltenen Überstands wurden in ein 2 mL Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei geöffnetem Deckel über Nacht bei 1 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden zu den Lidocain und Ibuprofen Proben 100 µL einer 98,75 µM Coffein-Lösung in RO-H₂O und zu den Procain Proben 100 µL einer 50 µM Ibuprofen-Lösung in RO-H₂O gegeben und 30 min mit

geschlossenem Deckel bei 2 000 mot/min geschüttelt. Für die Blank Proben wurde analog verfahren, allerdings wurde 100 µL RO-H₂O verwendet.

Die Proben wurden in konische HPLC-Vials überführt und mittels HPLC entsprechend 2.13.3 quantifiziert.

Coffein und Ibuprofen dienten als interne Standards, um den Verdünnungsfaktor zu berechnen.

2.13.3 Quantifizierungsmethoden

2.13.3.1 HPLC-Methode Lidocain HBSS-Proben

Als stationäre Phase wurde eine EC 125/4 Nucleosil 100-5 C18 Säule mit einer EC 4/3 Universal RP Vorsäule verwendet. Es erfolgte eine isokratische Trennung. Als mobile Phase wurden Acetonitril mit 0,1 % TFA (A) und RO-H₂O mit 0,1 % TFA (B) verwendet. Die Fließmittelzusammensetzung von A:B betrug 19:81. Die Flussrate betrug 1 mL/min und die Ofentemperatur 25 °C. Die Detektion erfolgte bei 220 und 290 nm. Es wurden 20 µL injiziert. Die Injektionsnadel wurde vor und nach der Injektion mit 500 µL Autosampler-Spüllösung (MeOH:RO-H₂O, 50:50) gespült.

2.13.3.2 HPLC-Methode Lidocain, Ibuprofen, Procain

Als stationäre Phase wurde eine EC 125/4 Nucleosil 100-5 C18 Säule mit einer EC 4/3 Universal RP Vorsäule verwendet. Für die Trennung wurde ein Gradient entsprechend Tabelle 2-16 gefahren.

Die Flussrate betrug 1 mL/min und die Ofentemperatur 25 °C. Die Detektion erfolgte bei 220 und 290 nm. Es wurden 20 µL injiziert. Die Injektionsnadel wurde vor und nach der Injektion mit 500 µL Autosampler-Spüllösung (MeOH:RO-H₂O, 50:50) gespült.

Tabelle 2-16: HPLC-Gradient für die Quantifizierung der p38α-MAPK-Inhibitoren

Zeitpunkt [min]	Konz. A [%]	Konz. B [%]
0	100	0
8	75	25
13	40	60
14	40	60
16	100	0
20	100	0

Fließmittel A: RO-H₂O, 10 % Acetonitril, 0,1 % TFA, B: Acetonitril, 0,1 % TFA

2.13.3.3 *p38 α -MAPK-Inhibitoren*

Die Quantifizierung der p38 α -MAPK-Inhibitoren erfolgte analog zu 2.3.

2.13.3.4 *Rhodamin*

Für Rhodamin erfolgte eine Quantifizierung mittels Platerader (Varioskan). Eine 6-Punkt-Kalibrierung im Bereich 10,15 - 1 015 ng/mL für die Puffer- und BSA-Proben wurde in dreifacher Bestimmung bei jeder Messung mitgeführt. Die Proben befanden sich in einer schwarzen 96-Well-Platte. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm mit einer Bandbreite von 12 nm, die Emissionswellenlänge 528 nm.

3. Ergebnisse

3.1 P-Gp-Inhibierungsassay zur Bestimmung der geeigneten Konzentration von Zosuquidar für die P-Gp-Inhibierung

Zosuquidar gilt als spezifischer P-Gp-Inhibitor (Dantzig et al. 1996; Dantzig et al. 1999; Mease et al. 2012; Shepard et al. 2003) und zählt zur 3. Generation der P-Gp-Inhibitoren wie Tariquidar oder Elacridar (Ecker und Chiba 2009). Da zunächst ein alternativer P-Gp-Inhibitor für Verapamil gefunden werden sollte, wurde anhand der Sekretion von Rhodamin, einem P-Gp-Substrat (Shapiro und Ling 1997; Shapiro et al. 1999), untersucht, in welcher Konzentration Zosuquidar für eine Inhibition von P-Gp bei Caco-2/TC7 Zellen eingesetzt werden muss. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.6 beschrieben.

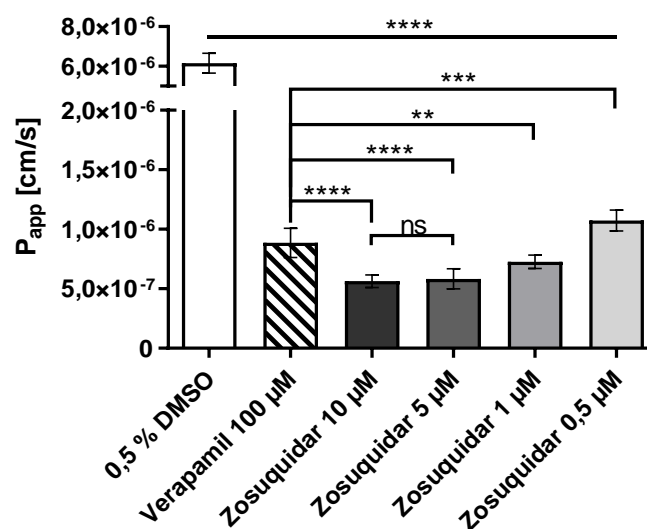


Abbildung 3-1: Ergebnis P-Gp-Inhibierungsassay mit Rhodamin
 Alle Proben enthielten eine Endkonzentration von 0,5 % DMSO.
 n=3 Passagen, MW \pm SD, ANOVA mit Dunnett's Test
 ns: $p > 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$

Für die Sekretion von Rhodamin wurde mit $6,16 \times 10^{-6}$ cm/s ein vergleichbarer apparter Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) wie von Klameth (2016) ermittelt.

Ab einer Zosuquidar Konzentration von 5 μ M wurde keine weitere signifikante Absenkung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten von Rhodamin mehr erreicht, weshalb diese Konzentration als für die P-Gp-Inhibierung ausreichend angesehen wurde.

Verglichen mit dem Effekt von 100 μM Verapamil führte Zosuquidar ab einer Konzentration von 5 μM zu einer um den Faktor 1,06 stärkeren Reduzierung des P_{app} von Rhodamin.

3.2 Adsorptionsstudien p38 α -MAPK-Inhibitoren

Da die Wiederfindungen bei den Permeationsstudien von Klameth (2016) unter 50 % lagen, sollte zunächst überprüft werden, ob die untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren zu unspezifischer Adsorption neigen und darauf aufbauend eine Strategie entwickelt werden, um eine Wiederfindung über 80 % zu erzielen. Diese Arbeiten wurden durchgeführt, bevor entschieden wurde Zosuquidar als P-Gp-Inhibitor zu verwenden, weshalb in diesem Abschnitt noch Tariquidar als P-Gp-Inhibitor eingesetzt wurde.

3.2.1 Wiederfindung von FS100 nach Lagerung in Glas- oder Plastikgefäßen bei unterschiedlichen Temperaturen

Um einen ersten Hinweis auf unspezifische Adsorption der p38 α -MAPK-Inhibitoren zu erhalten, wurde FS100 in Plastik- und Glasgefäßen bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert.

FS100 wurde stellvertretend für die p38 α -MAPK-Inhibitoren verwendet. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

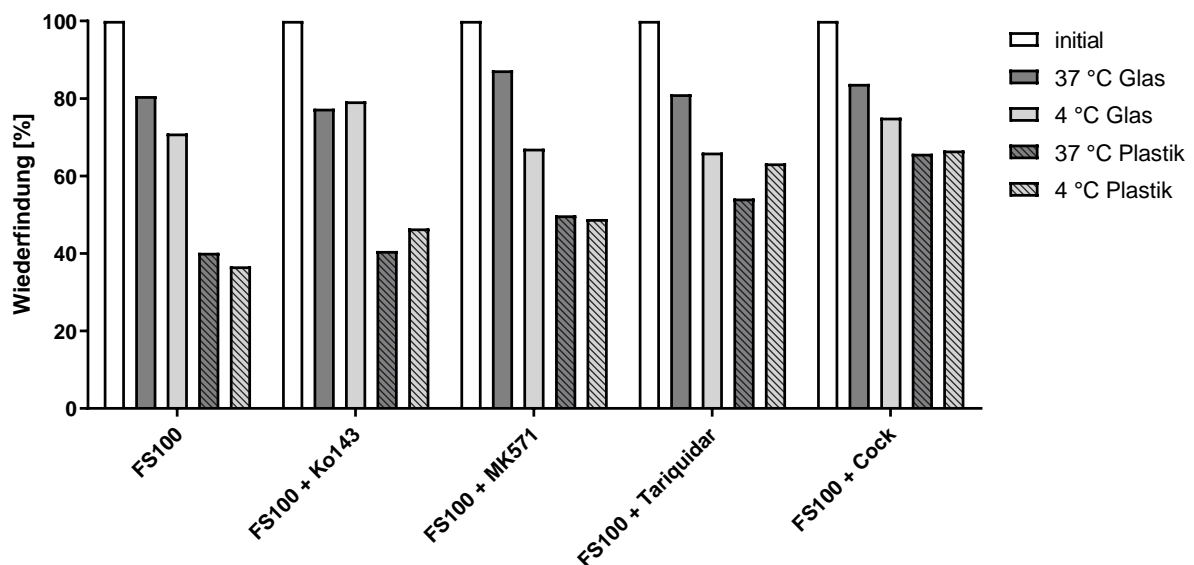


Abbildung 3-2: Wiederfindung von FS100 10 μ M gelöst in HBSS in Plastik- oder Glasgefäßen nach Lagerung bei 4 °C oder 37 °C
Ko143 5 μ M, MK571 10 μ M, Tariquidar 5 μ M, Cocktail: Ko143 5 μ M + MK571 10 μ M + Tariquidar 5 μ M
n=1

Im Vergleich zwischen Glas (HPLC-Vial) und Plastik (Mikrozentrifugenröhrchen) (Abbildung 3-2) war die Wiederfindung für Glas höher als für Plastik. Allerdings neigt FS100 anscheinend auch zu unspezifischer Adsorption an Glas, da nicht 100 % wiedergefunden werden konnte. Für die Proben, die in Plastik gelagert wurden, fällt auf, dass bei der Zugabe von Transporter-Inhibitoren ein höherer Anteil

wiedergefunden werden konnte. Eine Überlagerung des FS100 Peaks und der Peaks für die Transporter-Inhibitoren im HPLC-Chromatogramm war nicht zu erkennen, weshalb der Anstieg nicht darauf zurückzuführen ist. Die Transporter-Inhibitoren selbst wurden nur qualitativ mittels HPLC bestimmt. Ein Temperatureinfluss war für die Lagerung in Plastikgefäßen nicht erkennbar. Bei den HPLC-Vials hingegen wurde bei Lagerung bei 37 °C mehr FS100 wiedergefunden als bei 4 °C. Da die Löslichkeit auch temperaturabhängig ist, kann bei niedrigerer Temperatur FS100 ausgefallen sein, sofern die Sättigungslöslichkeit erreicht wurde. Allerdings hätte dies auch in den Plastikgefäßen auftreten müssen. Es konnten nicht alle Proben gleichzeitig analysiert werden, weshalb manche Proben in den HPLC-Vials länger gelagert wurden und somit zusätzlich an die Oberflächen adsorbieren konnten.

Da die Wiederfindung für FS100 nicht 100 % betrug, wird eine Lagerung der in HBSS gelösten p38 α -MAPK-Inhibitoren in Plastik- oder Glasgefäßen nicht empfohlen.

3.2.2 Probenaufbereitung im HPLC-Vial

Da eine 100 %-ige Wiederfindung der p38 α -MAPK-Inhibitoren bereits im HPLC-Vial nicht gewährleistet werden konnte (vgl. 3.2.1), wurde eine Möglichkeit gesucht die Wiederfindung zu erhöhen.

Der Morpholinoethoxy-Substituent der Dibenzosuberonderivate liegt bei unterschiedlichen pH-Werten unterschiedlich geladen vor. Der pK_s-Wert des Stickstoffs im Morpholin-Ring beträgt 5,76 (Klameth 2016). Bei pH-Werten kleiner dem pK_s-Wert liegen die p38 α -MAPK-Inhibitoren hauptsächlich ionisiert, bei pH-Werten größer dem pK_s-Wert liegen sie hauptsächlich ungeladen vor (vgl. Abbildung 3-3).

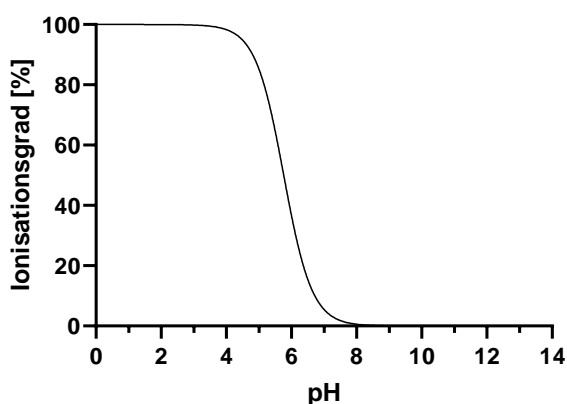


Abbildung 3-3: Ionisationsgrad des Morpholinoethoxy-Substituenten (pK_s=5,76)

Um eine unspezifische Adsorption zu reduzieren, wurden unterschiedliche Konzentrationen an Phosphorsäure und Acetonitril zu den HPLC-Proben gegeben. Eine alleinige Zugabe von Phosphorsäure führte nicht zum gewünschten Ergebnis (7.1). Als Vertreter für die p38 α -MAPK-Inhibitoren wurde FS100 in einer Anfangskonzentration von 10 μ M in HBSS eingesetzt.

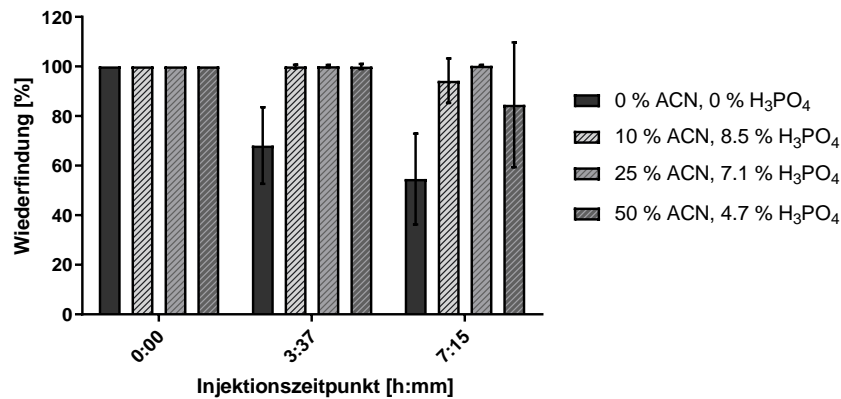


Abbildung 3-4: Wiederfindung FS100 in HBSS mit Acetonitril und Phosphorsäure in unterschiedlichen Konzentrationen in HPLC-Vials über die Zeit
Konzentration ACN, Phosphorsäure: (v/v); n=3, MW \pm SD

Die Peakfläche der jeweils ersten Injektion wurde als 100 % festgelegt. Bereits nach 3,5 h (vgl. Abbildung 3-4) betrug die Wiederfindung von FS100 in HBSS ohne Acetonitril (ACN) und H₃PO₄ im Mittel nur noch etwa 70 %.

Beliefen sich die Konzentrationen an ACN und H₃PO₄ auf 10 % (v/v) bzw. 8,5 % (v/v) oder auf 50 % (v/v) bzw. 4,7 % (v/v) konnten nach 3,5 h noch 100 % der anfänglichen Konzentration an FS100 im HPLC-Vial wiedergefunden werden, allerdings nahm die Konzentration nach 7,25 h ab. Nur bei einer Konzentration von 25 % (v/v) ACN und 7,1 % (v/v) H₃PO₄ lag die Wiederfindung auch nach 7,25 h noch bei 100 %. Deshalb wurden die p38 α -MAPK-Inhibitoren-Lösungen in HBSS vor der Quantifizierung mittels HPLC mit ACN und H₃PO₄ versetzt, sodass die Endkonzentrationen 25 % (v/v) bzw. 7,1 % (v/v) betragen.

Zusätzlich wurde noch ein Einfluss der Transporter-Inhibitoren (Cocktail) überprüft. Das Vorgehen erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben.

Die Zugabe der Transporter-Inhibitoren hatte keinen Einfluss auf die Wiederfindung (Tabelle 3-1). Auch nach 10 h betrug die Peakflächen der p38 α -MAPK-Inhibitoren 100 % der anfänglichen Flächen. Somit konnte durch Zugabe von Phosphorsäure und Acetonitril eine unspezifische Adsorption der p38 α -MAPK-Inhibitoren an die HPLC-Vials unterbunden werden.

Tabelle 3-1: Stabilität Cocktails mit p38 α -MAPK-Inhibitoren im HPLC-Vial bei Zusatz von 25 % (v/v) ACN und 7,1 % (v/v) H₃PO₄

Cocktail	relative SD [%]
FS089	0,43
FS100	0,27
SK807	0,11

viermalige Injektion, ein Vial pro Cocktail
 Cocktail: p38-Inhibitor 10 μ M + Ko143 5 μ M + MK571
 10 μ M + Tariquidar 5 μ M

3.2.3 Probenvorbereitung in Plastikgefäßen

Für die Zellversuche erfolgte die Probenvorbereitung in Plastikgefäßen. In diesen wurden die Lösungen bei 37 °C vortemperierte, bevor sie in das entsprechende Kompartiment im Zellversuch pipettiert wurden. Da für die Permeationsstudien eine bestimmte Konzentration der p38 α -MAPK-Inhibitoren vorausgesetzt wurde, musste auch bei der Herstellung der API-Lösung eine Wiederfindung von 100 % sichergestellt werden.

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben.

Für die Permeationsstudien sollten, wie bei Klameth (2016) beschrieben, die p38 α -MAPK-Inhibitoren in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt werden.

Für pH 4,1 wurde eine zehnfach höhere Konzentration gewählt, da die Permeationsstudien bei pH 7,4 in HBSS durchgeführt wurden und durch eine 1:10 Verdünnung die entsprechende Konzentration erreicht werden konnte, ohne durch Zugabe einer Lösung mit pH 4,1 den pH-Wert zu beeinflussen (Löw 2017).

In 0,9 %-iger NaCl-Lösung pH 4,1 lag die Wiederfindung nach 1 h Temperierung bei ca. 100 % (vgl. Abbildung 3-5). Im Vergleich dazu lagen die Wiederfindungen in HBSS pH 7,4 im Mittel zwischen 35 % (FS089) und 52 % (SK807). Die Standardabweichungen waren auch größer als für Lösungen bei pH 4,1.

Die Ergebnisse können unterschiedliche Ursachen haben. Wie in Abbildung 3-3 gezeigt, liegen die p38 α -MAPK-Inhibitoren bei einem pH-Wert von 4,1 hauptsächlich ionisiert vor. Dadurch sind sie hydrophiler, weshalb eine höhere Konzentration erzielt werden kann, in diesem Fall die 10-fache Konzentration im Vergleich zu pH 7,4. Aufgrund der höheren Konzentration in den Lösungen bei pH 4,1 wird vermutet, dass eine unspezifische Adsorption weniger ins Gewicht fällt als bei der niedrigeren Konzentration in den Lösungen bei pH 7,4.

In diesem Versuch war außerdem die Fläche, an die die p38 α -MAPK-Inhibitoren adsorbieren konnten, unterschiedlich groß. Für pH 7,4 wurden 5 mL Lösung in 15 mL Tubes gelagert, wohingegen für pH 4,1 500 μ L Lösung in 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gelagert wurden. Dadurch stand – im Falle der pH 7,4-Proben – für eine geringere Menge Substanz eine größere Oberfläche zur Verfügung.

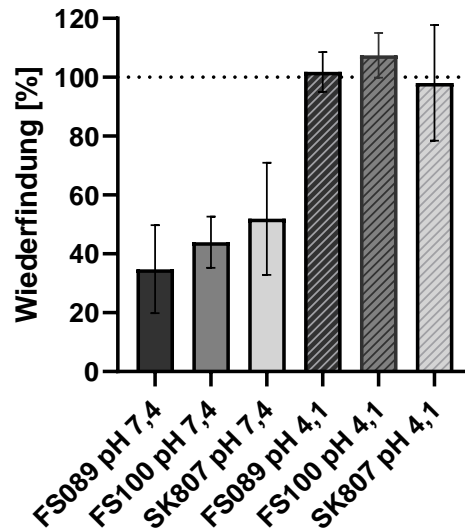


Abbildung 3-5: Wiederfindung p38-MAPK-Inhibitoren in Plastikgefäßen bei unterschiedlichen pH-Werten
pH 7,4: 10 μ M in HBSS; pH 4,1: 100 μ M in 0,9 % NaCl
n=3, MW \pm SD

Die unterschiedlichen Volumina lassen sich dadurch erklären, dass für Permeationsstudien 0,5 mL apikal (AP) und 1,5 mL basolateral (BL) für je drei Wells verwendet wurden, d.h. für jeden Versuchsansatz wurden mind. 1,5 mL (AP \rightarrow BL) bzw. 4,5 mL (BL \rightarrow AP) der Vorverdünnung pH 7,4 benötigt. Daher mussten 5 mL der Vorverdünnung in HBSS pH 7,4 hergestellt werden. Für pH 4,1 wurden 500 μ L benötigt, da aufgrund der 1:10 Verdünnung für Versuche in absorptiver Richtung 150 μ L und für Versuche in sekretorischer Richtung 450 μ L für insgesamt drei Wells verwendet wurden. Der initiale Probenzug aus dem Donorkompartiment wurde bei der Volumenberechnung nicht berücksichtigt.

Wie allerdings in den Ergebnissen zu sehen ist, ist eine Vorverdünnung in HBSS pH 7,4 nicht geeignet.

3.2.4 Adsorption an Zellkulturplatten

Da die Permeationsstudien im Transwell durchgeführt wurden, musste auch hier die Wiederfindung gewährleistet werden. Die Zellen wuchsen im apikalen Kompartiment

des Transwell-Systems auf einer Polyester- (PE-) Membran. Während der Kultivierung schieden die Zellen Stoffwechselprodukte aus. Zusätzlich war fötales Rinderserum (FBS) im Medium enthalten (vgl. 2.4.1.1), wodurch die lipophilen Oberflächen im Insert möglicherweise bereits vorgesättigt wurden. Zu Beginn des Zellversuchs wurden die Inserts in eine neue Zellkulturplatte überführt, da während der Wachstumsperiode Zellen in das basolaterale Kompartiment migrieren konnten. In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob eine unspezifische Adsorption im basolateralen Kompartiment, speziell in der Zellkulturplatte, durch eine Vorsättigung der Oberflächen mit Rinderserumalbumin (BSA) verhindert werden kann. BSA verringert die unspezifische Adsorption. Diese Methode wird auch bei ELISAs verwendet (Löw 2017). Stellvertretend für die p38 α -MAPK-Inhibitoren wurde SK807 verwendet. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben.

Tabelle 3-2: Wiederfindung SK807 10 μ M in Zellkulturplatten, vorbehandelt oder unbehandelt

	0 % BSA	1 % BSA	2 % BSA	4 % BSA
MW [%]	53,7	81,3	82,1	81,4
SD [%]	3,5	2,9	3,3	3,2
rel. SD [%]	6,5	3,6	4,1	4,0

n=9

Eine Vorbehandlung der Zellkulturplatten mit BSA führte zu einer höheren Wiederfindung (vgl. Tabelle 3-2). Höhere Konzentrationen an BSA führten allerdings nicht zu einer weiteren Zunahme der Wiederfindung und es konnten nicht 100 % erreicht werden. Da aber durch die Vorbehandlung der Zellkulturplatten höhere Wiederfindungen erzielt werden konnten, wurden für die nachfolgenden Versuche Zellkulturplatten eingesetzt, die mit 2 % BSA vorbehandelt wurden.

In einem weiteren Versuch wurde verglichen, ob Medium den gleichen Effekt hat, wie BSA, und wie viel der eingesetzten Menge an SK807 an die Zellkulturplatten adsorbiert.

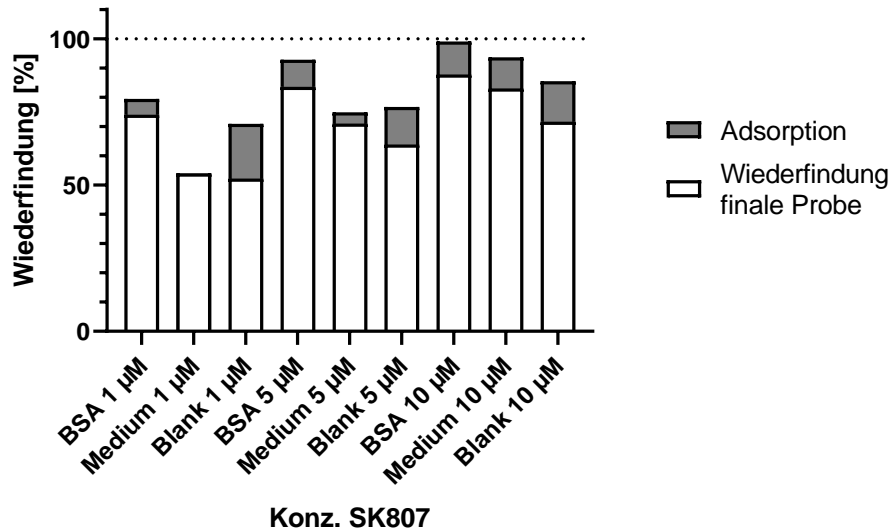


Abbildung 3-6: Wiederfindung SK807 Zellkulturplatte, vorbehandelt (BSA, Medium) bzw. unbehandelt (Blank)
n=2

Wie in Abbildung 3-6 zu sehen, war die Wiederfindung in den Proben aus den BSA vorbehandelten Wells am höchsten. Für SK807 10 µM im BSA vorbehandelten Well wurden vergleichbare Ergebnisse wie in Tabelle 3-2 erhalten. Des Weiteren war bei höheren SK807 Konzentrationen ebenfalls die Wiederfindung höher. Trotz Nachspülen mit 70 % (v/v) ACN konnte nicht die gesamte Menge an eingesetztem SK807 wiedergefunden werden.

Wurde die Zellkulturplatte mit BSA vorbehandelt, wurden somit höhere Wiederfindungen im Vergleich zu einer unbehandelten oder mit Medium vorbehandelten Platte erzielt, weshalb in den weiteren Versuchen, mit HBSS in beiden Kompartimenten, nur mit BSA vorbehandelte Zellkulturplatten verwendet wurden.

3.2.5 Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte

Die positiven Erkenntnisse der vorangegangenen Ergebnisse wurden zusammengeführt und die daraus resultierende optimierte Methode auf Linearität hin überprüft. Gleichzeitig sollte damit eine Kalibrierung stattfinden. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.2.5 beschrieben.

Tabelle 3-3: Ergebnisse Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte am Beispiel SK807

Probe	Bereich [μM]	R^2	LOD [μM]	LOQ [μM]
Vorverdünnung	5,0 - 100	0,9617	16,8	50,9
Vorverdünnung	5,0 - 83	0,9986	9,02	27,3
initial	0,50 - 10	0,9780	1,43	4,33
initial	0,50 - 8,3	0,9939	0,90	2,72
final	0,50 - 10	0,9813	1,77	5,38
final	0,50 - 8,3	0,9954	0,86	2,59

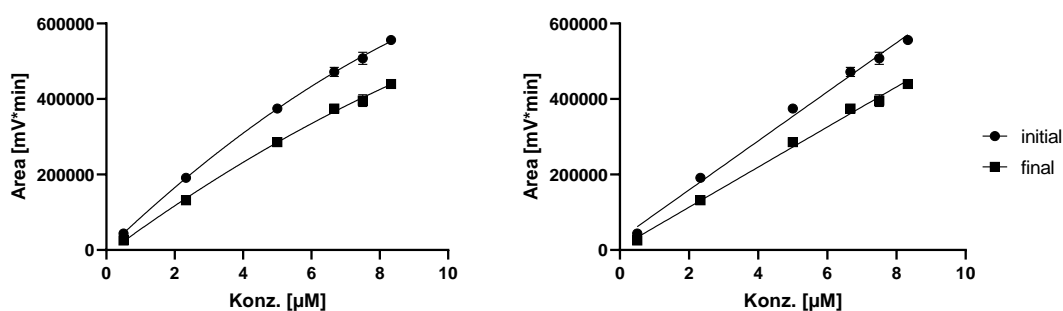
Vorverdünnung: 10-fache Konzentration in 0,9 % NaCl, pH 4,1

initial: Probe nach Zugabe der Vorverdünnung

final: Probe nach 2 h Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad (67 spm)

Wie aus Tabelle 3-3 ersichtlich, war eine Linearität im Bereich von 0,50 - 10 μM nicht gegeben. Gleiches wurde auch für FS089 und FS100 bestimmt (Tabelle 7-1, Tabelle 7-2). In einem eingeschränkten Bereich von 0,50 - 8,3 μM dagegen wurde ein akzeptabler Korrelationskoeffizient erreicht, weshalb für die späteren Permeationsexperimente in HBSS nur Konzentrationen bis max. 8 μM eingesetzt wurden. Wird nur der Bereich von 0,50 - 8,3 μM betrachtet, so blieben die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) zwischen den verschiedenen Proben (Vorverdünnung, initial, final) auch vergleichbar.

Mittels F-Test (GraphPad Prism) wurde überprüft, ob eine lineare Regression die Daten besser beschreibt als ein quadratisches Polynom auf Basis einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Die Nullhypothese, dass eine lineare Regression die Werte besser beschreibt, musste verworfen werden. Da eine Linearität im erforderlichen Bereich nicht gegeben war, können die Ergebnisse nicht als Kalibrierung verwendet werden. Dennoch wurde mit der linearen Regression ein akzeptabler Korrelationskoeffizient erreicht, weshalb die optimierte Methode als geeignet angesehen wird.


Abbildung 3-7: Kalibrierkurven SK807 0,5-8,3 μM initial und final
rechts: quadratisches Polynom, links: Gerade

Wie in Abbildung 3-7 zu sehen, unterschieden sich die Kurven für die initialen und finalen Proben. Grund für die Abnahme zwischen den initialen und finalen Proben könnte eine Adsorption an die Zellkulturplatte sein (vgl. 3.2.4).

Es wurde zusätzlich die Wiederfindung zwischen der initialen und finalen Probe berechnet, indem die Konzentrationen anhand der initialen Geraden für die finalen Proben berechnet wurden.

Tabelle 3-4: Wiederfindung Proben final berechnet anhand der Kalibrierung der initialen Proben

Konz. [μM]	0,50	2,3	5,0	6,7	7,5	8,3
WF [%]	-12	68	79	80	75	76

Ab einer Konzentration von 5 μM war die Wiederfindung vergleichbar mit den Wiederfindungen die in 3.2.4 (Tabelle 3-2) erhalten wurden. Für niedrigere Konzentrationen lag die Wiederfindung jedoch weit unter 80 %. Zu erwarten war zudem, dass die Wiederfindung für die finale Probe mit 0,50 μM im negativen Bereich liegt, da die Nachweisgrenze 0,90 μM betrug. Die Interpretation der Daten aus den Permeationsstudien wäre mit diesen Kalibrierungen nicht möglich gewesen, da im Akzeptorkompartiment Konzentrationen kleiner 5 μM erwartet wurden.

Aus diesem Grund und da keine Linearität gegeben war, wurde eine Kalibrierung im Bereich 0,25 - 8 μM in ACN/ H_3PO_4 /HBSS (25 % (v/v), 7,1 % (v/v), 67,9 % (v/v)) erstellt (Tabelle 3-5), die für die Auswertung der Permeationsstudien in HBSS verwendet wurde.

Tabelle 3-5: Kalibrierung SK807 in ACN/ H_3PO_4 /HBSS (25 % (v/v), 7,1 % (v/v), 67,9 % (v/v)) nach EMA (1995)

Probe	Bereich [μM]	R ²	LOD [μM]	LOQ [μM]
SK807	0,25 - 8,0	0,9980	0,33	1,0

3.3 Permeationsstudien mit SK807 in HBSS

Klameth (2016) fand in ihrer Arbeit heraus, dass SK807 eine Präferenz für MRP2 aufwies. Stellvertretend für die p38 α -MAPK-Inhibitoren wurden deshalb zunächst Permeationsstudien mit SK807 mit oder ohne Inhibierung von MRP2 durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.7 beschrieben.

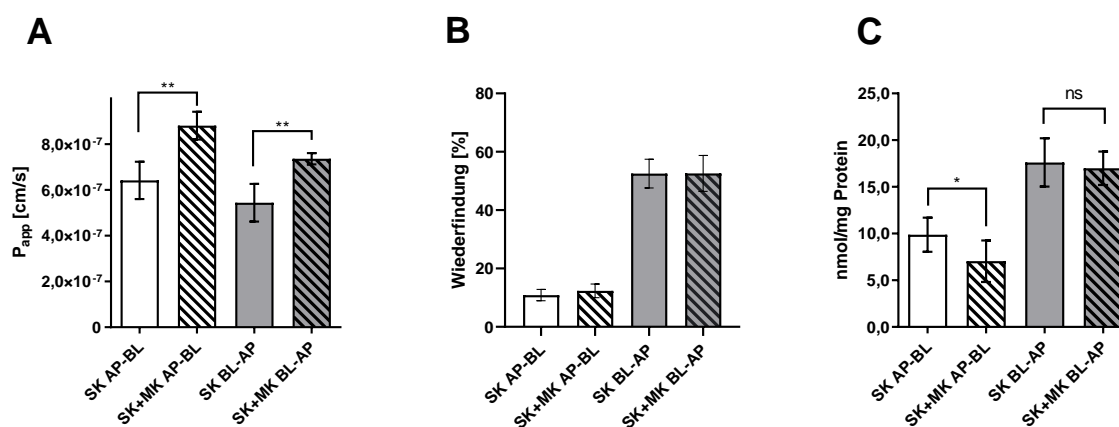


Abbildung 3-8: SK807 Inhibitionsstudien in HBSS

A: Permeation, B: Wiederfindung (Summe aus final AP und final BL), C: intrazelluläre Anreicherung

SK: SK807 8 μ M; MK: MK571 10 μ M

n=3-4 Passagen, MW \pm SD, ungepaarter t-Test, ns: $p > 0,05$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$

In absorptiver Richtung nahm der apparente Permeabilitätskoeffizient von SK807 unter Inhibierung von MRP2 signifikant zu (Abbildung 3-8 A). Auch in sekretorischer Richtung nahm er signifikant zu. Sollte MRP2 an der Permeation von SK807 beteiligt sein, müsste der P_{app} in sekretorischer Richtung gleichbleiben oder abnehmen. Dies traf hier allerdings nicht zu, weshalb nicht von einer Beteiligung von MRP2 an der Permeation von SK807 auszugehen ist.

Die Effluxrate für SK807 ohne MK571 betrug 0,85, die Effluxrate für SK807 mit MK571 betrug 0,84. Auch hier war eine Beteiligung von MRP2 nicht ersichtlich.

Auffällig war jedoch, dass die Wiederfindung in absorptiver Richtung im Vergleich zur sekretorischen Richtung stark verringert war (Abbildung 3-8 B). In diesem Versuch wurde das basolaterale Kompartiment, im speziellen das Well, mit BSA vorinkubiert, um lipophile Oberflächen zuvor abzusättigen und eine unspezifische Adsorption durch SK807 zu verringern. Der P_{app} war sehr niedrig, weshalb nur eine geringe Menge in das Akzeptorkompartiment permeierte. Den Hauptanteil der Wiederfindung machte somit die Menge im Donorkompartiment aus, was nochmals deutlicher in Abbildung 3-9 zu sehen ist. Scheinbar adsorbierte in absorptiver Richtung im apikalen

Kompartiment somit prozentual mehr als im basolateralen Kompartiment. Im apikalen Kompartiment stand damit eine geringere Menge als erwartet für die Permeation zur Verfügung und der berechnete P_{app} fiel niedriger aus, als er tatsächlich wäre. Bei der Sekretion könnte zusätzlich ein größerer Anteil an SK807 im apikalen Kompartiment an die Oberflächen adsorbiert sein, weshalb hier der berechnete P_{app} geringer ausfiel als er tatsächlich wäre und somit die Ergebnisse zur Inhibierung von MRP2 falsch interpretiert wurden.

Für eine weitergehende Interpretation der Ergebnisse ist es sinnvoll auch die intrazellulär vorhandene Menge an Arzneistoff zu berücksichtigen. Abbildung 3-8 C gibt die intrazellulär angereicherte Menge an SK807 bezogen auf die Proteinmenge der lysierten Zellen wieder. Die intrazelluläre Menge beinhaltet damit auch die Menge, die an die Zelloberfläche bindet oder sich in die Zellmembran einlagert. Dabei zeigt sich, dass in sekretorischer Richtung um den Faktor 1,8 mehr SK807 angereichert wurde als in absorptiver Richtung. Im basolateralen Kompartiment wurden 1,5 mL und im apikalen Kompartiment 0,5 mL der gleichen Konzentration an SK807 eingesetzt. Daraus ergibt sich entsprechend eine größere absolute Menge an SK807 im basolateralen Kompartiment im Vergleich zum apikalen Kompartiment, weshalb sich intrazellulär in sekretorischer Richtung mehr anreichern konnte. Zudem wurde in sekretorischer Richtung durch die Vorbehandlung des Wells mit BSA eine unspezifische Adsorption im Donorkompartiment verhindert, weshalb auch mehr SK807 für die Permeation und die intrazelluläre Anreicherung zur Verfügung stand. Unter Inhibierung von MRP2 sank die Aufnahme an SK807 in absorptiver Richtung signifikant (Abbildung 3-8 C, SK+MK AP-BL). In sekretorischer Richtung hingegen war kein Unterschied in der intrazellulären Aufnahme unter MRP2-Inhibierung zu sehen (Abbildung 3-8 C, BL-AP). Wäre MRP2 an der Permeation von SK807 beteiligt, müsste die intrazelluläre Aufnahme sowohl in absorptiver als auch in sekretorischer Richtung zunehmen. Dies war hier nicht der Fall, weshalb nicht von einer Beteiligung von MRP2 an der Permeation von SK807 auszugehen ist.

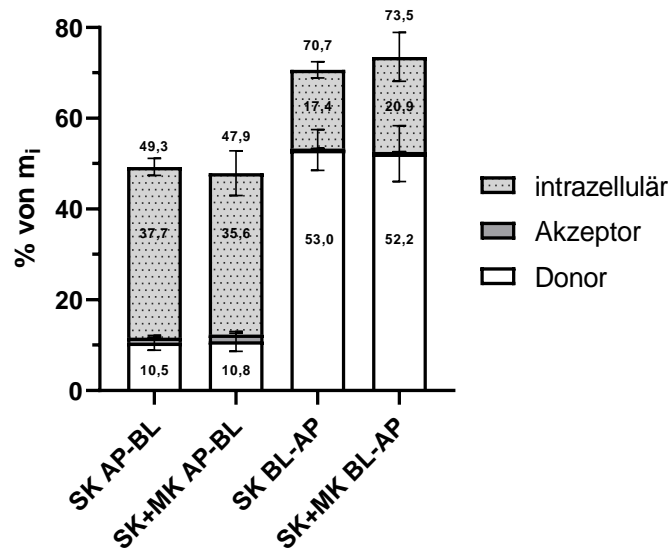


Abbildung 3-9: Massenbilanz Inhibitionsstudien SK807 in HBSS
 mi: eingesetzt Menge API, SK: SK807 8 μ M, MK: MK571 10 μ M
 n=3-4 Passagen, MW \pm SD

In Abbildung 3-9 ist die Massenbilanz für SK807 zu sehen. Im Vergleich zu Abbildung 3-8 B wurde hier zusätzlich der intrazelluläre Anteil mit aufgetragen, um die Gesamtwiederfindung (Summe der Anteile in Donor, Akzeptor und intrazellulär) im System betrachten zu können. Die Gesamtwiederfindung lag unter 80 % und wies, wie auch die jeweiligen Anteile, eine Asymmetrie auf. Der Anteil im Donor in absorptiver Richtung war ca. um den Faktor 5 geringer als in sekretorischer Richtung. Da das basolaterale Kompartiment mit BSA vorbehandelt wurde, wurde in diesem Kompartiment eine unspezifische Adsorption verringert. Dafür war der Anteil im Akzeptor in absorptiver Richtung um den Faktor 3,6 (SK) bzw. 1,5 (SK+MK) höher als in sekretorischer Richtung. Auch diese Asymmetrie kann möglicherweise auf die Vorbehandlung des basolateralen Kompartiments mit BSA zurückgeführt werden. Zudem reicherte sich um den Faktor 2,2 (SK) bzw. 1,7 (SK+MK) mehr in absorptiver Richtung intrazellulär an als in sekretorischer Richtung. Da sich in dieser Abbildung auf die Anfangskonzentration an SK807 bezogen wird, ist dies nicht mit Abbildung 3-8 C zu vergleichen. Die Caco-2/TC7 Zellen bilden apikal Mikrovilli aus, weshalb hier auch eine größere Oberfläche für die Aufnahme zur Verfügung stand. Somit wurde prozentual, bezogen auf die anfangs eingesetzte Menge im Donor (hier das apikale Kompartiment), mehr aufgenommen bzw. konnte mehr an die Zellen adsorbieren. Die absolute Menge war jedoch, wie zuvor ausgeführt, in sekretorischer Richtung höher als in absorptiver Richtung (Abbildung 3-8 C).

Da die Gesamtwiederfindung nicht 100 % betrug und eine Asymmetrie aufwies, wurde in einem Versuch zusätzlich durch Nachspülen mit ACN/H₃PO₄ (3+1) untersucht, wo im Transwell SK807 adsorbierte.

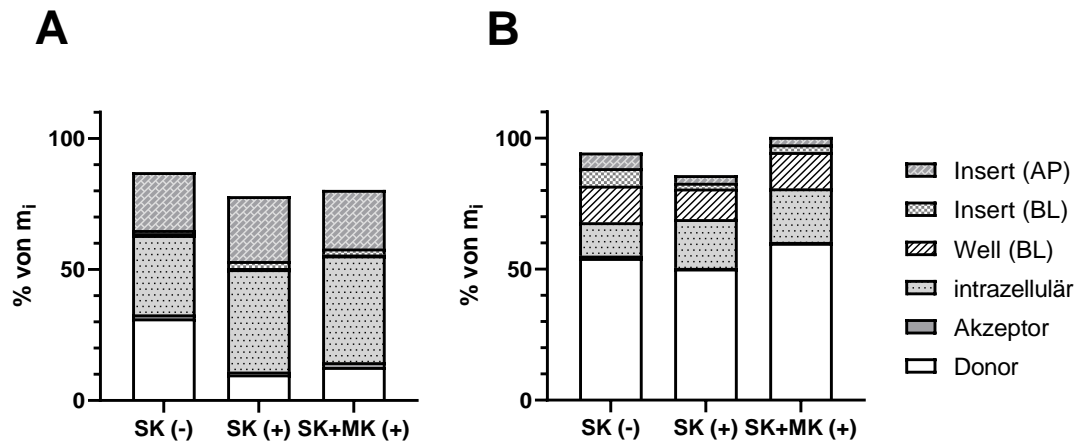


Abbildung 3-10: Massenbilanz Inhibitionsstudien SK807 in HBSS inkl. adsorbierte Mengen

A: AP-BL, B: BL-AP

Insert und Well wurden mit ACN/H₃PO₄ (3+1) nachgespült.

(-): System ohne Zellen, intrazellulär entspricht der adsorbierten Menge an der PE-Membran

(+): System mit Zellen, intrazellulär entspricht intrazellulär angereicherter Menge inkl. adsorbierter Menge an PE-Membran

SK: SK807 8 μ M, MK: MK571 10 μ M

n=1-2

In sekretorischer Richtung (Abbildung 3-10 B) konnte durch hinzurechnen der mit Lösungsmittel desorbierten Menge die Wiederfindung auf 80 % (SK (+)) bzw. 95 % (SK+MK (+)) gesteigert werden. In absorptiver Richtung (Abbildung 3-10 A) dagegen wurden trotzdem nur Werte zwischen 78 % (SK (+)) und 87 % (SK (-)) erreicht. Auffällig war, dass im System ohne Zellen der Anteil im Akzeptor sehr gering ausfiel. In absorptiver Richtung adsorbierte zudem nur ein geringer Anteil im basolateralen Kompartiment (Insert (BL) und Well (BL)). Hier wurden 2,0 % im System ohne Zellen, 3,1 % im System mit Zellen aber ohne MK571 und 2,7 % im System mit Zellen und mit MK571 wiedergefunden. Dahingegen adsorbierten in sekretorischer Richtung 6,0 % im System ohne Zellen, 3,0 % im System mit Zellen ohne MK571 und 2,9 % im System mit Zellen mit MK571 ans Insert im apikalen Kompartiment (Insert (AP)). Im System mit Zellen gingen somit in etwa die gleichen Anteile im jeweiligen Akzeptor durch Adsorption verloren. Von der anfangs eingesetzten Menge adsorbierten jedoch in absorptiver Richtung 24,8 % im System mit Zellen aber ohne MK571 und 22,6 % im System mit Zellen und mit MK571 ans Insert im apikalen Kompartiment (Insert (AP)).

Dieser Anteil stand für die Permeation somit nicht zur Verfügung. In sekretorischer Richtung dagegen adsorbierten nur 13,9 % im System mit Zellen ohne MK571 und 16,8 % im System mit Zellen mit MK571 an die Oberflächen im basolateralen Kompartiment (Insert (BL) und Well (BL)). Somit stand in sekretorischer Richtung ein größerer Anteil für die Permeation zur Verfügung. Im System ohne Zellen ging zudem ein größerer Anteil in absorptiver Richtung durch Adsorption an die PE-Membran (intrazellulär) verloren.

Wird für die Daten in Abbildung 3-10 der P_{app} berechnet, werden ohne Einbezug der adsorbierten Mengen die Werte in Tabelle 3-6 erhalten.

Tabelle 3-6: P_{app} und Effluxrate für SK807 ohne bzw. mit MK571 in HBSS (AP, BL) ohne Einbezug der adsorbierten Mengen an SK807

	SK807	SK807 + MK571
P_{app} AP-BL [cm/s]	$6,45 \times 10^{-7}$	$9,45 \times 10^{-7}$
P_{app} BL-AP [cm/s]	$4,91 \times 10^{-7}$	$7,36 \times 10^{-7}$
Effluxrate	0,76	0,78

Unter Einbezug der adsorbierten Mengen kann zudem eine Korrektur berechnet werden, indem zur Menge im Akzeptorkompartiment die adsorbierten Mengen im Akzeptorkompartiment addiert werden. Für einen Versuch in absorptiver Richtung würde zur Menge im basolateralen Kompartiment die adsorbierte Menge an das Well (BL) und das Insert (BL) addiert werden. Dementsprechend würde für einen Versuch in sekretorischer Richtung zur Menge im apikalen Kompartiment die adsorbierte Menge an das Insert (AP) addiert werden. Werden nun P_{app} und Effluxrate neu berechnet, werden die Werte in Tabelle 3-7 erhalten.

Tabelle 3-7: P_{app} und Effluxrate für SK807 ohne bzw. mit MK571 in HBSS (AP, BL) unter Einbezug der adsorbierten Mengen an SK807

	SK807	SK807 + MK571
P_{app} AP-BL [cm/s]	$2,30 \times 10^{-6}$	$2,43 \times 10^{-6}$
P_{app} BL-AP [cm/s]	$6,16 \times 10^{-6}$	$6,02 \times 10^{-6}$
Effluxrate	2,68	2,48

Durch die Korrektur der zuvor berechneten P_{app} werden um den Faktor 3,6 bzw. 2,6 höhere Werte in absorptiver Richtung und um den Faktor 12,5 bzw. 8,2 höhere Werte in sekretorischer Richtung erhalten. Diese Asymmetrie kann auf die Verwendung von

BSA im basolateralen Kompartiment zurückgeführt werden. Da hierbei eine unspezifische Adsorption verringert wurde, ging in absorptiver Richtung weniger SK807 durch unspezifische Adsorption im Akzeptorkompartiment verloren. Im apikalen Kompartiment wurde kein BSA verwendet, weshalb von der permeierten Menge ein größerer Anteil adsorbierte. Die nun durchgeführte Korrektur resultiert in einer größeren Zunahme des P_{app} in sekretorischer als in absorptiver Richtung. Des Weiteren sind die P_{app} für die jeweiligen Richtungen ohne bzw. mit MK571 jetzt nahezu gleich. Dies zeigt, dass die Unterschiede in den P_{app} ohne bzw. mit MK571 auf eine unspezifische Adsorption von MK571 zurückzuführen sind, wodurch in den Versuchen mit MK571 weniger SK807 adsorbierte und somit der Papp ohne Korrektur größer ausfiel. In sekretorischer Richtung ist der Papp nun größer als in absorptiver Richtung. Wie zuvor erwähnt könnte die Ursache dafür die Verwendung von BSA im basolateralen Kompartiment sein. Die Effluxraten sind nun auch größer 2, was für die Beteiligung eines Effluxtransporters sprechen würde. Unter Inhibierung von MRP2 durch MK571 konnte die Effluxrate jedoch nur um 7,5 % gesenkt werden. Somit konnte auch hier eine Beteiligung von MRP2 nicht bestätigt werden.

Durch unspezifische Adsorption an Oberflächen im Transwell war eine Interpretation der Permeationsdaten somit schwierig, da es auf Grund der Verwendung von BSA im basolateralen Kompartiment zu einer Asymmetrie zwischen absorptiver und sekretorischer Richtung kam. Eine Verringerung der unspezifischen Adsorption in nur einem Kompartiment war nicht zielführend, weshalb im weiteren Verlauf eine andere Methode gefunden werden sollte, in der die Wiederfindung größer und in beiden Richtungen ähnlich ist.

3.4 Permeationsstudien p38 α -MAPK-Inhibitoren in FaSSIF/4 % BSA

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, musste ein anderer Versuchsaufbau für die Permeationsstudien gewählt werden, da das formulierte Ziel war, eine Wiederfindung von über 80 % im Transwell zu erhalten.

Fossati et al. (2008) und Lakeram et al. (2008) empfehlen für lipophile Substanzen die Verwendung von Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF) im apikalen und BSA in HBSS im basolateralen Kompartiment, um die Löslichkeit zu verbessern und die unspezifische Adsorption zu verringern. Daher sollte dieses Konzept in den nachfolgenden Kapiteln zunächst hinsichtlich der Eignung für die Permeationsstudien überprüft werden. Ein Vorteil dieses Konzepts ist zudem, dass es eher einem physiologischen Modell entspricht.

3.4.1 Wiederfindung in HPLC-Vials, Falcon-Tubes und Transwell

Wie bereits für den Versuchsaufbau mit HBSS wurde auch mit FaSSIF und 4 % BSA die Wiederfindung überprüft.

3.4.1.1 *Wiederfindung in HPLC-Vials*

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.8.2.2 beschrieben. Für die FaSSIF-Probe entsprach die Wiederfindung nach 19 h 98,6 %, für die BSA-Probe nach 24 h 100,2 %. Eine entsprechende Lagerung in HPLC-Vials war somit möglich.

3.4.1.2 *Wiederfindung in Falcon-Tubes*

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.8.2.3 beschrieben. Für die FaSSIF Probe ohne MK571 ergab sich eine Wiederfindung von 103,0 %, für die Probe mit MK571 ergab sich eine Wiederfindung von 100,4 %. Für die BSA-Probe nach 60 min betrug die Wiederfindung 102,5 %. Wurden mehrere Probenzüge über einen Zeitraum von 120 min durchgeführt, so betrug die relative SD 3,94 %.

Eine Lagerung im Falcon-Tube war somit ebenfalls möglich.

3.4.1.3 Wiederfindung im Transwell

Mit diesem Versuch sollte ein Permeationsexperiment nachgestellt werden. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.8.2.4 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

Tabelle 3-8: Wiederfindung SK807 in einem Permeationsexperiment ohne Zellen mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

Probe	Wiederfindung [%]
SK807 AP-BL	103,7 ± 2,3
SK807 + MK571 AP-BL	104,4 ± 1,4
SK807 BL-AP	98,8 ± 2,8
SK807 + MK571 BL-AP	97,1 ± 0,9

n=3, MW ± SD

Hubatsch et al. (2007) empfehlen, dass die Massenbilanz so hoch wie möglich sein sollte. Bei einer Massenbilanz von 90 % würde der berechnete P_{app} mit einem Fehler von 10 % behaftet sein. Für ihre Experimente erhalten die Autoren bei einer Massenbilanz von über 80 % eine akzeptable Näherung des P_{app} (Hubatsch et al. 2007).

Da die Wiederfindung im Transwell ca. 100 % betrug und in beiden Richtungen ähnlich ist (Tabelle 3-8), wurde der Versuchsaufbau als geeignet bewertet.

3.4.2 Vitalität der Caco-2/TC7 Zellen unter Verwendung von FaSSIF

Die Vitalität von Zellen bzw. die Toxizität bestimmter Substanzen kann mittels WST-1 Assay bestimmt werden. In diesem Fall wurde überprüft, ob die Vitalität von Caco-2/TC7 Zellen bei Exposition gegenüber FaSSIF reduziert wird.

WST-1 steht für wasserlösliches Tetrazolium. Dieses wird durch mitochondriale Reduktasen in Formazan gespalten (Abbildung 3-11). Die mitochondriale Dehydrogenase ist nur in lebenden Zellen aktiv, weshalb eine direkte Korrelation zwischen der gemessenen Absorption und den lebenden Zellen besteht (Roche Diagnostics GmbH August 2018).

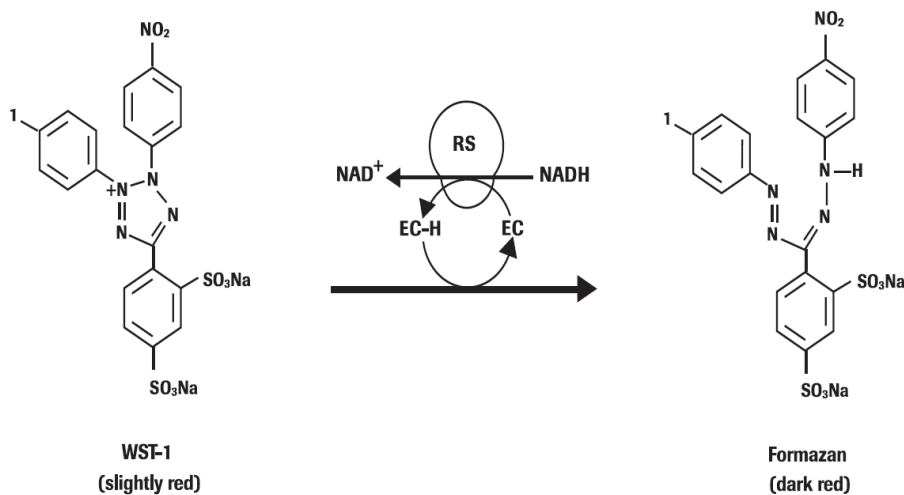


Abbildung 3-11: Spaltung des WST-1 zu Formazan
 RS: mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase System; EC: Elektronenkopplungsreagenz aus Roche Diagnostics GmbH (August 2018)

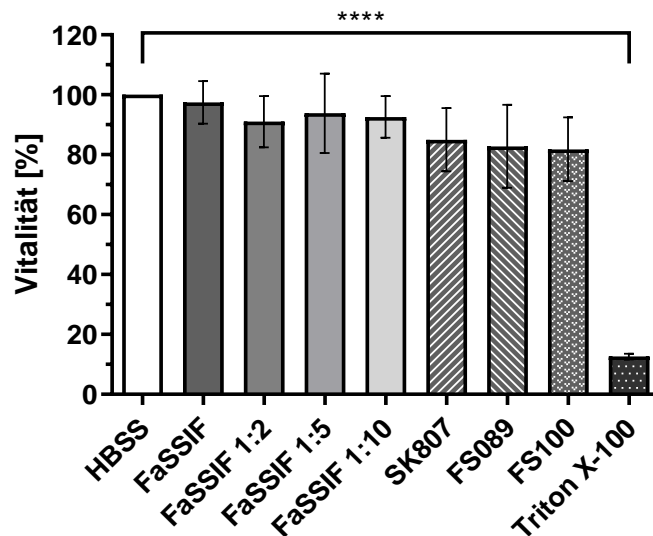


Abbildung 3-12: Ergebnis WST-1 Assay Caco-2/TC7
 HBSS: Positivkontrolle, Vitalität der Caco-2/TC7 Zellen in den anderen Proben wurde darauf bezogen, Vitalität HBSS: 100 %
 FaSSIF 1:x: FaSSIF 1:x verdünnt mit Phosphatpuffer pH 6,5
 SK807: SK807 10 μ M in FaSSIF; FS089: FS089 10 μ M in FaSSIF; FS100: FS100 10 μ M in FaSSIF
 Triton X-100: Negativkontrolle, 2 % (w/v) Triton X-100 in RO-H₂O
 n=4 Passagen, MW \pm SD, ANOVA mit Dunnett-Test, ****: $p \leq 0,0001$

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.8.3 beschrieben.

Die Vitalität der Caco-2/TC7 Zellen war durch die Exposition gegenüber FaSSIF nicht beeinträchtigt (Abbildung 3-12). Auch die Gegenwart der p38 α -MAPK-Inhibitoren führten zu keiner signifikanten Reduzierung der Zellvitalität, wenn sie in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt wurden. Somit war es möglich FaSSIF im apikalen Kompartiment in den Permeationsstudien mit Caco-2/TC7 Zellen zu verwenden.

3.4.3 P-Gp-Inhibierungsassay mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

Der P-Gp-Inhibierungsassay wurde wie unter 2.6 beschrieben durchgeführt, nur befand sich nun im apikalen Kompartiment FaSSIF mit 0,5 % DMSO und im basolateralen Kompartiment 4 % (w/v) BSA in HBSS. Als Medium für die Vorinkubation wurde HBSS in beiden Kompartimenten verwendet. Es wurde die Sekretion von Rhodamin betrachtet. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Platerreader Varioskan bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 528 nm. Eine Kalibrierung wurde sowohl für FaSSIF als auch für 4 % BSA durchgeführt.

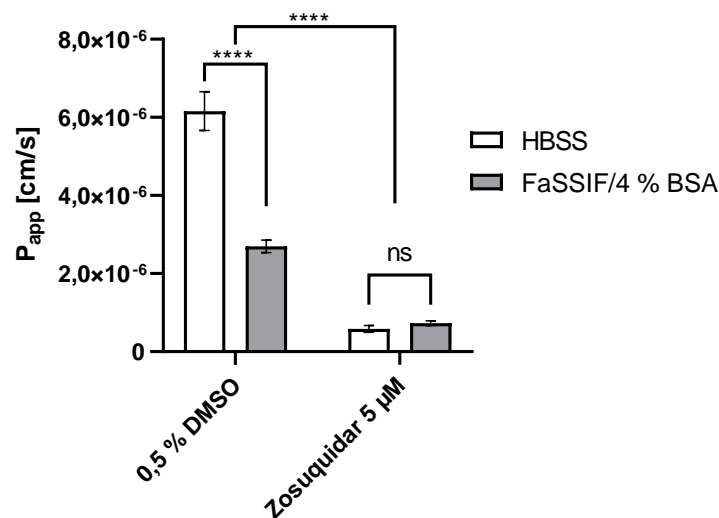


Abbildung 3-13: P-Gp-Inhibierungsassay mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) im Vergleich zu HBSS (AP, BL) Sekretion von Rhodamin (80 µM)
n=3 Passagen, MW ± SD, ANOVA mit Tukey-Test
ns: p > 0,05; ****: p ≤ 0,0001

Durch die Verwendung von FaSSIF apikal und 4 % BSA basolateral wurde die Sekretion von Rhodamin im Vergleich zu HBSS in beiden Kompartimenten signifikant reduziert (Abbildung 3-13 0,5 % DMSO). Ingels et al. (2002; 2004) vermuteten eine Modulation von P-Gp durch FaSSIF. Jedoch wurde – im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen – bei Ingels et al. (2002; 2004) FaSSIF im apikalen Kompartiment und HBSS ohne BSA im basolateralen Kompartiment verwendet. Fossati et al. (2008) vermuteten, dass durch die Verwendung von HBSS im basolateralen Kompartiment Adsorptionen zu einer Verringerung der P_{app} -Werte führten, weshalb zusätzlich BSA im basolateralen Kompartiment verwendet werden sollte.

Da Zosuquidar zu einer signifikanten Reduktion des P_{app} in sekretorischer Richtung führte, wurde der Versuchsaufbau für die Untersuchung der Beteiligung von P-Gp an der Permeation grundsätzlich als geeignet bewertet. Allerdings könnte bei Rhodamin

die Proteinbindung dazu geführt haben, dass der P_{app} in sekretorischer Richtung bei Verwendung von FaSSIF/4 % BSA ohne Zusatz eines P-Gp-Inhibitors reduziert wurde. Ando et al. (2001) fanden heraus, dass Rhodamin zu 70 % an Plasmaproteine in Ratten bindet. In dieser Arbeit wurde die Bindung von Rhodamin an BSA untersucht (3.8.3) und es lagen 42 % ungebunden vor. Neuhoff et al. (2006) haben den Einfluss von BSA im basolateralen Kompartiment auf den P_{app} für Substanzen mit niedriger und hoher Plasmaproteinbindung untersucht und empfehlen, den P_{app} mit der ungebundenen Konzentration anstelle der initialen Konzentration zu berechnen. Die ungebundene Konzentration wurde nach Formel 3-1 berechnet.

$$C_u = f_u * C_{initial}$$

C_u ungebundene Konzentration
 f_u ungebundene Fraktion
 $C_{initial}$ initiale Konzentration

Formel 3-1: Berechnung der ungebundenen Konzentration

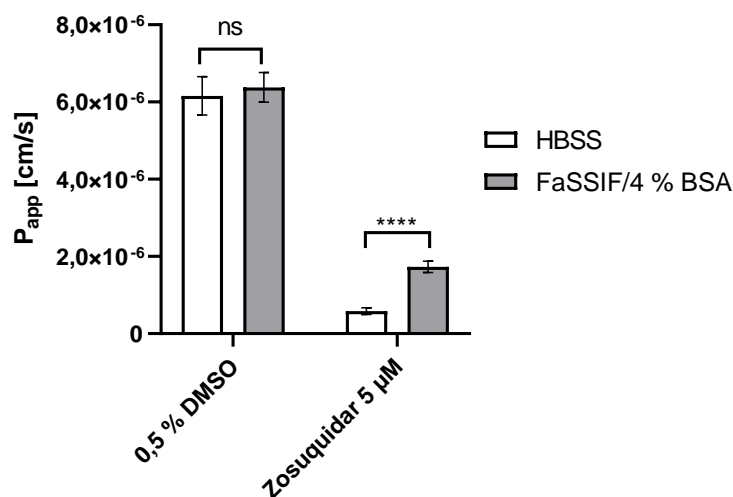


Abbildung 3-14: P-Gp-Inhibierungsassay mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) im Vergleich zu HBSS (AP, BL) unter Berücksichtigung der ungebundenen Fraktion Sekretion von Rhodamin (80 µM) n=3 Passagen, MW ± SD, ANOVA mit Sidak-Test ns: p > 0,05; ****: p ≤ 0,0001

Wird die ungebundene Fraktion berücksichtigt, so bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dem P_{app} für HBSS (AP, BL) und dem P_{app} für FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) ohne Zusatz von Zosuquidar (Abbildung 3-14, 0,5 % DMSO). Die P_{app} -Werte bei Zusatz von Zosuquidar unterscheiden sich nun hingegen signifikant. Zosuquidar bindet zu 99 % an Plasmaproteine im Menschen (Tsukimoto et al. 2015). Somit könnte durch eine Verdrängung aus der Bindung mit BSA mehr Rhodamin ungebunden vorliegen. Die ungebundene Konzentration wäre somit basierend auf

falschen Werten berechnet worden, weshalb der errechnete P_{app} nun größer ist. Da sich ohne Berücksichtigung der Proteinbindung unter Zusatz von Zosuquidar für HBSS und FaSSIF/4 % BSA die P_{app} -Werte nicht signifikant unterschieden (Abbildung 3-13), scheint hierbei die Proteinbindung von Zosuquidar keinen Einfluss auf die Bewertung, ob P-Gp an der Permeation von Rhodamin beteiligt ist, zu haben. Zosuquidar war bereits bei der Vorinkubation in HBSS vorhanden, weshalb eine ausreichende Inhibierung von P-Gp gewährleistet war.

Da eine Beteiligung von P-Gp an der Permeation von Rhodamin auch ohne Korrektur ersichtlich war, wurde für die nachfolgenden Experimente keine Korrektur bezüglich der gebundenen und ungebundenen Fraktion mehr vorgenommen.

3.4.4 Permeationsstudien p38 α -MAPK-Inhibitoren, 2 h, 37 °C

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.9 beschrieben.

3.4.4.1 Vergleich FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) mit HBSS (AP, BL), SK807

Werden die Permeationsraten für SK807 in HBSS mit denen in FaSSIF/BSA verglichen, so unterschieden sich diese nicht signifikant (Abbildung 3-15 A, B). Auffällig war, dass die Standardabweichungen bei der Sekretion in FaSSIF/BSA größer ausfielen als in HBSS. Da SK807 zu ca. 99 % (3.8.3) an BSA bindet und nur eine geringe Menge permeierte, war dies der Proteinbindung geschuldet, da eine kleine Änderung in der ungebundenen Fraktion eine große Auswirkung auf die Permeationsrate haben kann. MK571 bindet zu 99,5 % an Plasmaproteine (Tocco et al. 1990), wodurch die ungebundene Menge an SK807 variieren und auch mehr permeieren konnte. Die Ergebnisse zwischen den beiden Methoden waren – bezogen auf die Permeationsraten – vergleichbar.

Wird die intrazelluläre Anreicherung betrachtet, so akkumulierte in HBSS mehr als in FaSSIF/BSA. Dabei ist allerdings zu beachten, dass bei der Bestimmung der intrazellulären Anreicherung auch die Adsorption an die PE-Membran miterfasst wurde. Dadurch war die aufgenommene Menge in HBSS scheinbar größer (Abbildung 3-15 C, D), da hierbei bereits 30 % (Abbildung 3-10 A, SK (-)) und 13 % (Abbildung 3-10 B, SK (-)) der initial eingesetzten Menge an die PE-Membran adsorbierten. In FaSSIF/BSA lag die Wiederfindung im Transwell ohne Zellen zwischen 97 % (BL-AP) und 104 % (AP-BL) (Tabelle 3-8), weshalb hier nur von einer vernachlässigbaren Adsorption an die PE-Membran ausgegangen wurde.

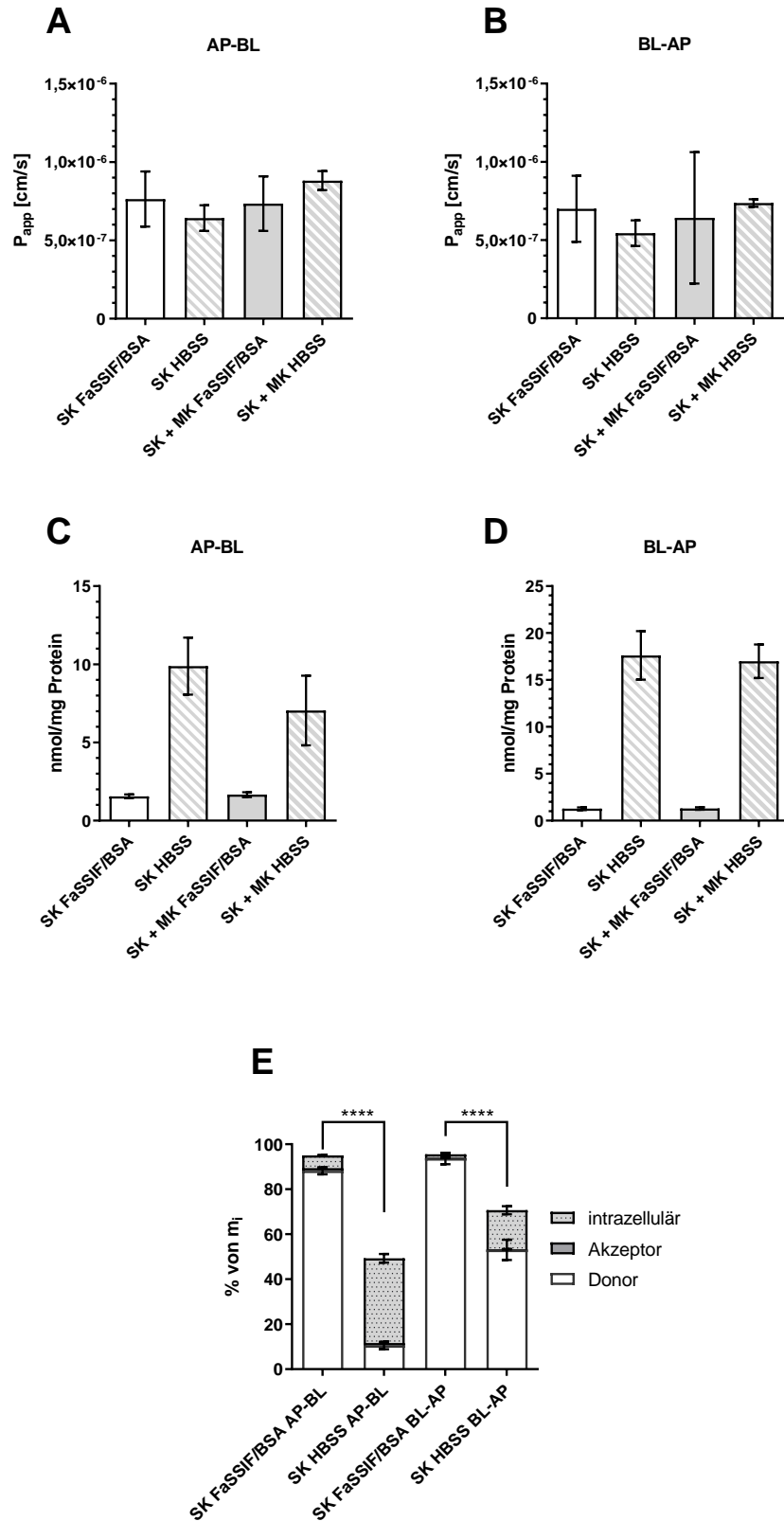


Abbildung 3-15: Vergleich Permeationsraten (A, B), intrazelluläre Anreicherung (C, D) und Massenbilanz (E) für SK807 mit oder ohne MK571 in HBSS (AP, BL) oder FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

SK: SK807 10 μ M in FaSSIF/BSA, 8 μ M in HBSS; MK: MK571 10 μ M

m_i : initial eingesetzte Menge API; intrazellulär: intrazellulär angereicherte Menge inkl. adsorbierter Menge an PE-Membran

n=3-4 Passagen, MW \pm SD, E: ANOVA mit Tukey-Test, ****: $p \leq 0,0001$

Wird die Massenbilanz betrachtet, so zeigten sich vergleichbare Trends zwischen den beiden Versuchen (Abbildung 3-15 E). Intrazellulär war die Wiederfindung bei beiden Experimenten in absorptiver Richtung größer als in sekretorischer Richtung. Die im Akzeptor gefundenen Mengen waren vergleichbar (Tabelle 3-9). Im Donor war der Anteil an SK807 in FaSSIF/BSA viel größer als in HBSS (Abbildung 3-15 E), da eine unspezifische Adsorption durch FaSSIF bzw. 4 % BSA verhindert wurde.

Tabelle 3-9: Vergleich des Anteils an SK807 im Akzeptor bei Verwendung von HBSS (AP, BL) oder FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

Versuch	Richtung	Wiederfindung [%]	
		Mittelwert	SD
SK FaSSIF/BSA	AP-BL	1,24	0,29
SK HBSS	AP-BL	1,10	0,14
SK FaSSIF/BSA	BL-AP	0,38	0,11
SK HBSS	BL-AP	0,31	0,06

n=3-4 Passagen

In Übereinstimmung mit Fossati et al. (2008) war der Versuchsaufbau mit FaSSIF (AP) und 4 % (w/v) BSA (BL) somit vergleichbar mit einem Versuch, bei dem sich HBSS in beiden Kompartimenten befand. Die Wiederfindung konnte auf über 90 % gesteigert werden.

Zwar tritt bei Verwendung von 4 % BSA Proteinbindung auf (Neuhoff et al. 2006) und bei FaSSIF können sich lipophile Substanzen in Mischmizellen, bestehend aus Gallensäuren und Lipiden, einlagern (Buckley et al. 2012), jedoch entspricht dieser Versuchsaufbau eher den physiologischen Bedingungen als der klassische Versuchsansatz mit HBSS in beiden Kompartimenten.

3.4.4.2 Inhibierungsstudien p38 α -MAPK-Inhibitoren, 2 h, 37 °C

Aufgrund der Eignung von FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) für die Permeationsstudien, wurden Inhibierungsstudien mit den p38 α -MAPK-Inhibitoren und den entsprechenden Efflux-Transporter-Inhibitoren, wie unter 2.9 beschrieben, durchgeführt.

Daraus ergaben sich für SK807 die in Abbildung 3-16 dargestellten Ergebnisse.

Für SK807 stieg der P_{app} in absorptiver Richtung unter Inhibierung von BCRP, P-Gp oder Multiinhibierung von BCRP, MRP2 und P-Gp (Abbildung 3-16 A). Zusätzlich sank der P_{app} in sekretorischer Richtung unter Inhibierung von BCRP oder P-Gp. Diese Änderungen waren jedoch nicht signifikant. Bei einer Multiinhibierung der Efflux-

Transporter stieg der P_{app} in sekretorischer Richtung signifikant an. Letzteres könnte ein Hinweis auf einen basolateral gelegenen Efflux-Transporter sein, der scheinbar durch den Cocktail inhibiert wurde, wodurch der P_{app} in sekretorischer Richtung stieg. Dadurch sollte allerdings gleichzeitig der P_{app} in absorptiver Richtung sinken. Dieser stieg jedoch im Vergleich zur Kontrolle an, sodass diese Hypothese verworfen werden muss. Eine weiterer Erklärungsansatz wäre, dass mehr SK807 durch den Zusatz der drei Efflux-Transporter-Inhibitoren für die Permeation in sekretorischer Richtung zur Verfügung stand, da sich im basolateralen Kompartiment BSA befand und SK807 zu 99 % an BSA bindet (Tabelle 3-14). Zosuquidar beispielsweise zeigt eine 99 %-ige Plasmaproteinbindung im Menschen (Tsukimoto et al. 2015) und MK571 eine 99,5 %-ige Plasmaproteinbindung in der Ratte (Tocco et al. 1990). Somit würden die Efflux-Transporter-Inhibitoren und SK807 um die Bindestellen an BSA konkurrieren und SK807 aus der BSA-Bindung verdrängen. Dadurch würde mehr SK807 ungebunden vorliegen, wodurch mehr SK807 für die Permeation in sekretorischer Richtung zur Verfügung stand. Dies hätte keinen Einfluss auf die Permeation in absorptiver Richtung. Besonders in sekretorischer Richtung wurden hohe Standardabweichungen erhalten, was auf die bereits erwähnte Bindung an BSA zurückgeführt werden kann. In absorptiver Richtung fallen die Standardabweichungen geringer aus, da eine Bindung an BSA keinen vergleichbaren Einfluss auf die Absorption hat.

Intrazellulär reicherte sich durch die Inhibierung eines oder mehrerer Efflux-Transporter nicht mehr SK807 an (Abbildung 3-16 B). Sollte ein Efflux-Transporter an der Permeation von SK807 beteiligt sein, sollte hier durch Inhibierung des entsprechenden Transporters ein Anstieg in der intrazellulären Menge zu sehen sein. Da dies nicht beobachtet wurde, kann eine Beteiligung der untersuchten Efflux-Transporter an der Permeation von SK807 nicht bestätigt werden.

Unter Inhibierung von P-Gp oder BCRP sanken die Effluxraten um 28 % für BCRP und 27 % für P-Gp (Tabelle 3-10 + Ko143 bzw. + Zosuquidar), was jeweils für die Beteiligung der beiden an der Permeation von SK807 spricht. Da jedoch weder eine signifikante Zunahme der Absorption noch eine signifikante Abnahme der Sekretion auftraten, konnte eine Beteiligung der beiden Efflux-Transporter nicht bestätigt werden. Des Weiteren stieg die Effluxrate unter Zusatz des Cocktails aus allen drei Efflux-Transporter-Inhibitoren an. Dies könnte auf die bereits zuvor erwähnte Beteiligung eines basolateral lokalisierten Efflux-Transporters hindeuten. Da MK571

auch MRP3 inhibiert, welches sich auf der basolateralen Seite findet (Ming et al. 2011, Zeng et al. 2001), könnte dies eine schlüssige Erklärung liefern. Wird die intrazelluläre Menge aber genauer betrachtet, so stieg diese unter Einsatz von MK571 in absorptiver Richtung leicht an. Allerdings war der Effekt im Cocktail, in welchem sich auch MK571 befand, kaum zu sehen. Aufgrund der Streuung der Messwerte kann in keinem Fall von signifikanten Unterschieden gesprochen werden.

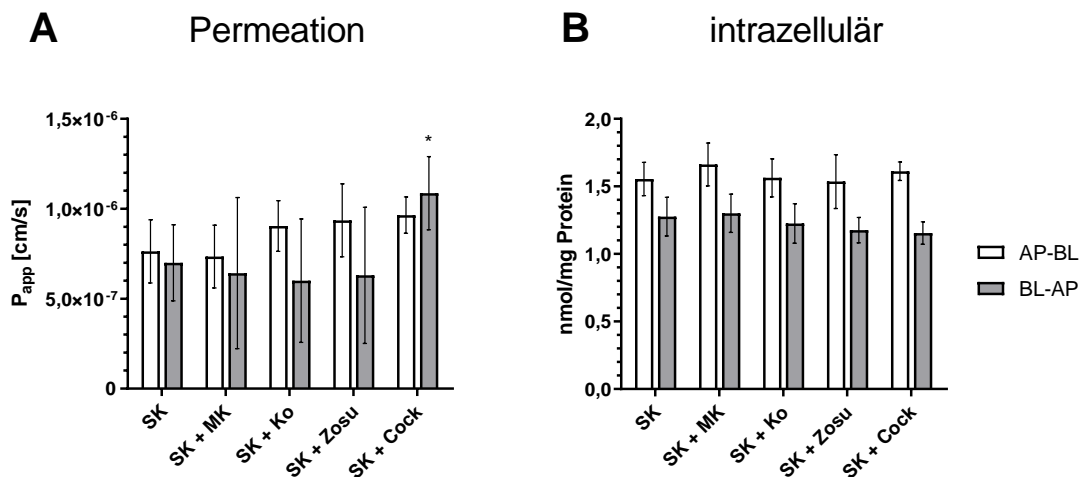


Abbildung 3-16: Inhibierungsstudie SK807 10 μ M 37 °C, 2 h in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)
 SK: SK807 10 μ M, MK: MK571 10 μ M, Ko: Ko143 5 μ M, Zosu: Zosuquidar 5 μ M, Cock: Cocktail bestehend aus allen Efflux-Transporter-Inhibitoren in der entsprechenden Konzentration
 n=3 Passagen, MW \pm SD, ANOVA mit Dunnett-Test, Vergleich SK mit SK + Inhibitor, *: $p \leq 0,05$

Tabelle 3-10: Effluxraten SK807 10 μ M
 Inhibierungsstudien in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

Versuch	Effluxrate
SK807	0,92
SK807 + MK571	0,87
SK807 + Ko143	0,66
SK807 + Zosuquidar	0,67
SK807 + Cocktail	1,13

Berechnung der Effluxraten aus den Mittelwerten der P_{app} (vgl. Abbildung 3-16)

Wie bereits für SK807 wurde auch für FS089 die Permeation unter Inhibierung der entsprechenden Efflux-Transporter systematisch untersucht. Dadurch ergaben sich die in Abbildung 3-17 dargestellten Ergebnisse. Für FS089 stieg der P_{app} in absorptiver

Richtung unter Inhibierung von BCRP oder P-Gp an. Eine Multiinhibierung zeigte jedoch keinen Effekt in absorptiver Richtung. In Kombination mit MK571 sank der P_{app} in absorptiver Richtung. In sekretorischer Richtung stieg der P_{app} unter Einsatz von MK571 oder des Cocktails. Diese Unterschiede in den P_{app} -Werten waren jedoch nicht signifikant (Abbildung 3-17 A), könnten aber in der Tendenz, wie bereits bei SK807 erwähnt, auf eine Inhibierung eines basolateral gelegenen Efflux-Transporters hindeuten. Intrazellulär war kein signifikanter Anstieg unter Inhibierung der entsprechenden Efflux-Transporter zu verzeichnen. In sekretorischer Richtung nahm die intrazelluläre Menge unter Multiinhibierung der Efflux-Transporter signifikant ab (Abbildung 3-17 B). Dies könnte an einer geringeren Adsorption an die PE-Membran liegen. Da die Efflux-Transporter-Inhibitoren ebenfalls unspezifisch an Oberflächen adsorbieren (vgl. 2.2.1), könnten diese FS089 von der PE-Membran verdrängt haben, wodurch die intrazelluläre Menge geringer ausfiel. Bei der Bestimmung der intrazellulären Menge wird auch die an die PE-Membran adsorbierte Menge mit einbezogen. Da im Transwell ohne Zellen die Wiederfindung für SK807 zwischen 97 % und 104 % lag, wurde vermutet, dass die Adsorption der p38 α -MAPK-Inhibitoren an die PE-Membran vernachlässigbar ist. Jedoch wird sich dabei prozentual auf die initial eingesetzte Menge bezogen. Im Falle der intrazellulär angereicherten Menge muss berücksichtigt werden, dass diese nur ca. 2 - 5 % der initial eingesetzten Menge entspricht (Abbildung 3-15 E). Wird die an die PE-Membran adsorbierte Menge nun auf die intrazellulär angereicherte Menge bezogen, kann durch eine Verdrängung der p38 α -MAPK-Inhibitoren durch die Efflux-Transporter-Inhibitoren ein signifikanter Unterschied resultieren.

Die Effluxraten blieben annähernd gleich (+ Ko143, + Zosuquidar) oder stiegen an (+ MK571, + Cocktail) (Tabelle 3-11). Da MK571 auch MRP3 inhibiert (Zeng et al. 2001), welches ein Efflux-Transporter auf der basolateralen Seite ist (Ming et al. 2011), könnte FS089 ein Substrat dessen sein. Da, wie bei SK807, jedoch keine signifikante Zunahme der Absorption bzw. eine signifikante Abnahme der Sekretion zu beobachten war, konnte eine Beteiligung der Efflux-Transporter an der Permeation von FS089 nicht bestätigt werden.

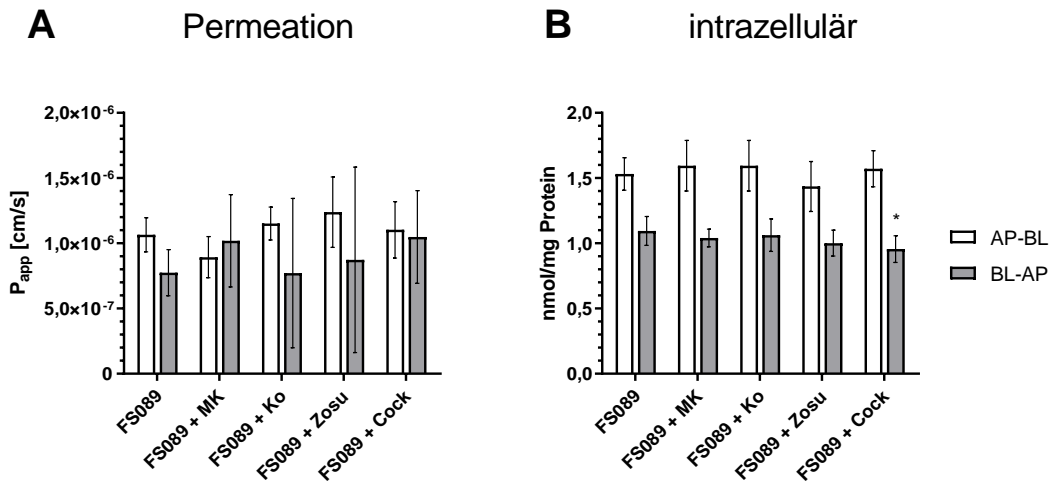


Abbildung 3-17: Inhibierungsstudie FS089 10 µM 37 °C, 2 h in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)
 MK: MK571 10 µM, Ko: Ko143 5 µM, Zosu: Zosuquidar 5 µM, Cock: Cocktail bestehend aus allen Efflux-Transporter-Inhibitoren in der entsprechenden Konzentration
 n=3 Passagen, MW ± SD, ANOVA mit Dunnett-Test, Vergleich FS089 mit FS089 + Inhibitor, *: p ≤ 0,05

Tabelle 3-11: Effluxraten FS089 10 µM
 Inhibierungsstudien in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

Versuch	Effluxrate
FS089	0,73
FS089 + MK571	1,14
FS089 + Ko143	0,67
FS089 + Zosuquidar	0,70
FS089 + Cocktail	0,95

Berechnung der Effluxraten aus den Mittelwerten der P_{app} (vgl. Abbildung 3-17)

Auch für FS100 wurde die Beteiligung der vorgegeben Efflux-Transporter systematisch untersucht. Hieraus ergaben sich die in Abbildung 3-18 dargestellten Ergebnisse. Für FS100 waren die P_{app} in sekretorischer Richtung größer als in absorptiver Richtung, was zunächst für eine Beteiligung von apikal gelegenen Efflux-Transportern spricht (Abbildung 3-18 A). In Kombination mit MK571 sank der P_{app} in absorptiver Richtung. Da MK571 auch MRP3 inhibiert (Zeng et al. 2001), welches auf der basolateralen Seite lokalisiert ist (Ming et al. 2011), könnte wie bereits bei FS089 ein basolateraler Efflux-Transporter an der Permeation von FS100 beteiligt gewesen sein. Jedoch war intrazellulär keine Anreicherung durch Zugabe von MK571 zu erkennen. Unter Multiinhibierung der Efflux-Transporter stieg der P_{app} in absorptiver Richtung

signifikant, was für die Beteiligung apikaler Efflux-Transporter spricht. Jedoch stieg er auch in sekretorischer Richtung, was wiederum für eine Beteiligung eines basolateralen Efflux-Transporters spricht. Intrazellulär war jedoch keine Anreicherung zu erkennen (Abbildung 3-18 B). Die Effluxrate sank bei Zugabe des Inhibierungscocktails um 13 % (Tabelle 3-12). Dies könnte auf ein Zusammenspiel mehrerer Transporter, z.B. eines apikal und eines basolateral gelegenen Efflux-Transporters, hindeuten.

Wie bereits bei SK807 und FS089 war eine signifikante Zunahme der Absorption bzw. eine signifikante Abnahme der Sekretion und eine Zunahme in der intrazellulär angereicherten Menge nicht eindeutig erkennbar, weshalb eine Beteiligung von BCRP, MRP2 und/oder P-Gp an der Permeation von FS100 nicht bestätigt werden konnte.

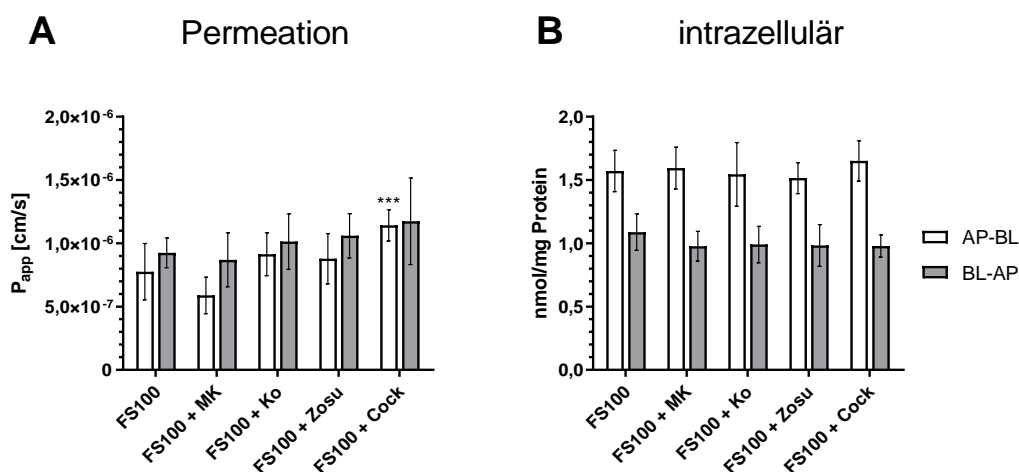


Abbildung 3-18: Inhibierungsstudie FS100 10 μ M 37 °C, 2 h in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)
 MK: MK571 10 μ M, Ko: Ko143 5 μ M, Zosu: Zosuquidar 5 μ M, Cock: Cocktail bestehend aus allen Efflux-Transporter-Inhibitoren in der entsprechenden Konzentration
 n=3 Passagen, MW \pm SD, ANOVA mit Dunnett-Test, Vergleich F100 mit FS100 + Inhibitor, ***: $p \leq 0,001$

Tabelle 3-12: Effluxraten FS100 10 μM
Inhibierungsstudien in FaSSiF (AP) und 4 % BSA (BL)

Versuch	Effluxrate
FS100	1,19
FS100 + MK571	1,48
FS100 + Ko143	1,11
FS100 + Zosuquidar	1,21
FS100 + Cocktail	1,03

Berechnung der Effluxraten aus den Mittelwerten der P_{app} (vgl. Abbildung 3-18)

3.4.5 Inhibierungsstudie SK807, 30 min, 37 °C

Den bisherigen Untersuchungen lag eine Inkubationszeit von 2 h zu Grunde. Da nach solch langer Hauptinkubation nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich bereits ein Gleichgewicht eingestellt hatte, wurden weitergehende Experimente mit verkürzter Inkubationszeit durchgeführt. Hierbei wurde bereits nach 30 min die permeierte und intrazellulär angereicherte Menge von SK807 in absorptiver und sekretorischer Richtung bestimmt. Eine Permeation nach 30 min war mittels HPLC nicht nachweisbar.

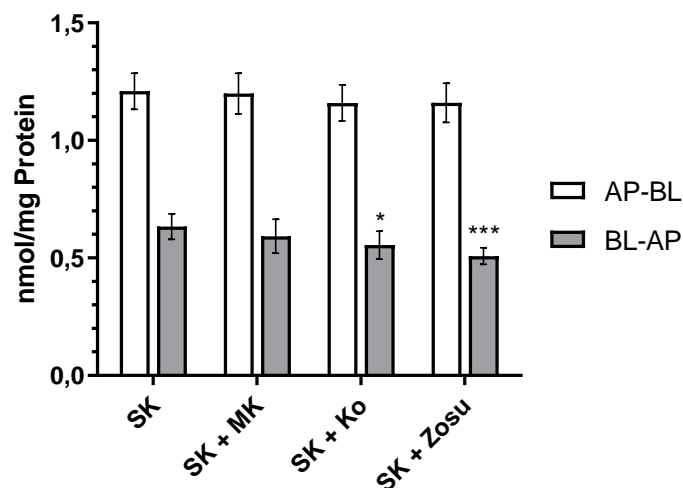


Abbildung 3-19: intrazelluläre Anreicherung SK807 37 °C, 30 min in FaSSiF (AP) und 4 % BSA (BL)
SK: SK807 10 μM , MK: MK571 10 μM , Ko: Ko143 5 μM , Zosu: Zosuquidar 5 μM
n=3 Passagen, MW \pm SD, ANOVA mit Dunnett-Test, Vergleich SK mit SK + Inhibitor, *: $p \leq 0,05$, ***: $p \leq 0,001$

Zwar reicherte sich im Vergleich zu den 2-stündigen Versuchen weniger SK807 intrazellulär an, da die Inkubation kürzer war, jedoch konnte durch die Inhibition eines

Efflux-Transporters keine Zunahme erreicht werden (Abbildung 3-19). Wie bereits zuvor nahm in sekretorischer Richtung die intrazelluläre Menge unter Inhibierung von BCRP oder P-Gp signifikant ab. Dies kann entweder an einer geringeren Adsorption an die PE-Membran oder eine Inhibition eines Uptake-Transporters auf basolateraler Seite gelegen haben. Würde es sich um einen Uptake-Transporter handeln, so hätte jedoch die intrazelluläre Menge in absorptiver Richtung zunehmen müssen, was hier allerdings nicht der Fall war.

3.4.6 Permeationsstudien SK807, 4 °C

Um festzustellen, ob tatsächlich ein aktiver Transport stattfand, wurden die Versuche mit SK807 bei 4 °C wiederholt.

Zunächst wurde untersucht, ob bei einer 2-stündigen Inkubation bei 4 °C die Transporter-Inhibitoren einen Einfluss auf die intrazelluläre Anreicherung hatten.

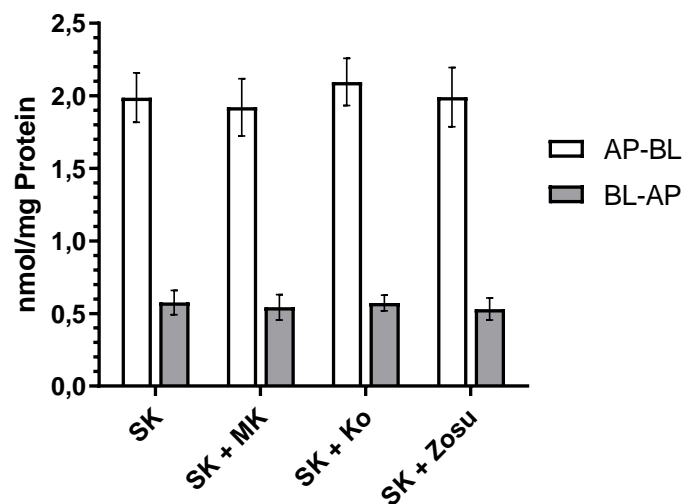


Abbildung 3-20: intrazelluläre Anreicherung SK807 4 °C, 2 h in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)
 SK: SK807 10 µM, MK: MK571 10 µM, Ko: Ko143 5 µM, Zosu: Zosuquidar 5 µM
 n=3 Passagen, MW ± SD, ANOVA mit Dunnett-Test, Vergleich SK mit SK + Inhibitor

Die Inhibitoren für die Efflux-Transporter hatten keinen Einfluss auf die intrazelluläre Anreicherung von SK807 (Abbildung 3-20). Somit scheint die zuvor aufgetretene Abnahme bei einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C (Abbildung 3-19) zufällig gewesen zu sein, da bei einer 2-stündigen Inkubation bei 37 °C (Abbildung 3-16) dieser Effekt ebenfalls nicht zu sehen war.

Allerdings nahm die intrazelluläre Menge in absorptiver Richtung bei 4 °C im Vergleich zu 37 °C zu und in sekretorischer Richtung ab. Dies ist in Abbildung 3-21 A nochmals deutlicher für eine 2-stündige Inkubation zu sehen.

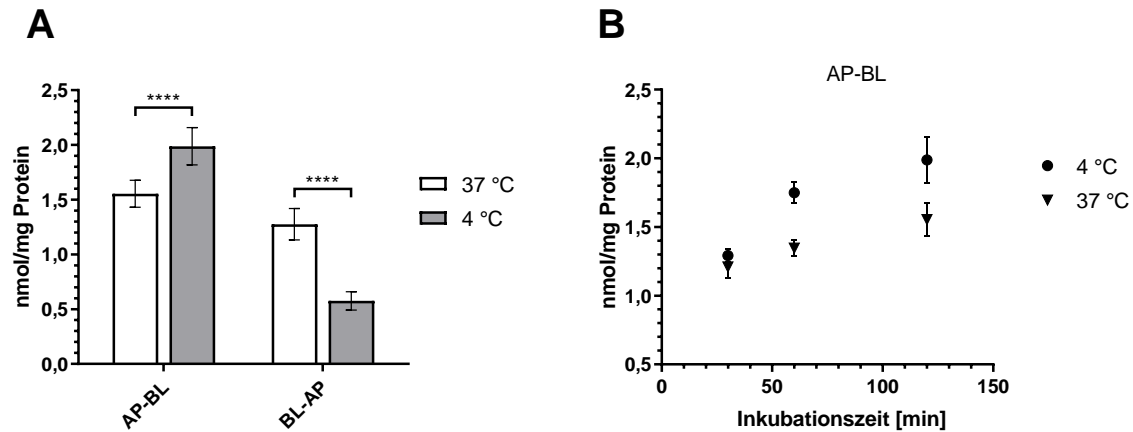


Abbildung 3-21: Vergleich intrazelluläre Anreicherung SK807 10 µM 37 °C und 4 °C in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

A: Inkubation 2 h, AP-BL und BL-AP, B: Inkubation 30, 60, 120 min, AP-BL
n=3 Passagen, MW ± SD, ungepaarter t-Test, ****: $p \leq 0,0001$

Der Unterschied in der intrazellulären Menge zwischen den beiden Temperaturen war in absorptiver Richtung auch über die Zeit ausgeprägt (Abbildung 3-21 B). Da bei 4 °C alle aktiven Transporte unterbunden sind (Hu und Borchardt 1990), kann dieser Befund dahingehend interpretiert werden, dass hier ein Uptake- oder Efflux-Transporter auf basolateraler Seite an der Permeation von SK807 beteiligt gewesen war.

Unter Inhibierung eines basolateral gelegenen Uptake-Transporters sollte die intrazelluläre Menge in sekretorischer und absorptiver Richtung abnehmen, da die Aufnahme in die Zellen verringert wird. Zusätzlich würde bei 37 °C erwartet werden, dass die Permeation in sekretorischer Richtung größer ist als in absorptiver Richtung. Dies traf für SK807 allerdings weder in HBSS noch in FaSSIF/BSA zu (Abbildung 3-8 A, Abbildung 3-16 A).

Wäre ein basolateral gelegener Efflux-Transporter beteiligt, so sollte die intrazelluläre Menge sowohl in absorptiver als auch in sekretorischer Richtung unter dessen Inhibierung zunehmen. In absorptiver Richtung würde kein aktiver Efflux auf basolateraler Seite stattfinden, wodurch die Permeation aus der Zelle ins basolaterale Kompartiment nur passiv und damit langsamer sein würde im Vergleich zur Kontrolle, in der der basolaterale Efflux-Transporter nicht inhibiert wäre. In sekretorischer

Richtung erfolgt die Aufnahme dagegen passiv und die Substanz würde unter Inhibierung des basolateral gelegenen Efflux-Transporters nicht durch den aktiven Efflux an der Permeation gehindert werden. Da jedoch in sekretorischer Richtung eine Abnahme zu erkennen ist, war ein basolateral gelegener Efflux-Transporter scheinbar nicht an der Permeation von SK807 beteiligt.

Bei Beteiligung eines apikal gelegenen Efflux-Transporters würde in sekretorischer Richtung die intrazelluläre Menge zunehmen, was hier allerdings nicht zutrif.

Eine weitere Hypothese wäre, dass bei 4 °C die Affinität von SK807 zur Zellmembran im Vergleich zu FaSSIF steigt, weshalb sich mehr in die Zellmembran einlagerte. Aufgrund der Oberflächenvergrößerung durch die Mikrovilli auf der apikalen Seite würde somit in absorptiver Richtung die intrazellulär quantifizierte Menge größer sein. In sekretorischer Richtung sollte dann allerdings die intrazelluläre Menge mit der intrazellulären Menge bei 37 °C vergleichbar sein oder größer werden. Da bei 4 °C aber zusätzlich die Permeation verlangsamt wird und die Oberfläche auf basolateraler Seite im Vergleich zur apikalen Seite kleiner ist, wäre es möglich, dass die intrazelluläre Menge in sekretorischer Richtung abnimmt. Des Weiteren ist nicht bekannt, ob eine niedrigere Temperatur einen Einfluss auf die Albuminbindung hat. Dass sich die p38 α -MAPK-Inhibitoren in die Zellmembran einlagern, wurde mittels Anisotropie-Messungen (siehe 3.7) nachgewiesen.

Die mögliche Beteiligung eines basolateral gelegenen Uptake- oder Efflux-Transporters wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da das Hauptaugenmerk auf die Beteiligung von apikal gelegenen Efflux-Transportern lag.

3.4.7 Fazit Permeationsstudien p38 α -MAPK-Inhibitoren in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

Durch den Einsatz von FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) konnte die Wiederfindung der p38 α -MAPK-Inhibitoren im Transwell auf über 90 % gesteigert und dadurch die Belastbarkeit der Ergebnisse erhöht werden.

Des Weiteren waren die P_{app} für SK807 mit oder ohne MK571 in FaSSIF/BSA mit den P_{app} in HBSS vergleichbar. Die intrazellulär gefundene Menge unterschied sich in absorptiver und sekretorischer Richtung. Aufgrund der apikalen Oberflächenvergrößerung durch die Mikrovilli, konnte in absorptiver Richtung eine größere Menge der p38 α -MAPK-Inhibitoren unspezifisch adsorbieren und auch mehr

passiv diffundieren, was die Unterschiede in den intrazellulär bestimmten Mengen erklären würde.

Bei den Permeationsstudien unter Inhibierung der Efflux-Transporter BCRP, MRP2 oder P-Gp konnte die Beteiligung derselben nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es könnte aber ein basolateral gelegener Efflux-Transporter beteiligt gewesen sein, da durch den Einsatz von MK571 die Permeation in absorptiver Richtung ab, bzw. in sekretorischer Richtung zunahm.

Studien bei 4 °C ließen zusätzlich vermuten, dass ein basolateraler Uptake- oder Efflux-Transporter an der Permeation beteiligt gewesen sein könnte oder sich die p38 α -MAPK-Inhibitoren in die Zellmembran verstärkt einlagerten.

Denkbar wäre auch, dass sowohl apikal als auch basolateral gelegene Efflux-Transporter an der Permeation der p38 α -MAPK-Inhibitoren beteiligt waren. Da die Effluxraten für FS089 und SK807 nahe bzw. unter eins lagen, ist von einer stärkeren Beteiligung eines oder mehrerer basolateral gelegenen Efflux-Transporter auszugehen. Für FS100 dagegen lag die Effluxrate über eins, weshalb von einer stärkeren Beteiligung eines oder mehrerer apikal gelegener Efflux-Transporter auszugehen ist. Insgesamt waren die Änderungen der Effluxraten jedoch gering und die beobachteten Effekte für den P_{app} waren zumeist nicht signifikant, weshalb auch davon auszugehen ist, dass die passive Diffusion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Permeation der p38 α -MAPK-Inhibitoren ist.

Aufgrund hoher Standardabweichungen in sekretorischer Richtung, die vermutlich durch die Albuminbindung bedingt waren, war eine belastbare Interpretation der Permeationsdaten jedoch schwierig.

3.5 Fluoreszenz-Assays

Da mit den vorausgegangenen Permeationsstudien eine Aussage über die Beteiligung der Efflux-Transporter BCRP, MRP2 und P-Gp an der Permeation der p38 α -MAPK-Inhibitoren schwierig war, sollten die Ergebnisse nochmals mit Fluoreszenz-Assays im 96-Well-Format überprüft werden.

Die Fluoreszenz-Assays basieren auf einer intrazellulären Anreicherung der jeweiligen Substanz unter Inhibierung des jeweiligen Efflux-Transporters (vgl. Abbildung 3-22).

Rhodamin ist ein Substrat des P-Gps (Shapiro und Ling 1997, Shapiro et al. 1999), wodurch die Permeation in die Zelle verringert wird (vgl. Abbildung 3-22 A). Durch die kompetitive oder nichtkompetitive Inhibition des P-Gps kann sich Rhodamin intrazellulär anreichern, wodurch im Vergleich zur Kontrolle, bei der P-Gp nicht inhibiert wurde, eine höhere intrazelluläre Fluoreszenz gemessen werden kann (vgl. Abbildung 3-22 B).

Der Assay mit Mitoxantron funktioniert analog zu Rhodamin (vgl. Abbildung 3-22 C und D). Mitoxantron ist im Gegensatz zu Rhodamin ein Substrat des BCRPs (Mahringer et al. 2009).

Calcein AM ist lipophil und fluoresziert nicht. Durch Diffusion gelangt es über die Zellmembran ins Cytosol, wo es durch eine unspezifische Esterase zu Calcein gespalten wird (vgl. Abbildung 3-22 E). Calcein fluoresziert und ist hydrophiler als Calcein AM, weshalb es die Zellmembran nicht passiert und in der Zelle gefangen wird. Da Calcein AM ein Substrat des P-Gps ist, wird es durch Efflux an der intrazellulären Anreicherung gehindert. Substanzen, die P-Gp kompetitiv oder nichtkompetitiv inhibieren, führen zu einer Anreicherung des Calceins in der Zelle, wodurch eine höhere Fluoreszenz erreicht wird (vgl. Abbildung 3-22 F) (Bauer et al. 2003).

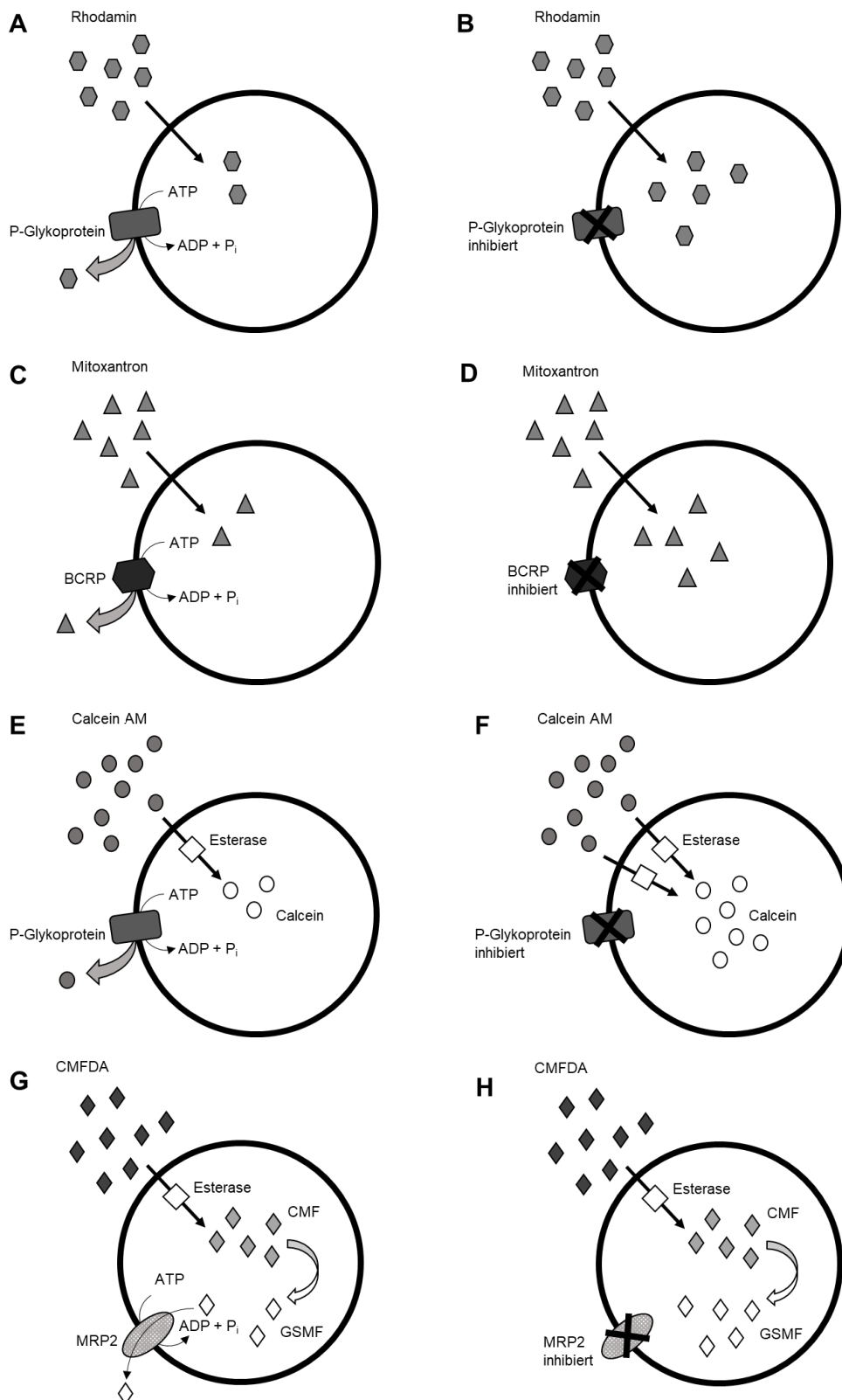


Abbildung 3-22: Prinzip der Fluoreszenz-Assays intrazelluläre Anreicherung von Rhodamin ohne (A) oder mit (B) Inhibition von P-Gp, intrazelluläre Anreicherung von Mitoxantron ohne (C) oder mit (D) Inhibition von BCRP, intrazelluläre Anreicherung von Calcein ohne (E) oder mit (F) Inhibition von P-Gp, intrazelluläre Anreicherung von GSMF ohne (G) oder mit (H) Inhibition von MRP2

CMFDA ist ein lipophiles, nicht-fluoreszierendes Derivat des Fluoresceins und permeiert durch die Zellmembran. Intrazellulär wird es durch eine unspezifische Esterase in CMF gespalten. CMF ist hydrophiler als CMTDA und weist eine sehr langsame Permeation durch die Zellmembran auf. Durch die Reaktion der Chloromethyl-Gruppe des CMFs mit intrazellulären Thiol-Gruppen, z.B. des Glutathions, entsteht GSMF, welches hydrophiler als CMF ist (vgl. Abbildung 3-23). Da GSMF ein Substrat des MRP2s ist, wird es aktiv aus der Zelle transportiert (vgl. Abbildung 3-22 G). Substanzen, die mit MRP2 interagieren, führen zu einer intrazellulären Anreicherung des GSMFs, wodurch eine höhere Fluoreszenz im Vergleich zu einer Kontrolle ohne MRP2-Inhibierung gemessen werden kann (vgl. Abbildung 3-22 H) (Förster et al. 2008).

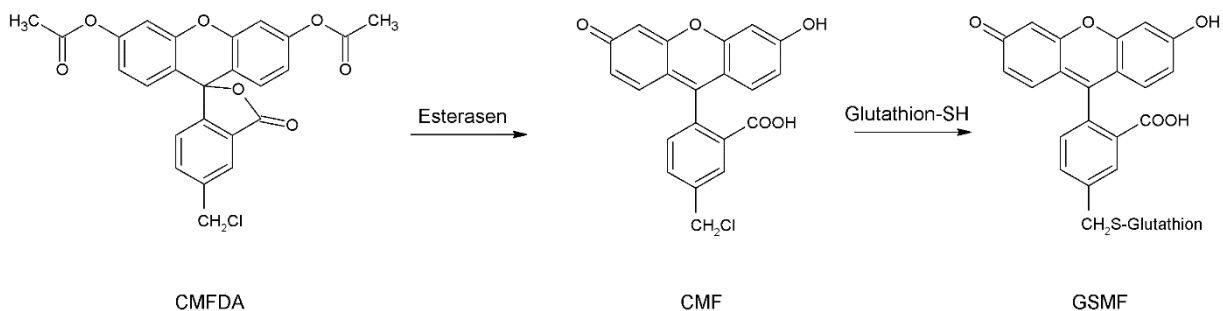


Abbildung 3-23: Struktur von CMTDA, CMF und GSMF (nach Förster et al. 2008)
 CMTDA: 5-Chloromethylfluorescein-Diacetat; CMF: 5-Chloromethylfluorescein; GSMF: Glutathion-Methylfluorescein

3.5.1 Fluoreszenz-Assays mit Caco-2/TC7 Zellen

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.10 beschrieben.

3.5.1.1 P-Gp – Calcein AM-Assay und Rhodamin-Assay

Beim Rhodamin-Assay wurde analog zum Inhibierungsassay mit Rhodamin eine Konzentration von 80 μ M verwendet und die Zellen wurden 2 h inkubiert.

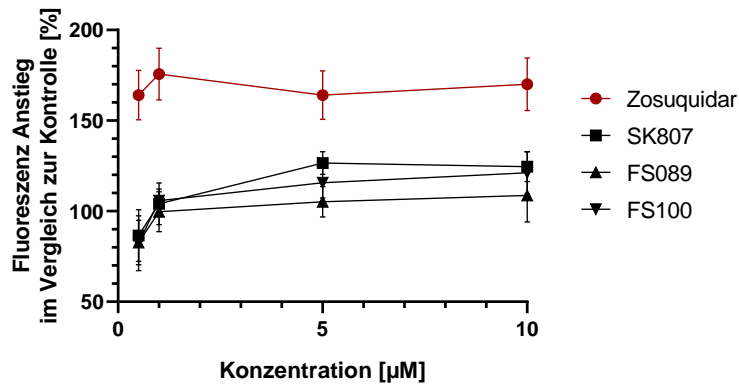


Abbildung 3-24: Rhodamin-Assay 80 µM, 35 000 Zellen/Well, 2 h
n=3 Passagen, MW ± SD

Wie in Abbildung 3-24 zu sehen, konnte sich unter Inhibierung von P-Gp durch Zosuquidar mehr Rhodamin intrazellulär anreichern, wodurch die Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle anstieg. Auch SK807 und FS089 zeigten einen geringen Effekt. Bei FS100 stieg die Fluoreszenz im Vergleich zur niedrigsten eingesetzten Konzentration an, jedoch wurde intrazellulär im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr Rhodamin angereichert.

Für den Calcein AM-Assay wurde, wie bei Bauer et al. (2003) beschrieben, zunächst eine Konzentration von 1 µM und eine Inkubation von 30 min bei einer Aussaatdichte von 35 000 Zellen/Well angewendet. Dies zeigte allerdings keine verwertbaren Ergebnisse, weshalb nachfolgend die Inkubationszeit auf 2 h und 4 h verlängert, sowie eine Aussaatdichte von 15 000 und 35 000 Zellen/Well verglichen wurden. Wäre eine Aussaatdichte von 15 000 Zellen/Well geeignet, würde dies Zeit und Materialien sparen.

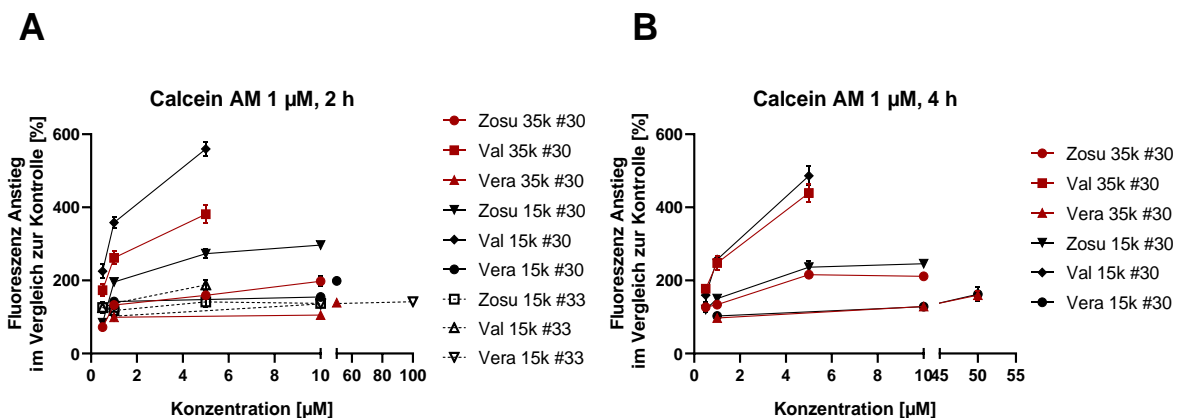


Abbildung 3-25: Calcein AM-Assay 1 µM, Vergleich 15 000 und 35 000 Zellen/Well, 2 (A) und 4 h (B) Inkubationszeit
Zosu: Zosuquidar, Val: Valspodar, Vera: Verapamil
15k: 15 000 Zellen/Well, 35k: 35 000 Zellen/Well
n=1 Passage, mind. 4 Wells, MW ± SD

Eine 2-stündige Inkubation erzielte teilweise höhere Effekte als eine 4-stündige Inkubation (Abbildung 3-25). Zudem erzielte eine Aussaatdichte von 15 000 Zellen/Well höhere Effekte (#30), die jedoch bei einer Wiederholung mit einer späteren Passage (#33) nicht reproduziert werden konnten.

Auch bei mehrmaligem Wiederholen blieb der anfangs gesehene Effekt aus. Dies könnte daran liegen, dass in den Kontroll-Wells (Calcein AM ohne zusätzliche Substanz) die Fluoreszenz signifikant erhöht war (Abbildung 3-26).

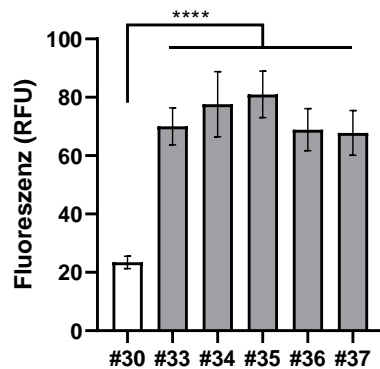


Abbildung 3-26: Vergleich der Fluoreszenzen in den Kontrollwells, 15 000 Zellen/Well
n ≥ 4 Wells, MW ± SD, ANOVA mit Dunnett-Test, ****: p ≤ 0,0001

Auch bei einem erneuten Auftauen der Zellen wurde der gleiche Effekt beobachtet.

Es wurde vermutet, dass bei einer Konzentration von 1 µM (Calcein AM) P-Gp bereits abgesättigt war, weshalb eine kürzere Inkubationszeit von 30 min getestet wurde (Abbildung 3-27).

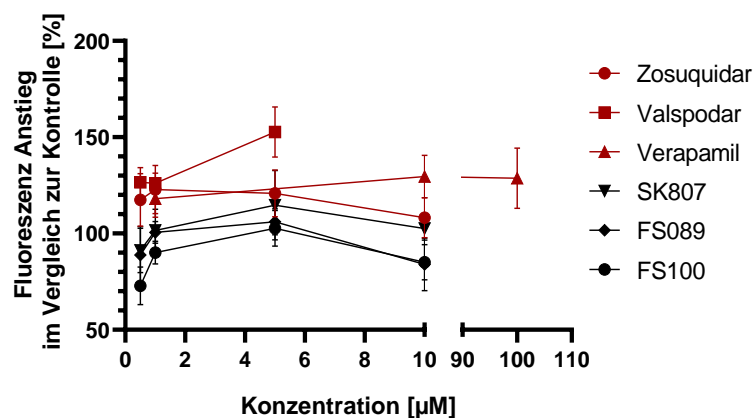


Abbildung 3-27: Calcein AM-Assay, 1 µM, 30 min, 15 000 Zellen/Well
n=3 Passagen, MW ± SD

Bei einer kürzeren Inkubationszeit konnte für Valspodar, Verapamil und Zosuquidar (≤ 5 µM) eine intrazelluläre Anreicherung von Calcein erreicht werden, jedoch fiel

dieser Effekt geringer aus als die in Abbildung 3-25 (A, #30) dargestellten. Auch für die p38 α -MAPK-Inhibitoren konnte keine Modulation von P-Gp nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz in den Kontroll-Wells war zudem erhöht. Scheinbar war P-Gp trotz kürzerer Inkubationszeit abgesättigt, weshalb eine geringere Konzentration an Calcein AM eingesetzt wurde (Abbildung 3-28).

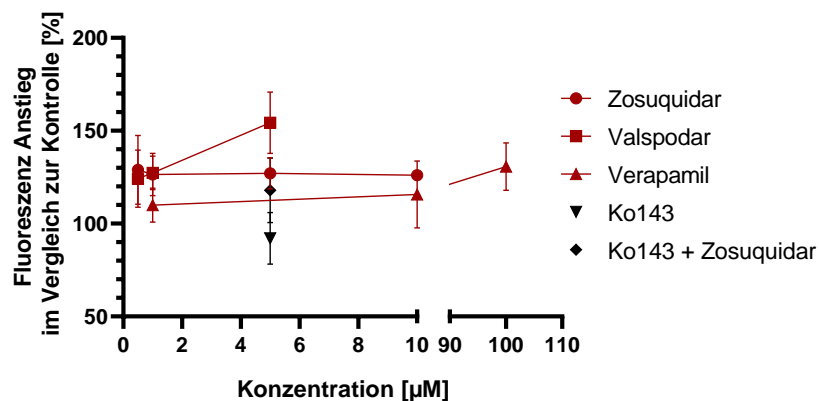


Abbildung 3-28: Calcein AM-Assay, 0,25 μM , 30 min, 15 000 Zellen/Well
n=1 Passage, mind. 4 Wells, MW \pm SD

Für Valspodar, Zosuquidar und Verapamil konnten Effekte gesehen werden, diese fielen allerdings wiederum geringer aus als in Abbildung 3-25. Die Verwendung von Ko143 führte zu keiner erhöhten intrazellulären Anreicherung von Calcein. In Kombination mit Zosuquidar konnte jedoch eine Anreicherung und folglich eine Inhibition von P-Gp erreicht werden. Dies war zu erwarten, da Ko143 BCRP inhibiert. Das System war also geeignet, jedoch schienen die Caco-2/TC7 Zellen P-Gp in sehr unterschiedlichem Ausmaß auszubilden, weshalb unterschiedliche Effekte beobachtet werden konnten. Eine Beurteilung, ob die p38 α -MAPK-Inhibitoren P-Gp modulieren, konnte somit nicht getroffen werden, weshalb der Versuch mit MDCKII MDR1-High2 Zellen, die P-Gp überexprimieren, überprüft werden sollte (siehe 3.5.2.1).

3.5.1.2 BCRP – Mitoxantron-Assay

Beim Mitoxantron-Assay wurde, wie bei Mahringer et al. (2009) beschrieben, eine Konzentration von 15 μM und eine Inkubationszeit von 60 min angewendet. Die Aussaatdichte betrug 15 000 Zellen/Well.

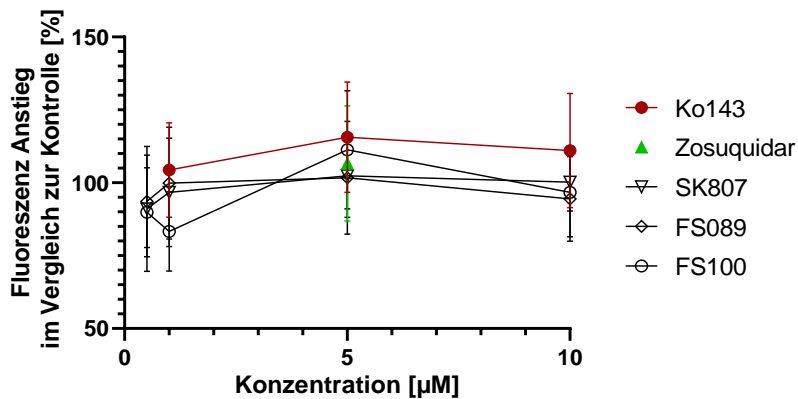


Abbildung 3-29: Mitoxantron-Assay, 15 µM, 60 min, 15 000 Zellen/Well
n=3 Passagen, MW ± SD

Zwar konnte mit Ko143 ein Effekt gesehen werden, allerdings fiel dieser im Vergleich zur Kontrolle sehr gering aus (Abbildung 3-29). Zosuquidar – eingesetzt in einer Konzentration von 5 µM – zeigte keinen Effekt. Bei FS100 konnte bei einer Konzentration von 5 µM die intrazelluläre Anreicherung von Mitoxantron erhöht werden, jedoch wurde dies bei einer Konzentration von 10 µM nicht mehr erreicht. Prinzipiell scheint dieser Assay geeignet zu sein, allerdings scheinen die Caco-2/TC7 Zellen BCRP nicht ausreichend auszubilden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Wie bereits beim Calcein AM-Assay sollte dieser Versuch nochmals mit BCRP überexprimierenden MDCKII Zellen wiederholt werden (siehe 3.5.2.2).

3.5.1.3 MRP2 – CMFDA-Assay

Der CMFDA-Assay wurde, wie bei Förster et al. (2008) beschrieben, durchgeführt. Die Aussaatdichte betrug 15 000 Zellen/Well.

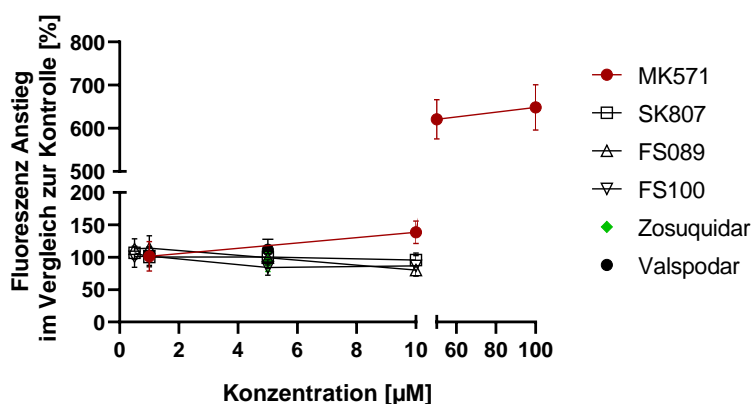


Abbildung 3-30: CMFDA-Assay, 1 µM, 90 min, 15 000 Zellen/Well
n=3 Passagen, MW ± SD

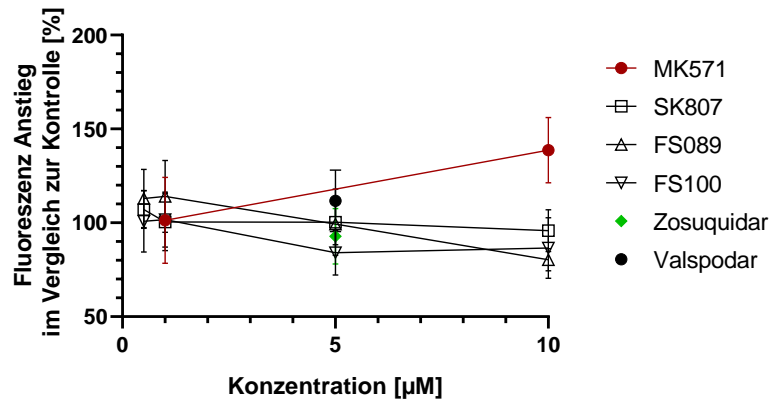


Abbildung 3-31: CMFDA-Assay, 1 µM, 90 min, 15 000 Zellen/Well, Zoom in Konzentrationsbereich Modulatoren 0-10 µM n=3 Passagen, MW ± SD

Im Gegensatz zum Calcein AM-Assay und zum Mitoxantron-Assay konnten beim CMFDA-Assay reproduzierbar hohe Effekte durch die Inhibition von MRP2 (MK571) erzielt werden (Abbildung 3-30). Die p38α-MAPK-Inhibitoren, Zosuquidar und Valspodar modulierten MRP2 nicht (Abbildung 3-31). Für die p38α-MAPK-Inhibitoren stimmten die Ergebnisse mit denen aus den Permeationsstudien überein (vgl. 3.3 und 3.4.4).

3.5.2 Fluoreszenz-Assays mit MDCKII Zellen

Da der Calcein AM-Assay und der Mitoxantron-Assay mit den Caco-2/TC7 Zellen nicht funktionierte, sollten diese Versuche mit MDCKII Zellen, die entweder P-Gp (MDCKII MDR1-High2) oder BCRP (MDCKII BCRP) überexprimieren, wiederholt werden. Die Kultivierung erfolgte wie unter 2.4 beschrieben.

3.5.2.1 P-Gp – Calcein AM-Assay

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.10 beschrieben.

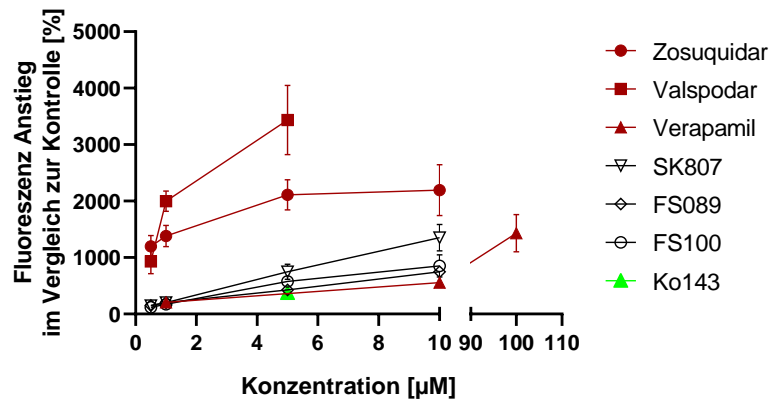


Abbildung 3-32: Calcein AM-Assay, MDCKII MDR1 High 2, 1 µM, 30 min, 15 000 Zellen/Well, n=4 Passagen, MW ± SD

Die Modulatoren Valspodar, Verapamil und Zosuquidar zeigten unter Verwendung von P-Gp überexprimierenden MDCKII Zellen deutlich höhere Effekte als die Caco-2/TC7 Zellen (vgl. Abbildung 3-27 und Abbildung 3-32). Ko143 als BCRP-Inhibitor hatte keinen Effekt auf die intrazelluläre Anreicherung von Calcein, der Versuch funktionierte folglich wie erwartet.

FS100 und FS089 zeigten in einer Konzentration von 10 µM im Vergleich zu SK807 geringere Effekte. Die mittlere effektive Konzentration würde für FS100 am niedrigsten sein, da ab einer Konzentration von 5 µM bereits eine Abflachung zu erkennen ist. Alle drei Substanzen scheinen P-Gp zu modulieren. Ob sie P-Gp inhibieren oder ein Substrat des P-Gps sind, kann aus diesen Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Da es jedoch bei der Permeation der drei Substanzen unter Inhibierung des P-Gps weder zu einer erhöhten intrazellulären Anreicherung noch zu einer erhöhten Absorption bzw. einer erniedrigten Sekretion kam (vgl. Abbildung 3-16, Abbildung 3-17, Abbildung 3-18), wird vermutet, dass FS089, FS100 und SK807 keine Substrate des P-Gps sind. Da nun mit den P-Gp überexprimierenden Zellen Effekte eindeutig erkennbar waren, wurde vermutet, dass bei den Caco-2/TC7 Zellen P-Gp in einer für den Fluoreszenz-Assay nicht ausreichender Menge gebildet wurde, weshalb dies mit einem Western Blot nochmals bestätigt werden sollte (siehe 3.6).

3.5.2.2 BCRP – Mitoxantron-Assay

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.10 beschrieben.

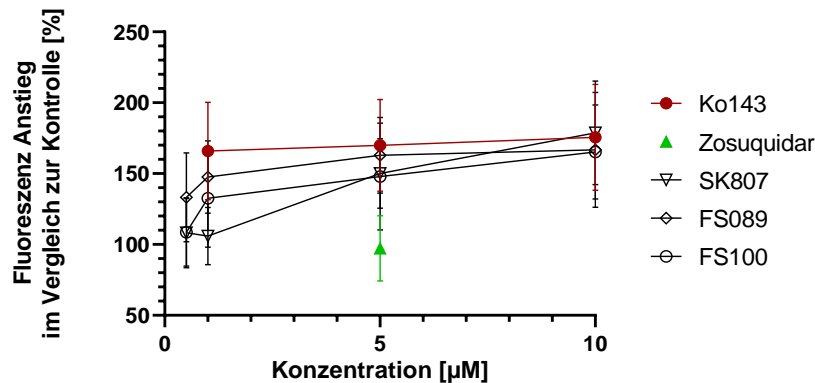


Abbildung 3-33: Mitoxantron-Assay, MDCKII BCRP, 15 µM, 60 min, 15 000 Zellen/Well
n=3 Passagen, MW ± SD

Ko143 zeigte im Vergleich zu den Versuchen mit Caco-2/TC7 Zellen höhere Effekte (vgl. Abbildung 3-29 und Abbildung 3-33). Zosuquidar führte bei einer eingesetzten Konzentration von 5 µM zu keiner höheren intrazellulären Anreicherung von Mitoxantron im Vergleich zur Kontrolle. Der Versuch funktionierte folglich wie erwartet. FS100 und FS089 führten bereits in einer Konzentration von 1 µM zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Ab einer Konzentration von 5 µM führten alle drei p38α-MAPK-Inhibitoren zu einem ähnlichen Fluoreszenz-Anstieg. Bei einer Konzentration von 10 µM zeigten sie den gleichen Effekt wie Ko143 in einer Konzentration von 10 µM. Die mittlere effektive Konzentration würde für FS089 am niedrigsten sein, gefolgt von FS100. Für SK807 würde sie für die untersuchten p38α-MAPK-Inhibitoren am höchsten sein. Ob die Substanzen Substrate oder Inhibitoren des BCRPs sind, konnte, wie bereits beim Calcein AM-Assay, nicht aus den Ergebnissen abgeleitet werden. Da allerdings unter Inhibierung von BCRP bei den Permeationsstudien es weder zu einer erhöhten intrazellulären Anreicherung der p38α-MAPK-Inhibitoren noch zu einer erhöhten Absorption bzw. erniedrigten Sekretion kam, wird vermutet, dass FS089, FS100 und SK807 keine Substrate des BCRPs sind.

Wie bereits zuvor wird vermutet, dass die Menge an gebildetem Protein des entsprechend untersuchten Transporters eine entscheidende Rolle spielt, um eine Aussage mit den Fluoreszenz-Assays treffen zu können. Deshalb sollte auch hier mittels Western Blot überprüft werden, ob die Caco-2/TC7 Zellen BCRP ausbildeten (siehe 3.6).

3.6 Überprüfung der Ausbildung von P-Gp und BCRP in Caco-2/TC7 Zellen mittels Western Blot

Da bei den Fluoreszenz-Assays mit Caco-2/TC7-Zellen für P-Gp und BCRP nur geringe Effekte durch die entsprechenden Modulatoren zu sehen waren, sollte mittels Western Blot überprüft werden, ob die Caco-2/TC7-Zellen P-Gp und BCRP ausbilden. Zum Vergleich wurden überexprimierende MDCKII-Zellen verwendet. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.11 beschrieben.

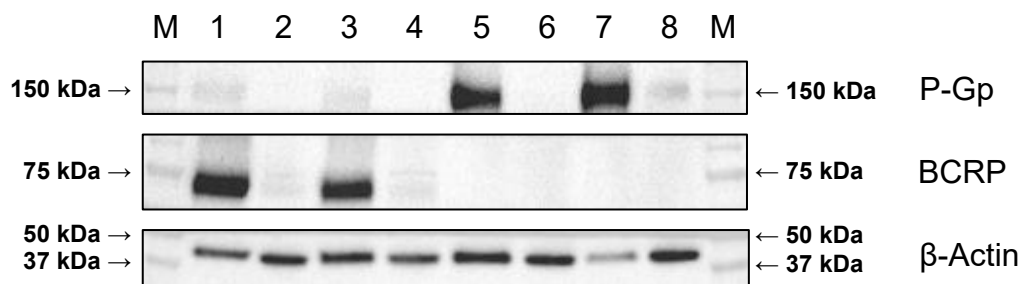


Abbildung 3-34: Western Blot Caco-2/TC7 und MDCKII MDR1-High2

M: Marker; 1: Caco-2/TC7 14-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 2: Caco-2/TC7 14-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg; 3: Caco-2/TC7 22-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 4: Caco-2/TC7 22-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg; 5: MDCKII MDR1-High2 4-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 6: MDCKII MDR1-High2 4-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg; 7: MDCKII MDR1-High2 7-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 8: MDCKII MDR1-High2 7-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg

P-Gp hat ein Molekulargewicht von 170 kDa (Juliano und Ling 1976).

In diesem Fall ist eine Bande bei ca. 150 kDa zu erkennen (Abbildung 3-34). Hierbei handelt es sich um P-Gp, da auch in der Literatur beobachtet wurde, dass je nach Zelltyp Banden unterschiedlichen Molekulargewichts durch unterschiedliche Glykosylierung resultieren (Kuteykin-Teplyakov et al. 2010; Tang et al. 2002). Zudem band der Antikörper an das Protein. Diese Bande ist bei den P-Gp überexprimierenden MDCKII Zellen (MDCKII MDR1-High2) deutlich in den Proben, bei denen das Pellet resuspendiert wurde (Abbildung 3-34, P-Gp 5 und 7), zu erkennen. Bei den Caco-2/TC7 Zellen ist ebenfalls eine Bande in den Pellet-Proben (Abbildung 3-34, P-Gp 1 und 3) sichtbar, jedoch fällt diese wesentlich schwächer aus. Die aufgetragenen Proteinmengen waren vergleichbar mit denen der MDCKII Zellen (vgl. Abbildung 3-34, β -Actin). Ein Unterschied zwischen 14 und 22 Tage bzw. 4 und 7 Tage Kultivierung ist nicht zu erkennen. Die Caco-2/TC7 Zellen exprimieren folglich P-Gp bereits ab Tag 14, jedoch in einer deutlich geringeren Menge als die P-Gp überexprimierenden MDCKII Zellen. Somit ist auch verständlich, dass beim Calcein AM-Assay die Effekte geringer ausfielen (3.5.1.1).

Die Caco-2/TC7 Zellen bildeten ebenfalls BCRP aus (vgl. Abbildung 3-34, BCRP 1 und 3). Die P-Gp überexprimierenden MDCKII Zellen hingegen bildeten wie erwartet kein humanes BCRP aus (Abbildung 3-34, BCRP 5 - 8). Die Banden bei den Caco-2/TC7 Zellen scheinen stark ausgeprägt zu sein, jedoch wurde hier die Autoscale-Funktion in Quantity One verwendet, um die Bande hervorzuheben, und zusätzlich erfolgte eine Überlagerung mit dem Marker. Ohne entsprechende Überarbeitung würde Abbildung 3-34 für P-Gp und BCRP wie Abbildung 3-35 aussehen.

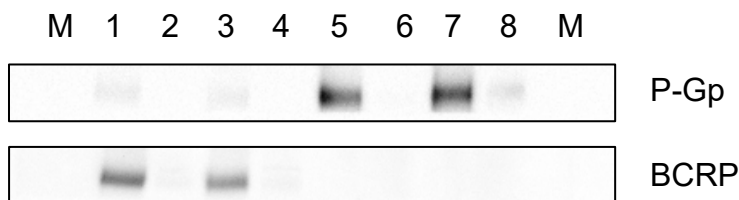


Abbildung 3-35: Western Blot Caco-2/TC7 und MDCKII MDR1-High2 ohne Autoscale und Überlagerung mit Marker

M: Marker; 1: Caco-2/TC7 14-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 2: Caco-2/TC7 14-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg; 3: Caco-2/TC7 22-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 4: Caco-2/TC7 22-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg; 5: MDCKII MDR1-High2 4-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 6: MDCKII MDR1-High2 4-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg; 7: MDCKII MDR1-High2 7-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 8: MDCKII MDR1-High2 7-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg

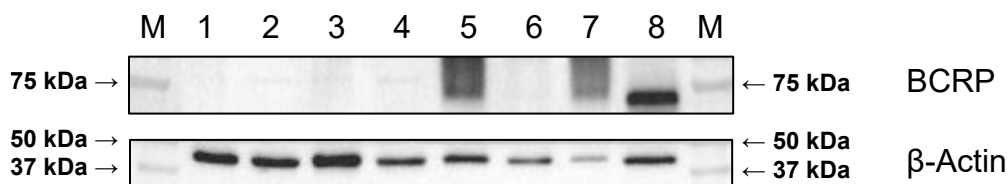


Abbildung 3-36: Western Blot Caco-2/TC7 und MDCKII BCRP

M: Marker; 1: Caco-2/TC7 14-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 2: Caco-2/TC7 14-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg; 3: Caco-2/TC7 22-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 4: Caco-2/TC7 22-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg; 5: MDCKII BCRP 4-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 6: MDCKII BCRP 4-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg; 7: MDCKII BCRP 7-tägige Kultivierung, resuspendiertes Pellet nach 10 000xg; 8: MDCKII BCRP 7-tägige Kultivierung, Überstand nach 10 000xg

Um festzustellen, ob die Caco-2/TC7 Zellen BCRP in gleicher Weise wie die BCRP überexprimierenden MDCKII Zellen ausbilden, wurden für Abbildung 3-36 in den Bahnen 1 - 4 Proben der Caco-2/TC7 und in den Bahnen 5 - 8 Proben der BCRP überexprimierenden MDCKII Zellen aufgetragen. Hierfür wurden alle Proben zuvor gleichbehandelt. Nur bei den überexprimierenden MDCKII Zellen ist eine deutliche Bande für BCRP zu erkennen (Abbildung 3-36, BCRP 8). In Bahn 5 und Bahn 7 ist die Bande nicht scharf dargestellt wie in Bahn 8. Die Ursache dafür könnte eine Lagerung der Proben unter Zusatz von DTT sein, wodurch das Protein abgebaut wurde. Leider wurde erst bei persönlicher Kommunikation in Heidelberg festgestellt, dass DTT

entgegen der Beschreibung im Paper (Mahringer et al. 2009) erst im Probenpuffer zu den Proben und nicht bereits bei der Lyse zugefügt wird. Dennoch ist zu erkennen, dass nur bei den BCRP überexprimierenden MDCKII Zellen eine ausreichende Menge an BCRP vorhanden war. Die Caco-2/TC7 Zellen exprimierten folglich weniger BCRP. Die aufgetragenen Proteinmengen waren zwischen den beiden Zelllinien vergleichbar (β -Actin). Bei den MDCKII BCRP Zellen ist zudem ein Unterschied zwischen Tag 4 und Tag 7 zu erkennen (Abbildung 3-36, BCRP 5 und 6 im Vergleich zu 7 und 8). In Bahn 8 ist eine deutliche Bande für BCRP sichtbar, die in Bahn 6 nicht zu sehen ist. Somit war in den MDCKII BCRP Proben mehr BCRP vorhanden als in den Caco-2/TC7 Proben. Dies erklärt auch, warum die Effekte beim Mitoxantron-Assay für die Caco-2/TC7 Zellen im Vergleich zu den MDCKII BCRP Zellen geringer ausfielen (vgl. 3.5.1.2 und 3.5.2.2).

Eine weitere Auswertung bezüglich eines genauen prozentualen Unterschieds zwischen den Mengen an P-Gp oder BCRP in Caco-2/TC7 oder überexprimierenden MDCKII erfolgte nicht, da dafür mehr Routine bzw. eine etablierte Methode zur Verfügung stehen sollte. Ein quantitativer Western Blot ist zudem sehr fehleranfällig (Pillai-Kastoori et al. 2020).

Eine genaue Aussage über die Konzentration der entsprechenden Proteine könnte z.B. mittels LC-MS/MS erfolgen (Ölander et al. 2016; Uchida et al. 2015).

Mit den vorliegenden Daten konnte jedoch bestätigt werden, dass die Caco-2/TC7 Zellen sowohl P-Gp als auch BCRP ausbildeten, aber in einem geringeren Ausmaß als die entsprechend überexprimierenden MDCKII Zellen.

3.7 Einfluss der p38 α -MAPK-Inhibitoren auf die Membranfluidität der Caco-2/TC7 Zellen

Da die Permeation der p38 α -MAPK-Inhibitoren sehr gering ausfiel ($P_{app} \leq 1 \times 10^{-6}$ cm/s) und sich bei Verwendung von HBSS mehr SK807 intrazellulär anreichte als bei FaSSIF/BSA, wurde vermutet, dass die p38 α -MAPK-Inhibitoren mit der Zellmembran interagieren. Dies sollte die Membranfluidität verändern. Diese Hypothese wurde durch eine Bestimmung der Anisotropie der Zellmembran in Gegenwart der p38 α -MAPK-Inhibitoren überprüft. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.12 beschrieben. Als Fluorophor wurde DPH verwendet, welches sich in den hydrophoben Bereich der Zellmembran einlagert (Rege et al. 2002). Cholesterol und Polysorbat 80 dienten als Kontrolle. Cholesterol sollte die Membran rigidisieren, die Anisotropie sollte folglich im Vergleich zur Kontrolle steigen, Polysorbat 80 sollte die Membran fluidisieren, die Anisotropie sollte folglich sinken.

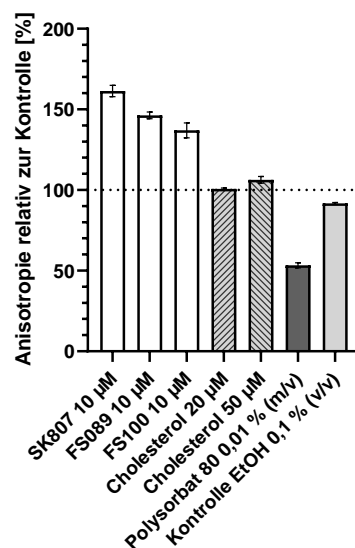


Abbildung 3-37: Ergebnisse der Membranfluiditätsmessungen
n=3 Passagen, MW \pm SD

Wie in Abbildung 3-37 zu sehen, sank die Anisotropie für Polysorbat 80 im Vergleich zur Kontrolle. Für Cholesterol konnte bei einer eingesetzten Konzentration von 50 μ M nur ein geringer Anstieg beobachtet werden. Jedoch sank die Anisotropie unter Verwendung von Ethanol. Polysorbat 80 und Ethanol (EtOH) fluidisieren die Zellmembran, wohingegen Cholesterol die Zellmembran rigidisiert. Durch die Verwendung von Ethanol in den Cholesterolproben scheint es zu einer Nivellierung der beiden gegensätzlichen Effekte von Ethanol und Cholesterol gekommen zu sein. Die beobachteten Effekte für Polysorbat 80 stimmten mit denen von Rege et al. (2002)

überein. Nur bei Cholesterol konnten nicht die gleichen hohen Effekte erzielt werden (186,6 % (Rege et al.)). Rege et al. verwendeten einen BSA-PVP-Cholesterol-Komplex, weshalb sich mehr Cholesterol in der Zellmembran anreichern konnte (Lebo und Gupta 1995). Audus et al. (1991), Hugger et al. (2002) und Reitbauer (2005) hingegen verwendeten ebenfalls Cholesterol in Ethanol und konnten – im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen – eine Erhöhung der Anisotropie im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Hugger et al. (2002) konnten eine stärkere Zunahme der Anisotropie ab einer Cholesterol-Konzentration von 47,6 μM in Caco-2 Zellen feststellen. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar bei 50 μM ebenfalls eine Zunahme der Anisotropie gesehen werden, jedoch fiel diese vergleichsweise gering aus. Da Ethanol jedoch zu einer Abnahme der Anisotropie führte, könnte möglicherweise die Ethanol-Konzentration zu hoch gewählt worden sein, sodass es zur beschriebenen Nivellierung der Effekte kam.

Für die p38 α -MAPK-Inhibitoren stieg die Anisotropie im Vergleich zur Kontrolle. Die Substanzen lagerten sich folglich in die Zellmembran ein und rigidisierten diese. Somit konnte bestätigt werden, dass die p38 α -MAPK-Inhibitoren die Membranfluidität verändern, was eine Ursache für die eingangs erwähnte geringe Permeationsrate sein kann. Zudem bestätigen die Ergebnisse, dass sich die p38 α -MAPK-Inhibitoren prinzipiell in die Zellmembran einlagern, was erklären könnte, warum bei HBSS eine höhere intrazelluläre Anreicherung bestimmt wurde als bei FaSSIF/BSA. Die Ergebnisse sagen jedoch nichts über die Menge an Wirkstoff aus, die sich in die Zellmembran einlagert, weshalb hier noch weitergehende Experimente nötig wären, um die Hypothese vollends zu belegen.

3.8 Überprüfung der Albuminbindung mittels Gleichgewichtsdialyse

Für eine weitere biopharmazeutische Charakterisierung und zur Überprüfung, ob die Sekretion der p38 α -MAPK-Inhibitoren im Vergleich zur Absorption aufgrund der Bindung an Albumin geringer ausfiel, sollte diese mittels Gleichgewichtsdialyse bestimmt werden.

Zunächst musste eine geeignete Gleichgewichtsdialyse-Einheit entwickelt und überprüft werden, bevor die Albuminbindung der p38 α -MAPK-Inhibitoren bestimmt werden konnte.

3.8.1 Theorie zur Gleichgewichtsdialyse

Bei der Gleichgewichtsdialyse handelt es sich um eine Methode, bei der nach Einstellen des Gleichgewichts die Konzentration einer Substanz in zwei Kammern (Donor und Akzeptor), die durch eine semipermeable Membran getrennt vorliegen, bestimmt wird. In der Donor-Kammer befindet sich die Substanz mit Protein. Hier liegen nach einer gewissen Zeit gebundener und ungebundener Anteil im Gleichgewicht vor. In der Akzeptor-Kammer befindet sich zu Beginn nur Puffer. Durch die Einstellung des Gleichgewichts zwischen gebundenem und ungebundenem Anteil, diffundiert die ungebundene Substanz über die Zeit in die Akzeptor-Kammer. Die Konzentration hier steht mit der Konzentration der ungebundenen Substanz in der Donor-Kammer im Gleichgewicht (Di et al. 2012, Klotz et al. 1946).

Der ungebundene Anteil kann nach Formel 3-2 und daraus der gebundene Anteil nach Formel 3-3 berechnet werden. Durch die Berechnung des ungebundenen Anteils über die finale Konzentration in der Akzeptor- und der Donor-Kammer, wird gleichzeitig die Wiederfindung und damit eine mögliche unspezifische Adsorption mit einbezogen (Di et al. 2012).

$$f_u = \frac{C_{Akzeptor}}{C_{Donor}} \quad \begin{array}{l} C_{Akzeptor}: \text{Konzentration des APIs in der Akzeptor-Kammer} \\ C_{Donor}: \text{Konzentration des APIs in der Donor-Kammer} \end{array}$$

Formel 3-2: Berechnung des ungebundenen Anteils f_u

$$f_b = 1 - f_u$$

Formel 3-3: Berechnung des an Protein gebundenen Anteils f_b

3.8.2 Validierung der entwickelten Gleichgewichtsdialyseeinheit

Die neu entwickelte Gleichgewichtsdialyseeinheit bestand, wie auch die kommerziell erhältlichen Einheiten, aus PTFE, da dadurch eine unspezifische Adsorption verringert

wird (Di et al. 2012, Howard et al. 2010). Es konnten gleichzeitig drei Messungen mit einer Einheit erfolgen. Die beiden Kammern waren durch eine Dialysemembran (MWCO 3,5 kDa) getrennt, die entsprechend zugeschnitten werden musste. Insgesamt wurden vier baugleiche Einheiten gebaut, die nachfolgend überprüft wurden.

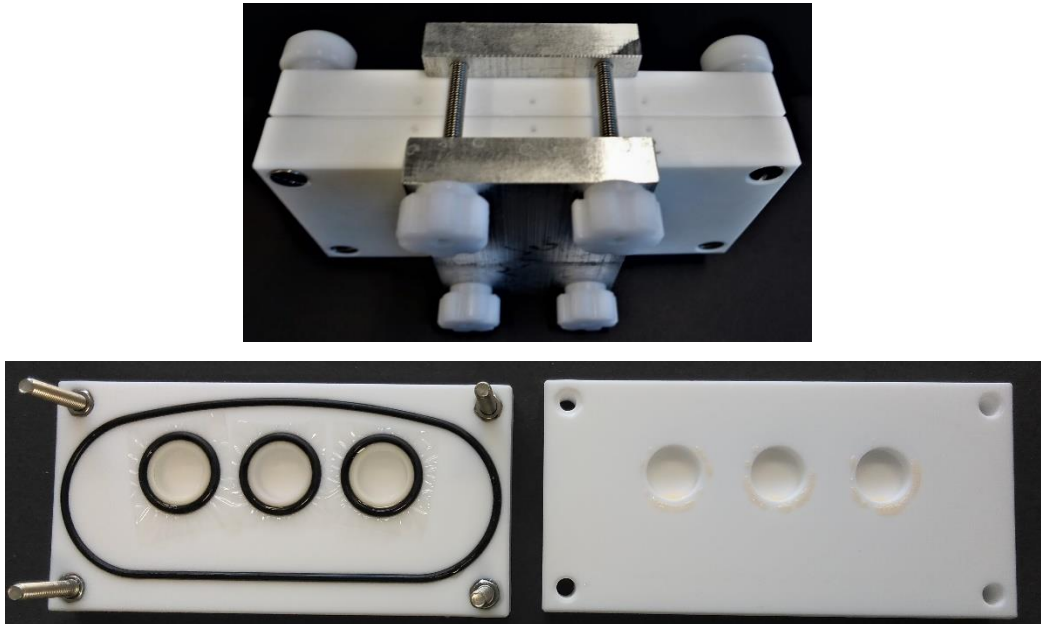


Abbildung 3-38: Gleichgewichtsdialyseeinheit
oben: zusammengeschrubt, unten: aufgeschraubt

Als Modellsubstanzen wurden Ibuprofen, Lidocain und Procain verwendet, die entsprechend eine Plasmaproteinbindung von 99 % (Kratochwil et al. 2002), 67 % (Kratochwil et al. 2002), davon 20 % an Albumin (Talevi und Quiroga 2018), bzw. 6 % (Kratochwil et al. 2002) aufweisen sollten. Es wurde BSA verwendet, da dieses auch in den Permeationsexperimenten eingesetzt wurde und überprüft werden sollte, ob eine Bindung an BSA vorliegt.

Mit Lidocain wurde zunächst überprüft, ab wann sich ein Gleichgewicht einstellte. Dazu wurden die Einheiten 2, 4, 8, 12, 16 bzw. 24 h bei 37 °C und 67 spm inkubiert. Für diesen Versuch wurden nur die BSA-Proben entsprechend 2.13.2 aufgereinigt. Die Puffer-Proben wurden direkt mittels HPLC quantifiziert. Die sonstige Durchführung erfolgte wie unter 2.13 beschrieben.

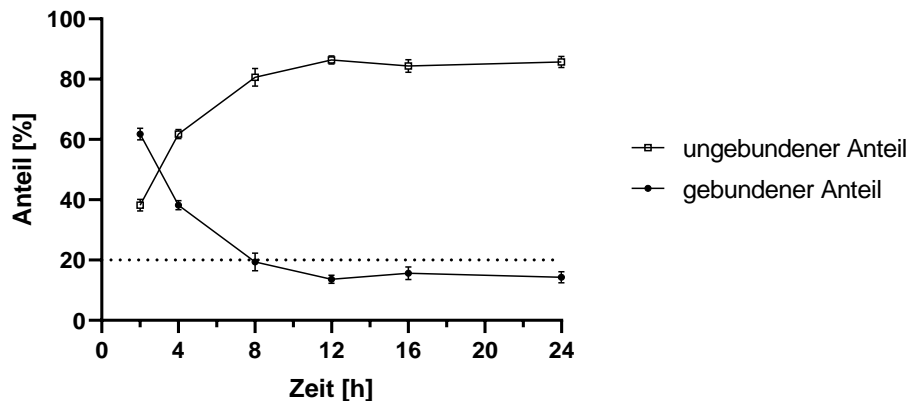


Abbildung 3-39: Albuminbindung Lidocain 100 μM , zeitlicher Verlauf
 $n=3$ Einheiten \times 3 Proben, MW \pm SD

Wie in Abbildung 3-39 zu sehen, stellte sich nach 12 h ein Gleichgewicht ein. Der gebundene Anteil lag etwas unter den in der Literatur beschriebenen 20 %. In einer Wahlpflichtarbeit wurde festgestellt, dass sich nach 8 h bei Ibuprofen bzw. Procain ein Gleichgewicht einstellte. Zusätzlich konnte kein Unterschied zwischen den vier selbstgebauten Einheiten festgestellt werden. Für die Versuche wurden alle vier Einheiten verwendet und die Ergebnisse untereinander verglichen. Eine Einheit war somit für eine Messung mit $n=3$ ausreichend.

Anschließend wurde für die drei Modellsubstanzen nochmals die Albuminbindung bestimmt. Nun wurden sowohl die BSA-Proben als auch die Puffer-Proben entsprechend 2.13.2 aufgearbeitet, um mögliche Fehler in diesem Schritt auszugleichen. Die Inkubationszeit betrug 24 h.

Tabelle 3-13: Ergebnisse Albuminbindung Ibuprofen, Lidocain und Procain jeweils 100 μM

Substanz	gebundener Anteil	Literaturwerte
Ibuprofen	94,86 \pm 0,11 %	99 %
Lidocain	15,41 \pm 2,07 %	20 %
Procain	7,81 \pm 1,32 %	6 %

$n \geq 3$, MW \pm SD

Für Ibuprofen und Lidocain lagen die ermittelten Werte etwas unter den Literaturwerten, für Procain stimmte der Wert sehr gut mit dem Literaturwert überein. Ursachen für die abweichenden Werte können die komplizierte Aufreinigung der Proben oder die Verwendung von BSA statt HSA oder Plasma sein. Der Grad der Proteinbindung ist allerdings für Tiere und Menschen oftmals ähnlich (Zeitlinger et al. 2011), was mit den vorliegenden Werten für BSA bestätigt werden konnte. Somit konnte trotz Verwendung von BSA eine gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten

erzielt werden. Da die Werte nah an den Literaturwerten lagen, wurden die selbstgebauten Einheiten für die Bestimmung der Proteinbindung als geeignet angesehen.

3.8.3 Bestimmung der Albuminbindung der p38 α -MAPK-Inhibitoren und Rhodamin

Für die Bestimmung der Albuminbindung der p38 α -MAPK-Inhibitoren FS089, FS100 und SK807 und von Rhodamin erfolgte die Durchführung wie unter 2.13 beschrieben. Die Inkubationszeit betrug 24 h.

Tabelle 3-14: Ergebnisse Albuminbindung p38 α -MAPK-Inhibitoren 10 μ M und Rhodamin 80 μ M

Substanz	gebundener Anteil	Wiederfindung
FS089	99,09 \pm 0,08 %	73,1 \pm 2,5 %
FS100	98,97 \pm 0,10 %	75,0 \pm 4,0 %
SK807	98,89 \pm 0,08 %	74,8 \pm 2,9 %
Rhodamin	57,78 \pm 1,82 %	95,4 \pm 2,2 %

n=6, MW \pm SD

Die p38 α -MAPK-Inhibitoren binden zu ca. 99 % und Rhodamin zu ca. 58 % an BSA (Tabelle 3-14). Laut Literatur sollte Rhodamin eine Plasmaproteinbindung von 70 % aufweisen (Ando et al. 2001). Da Ando et al. die Proteinbindung in Ratten überprüft hatten und in der vorliegenden Arbeit eine Überprüfung in 4 % (w/v) BSA in HBSS erfolgte, kann diese Diskrepanz auf die unterschiedlichen Methoden und die Betrachtung verschiedener Proteine zurückgeführt werden.

Die p38 α -MAPK-Inhibitoren zeigten eine extrem hohe Proteinbindung, was auch die hohen Standardabweichungen in sekretorischer Richtung bei den Permeationsstudien erklärt (vgl. 3.4.4), da geringste Unterschiede in der aktuellen Proteinbindung zur enormen Veränderung in der freien Wirkstoffkonzentration führen.

4. Diskussion

4.1 Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Klameth (2016)

Die Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen in dieser Arbeit weichen deutlich von denen von Klameth ab. Deshalb soll in diesem Kapitel der Unterschied zwischen den beiden Methoden näher betrachtet werden.

4.1.1 Wiederfindung

Die Wiederfindung für SK807 im System mit Zellen und ohne Zellen ist für die beiden Arbeiten in Tabelle 4-1 aufgelistet.

Tabelle 4-1: Vergleich der Wiederfindung für SK807 im System mit Zellen (+) und ohne Zellen (-) zwischen Klameth und der vorliegenden Arbeit

	Klameth	vorliegende Arbeit
SK (+) AP-BL	19 %	11 %
SK (+) BL-AP	40 %	50 %
SK (-) AP-BL	67 %	30 %
SK (-) BL-AP	90 %	50 %

SK: SK807; (+) Transwell mit Zellen; (-) Transwell ohne Zellen

Die Asymmetrie in der Wiederfindung zwischen den beiden Richtungen konnte bestätigt werden. Da in der vorliegenden Arbeit allerdings das basolaterale Well mit BSA vorbehandelt wurde, um die Wiederfindung in diesem Kompartiment zu erhöhen, ist es interessant, dass Klameth die gleiche Wiederfindung ohne die Verwendung von BSA erzielen konnte. Dass trotz der Vorbehandlung mit einem Albumin dennoch Adsorption auftritt, konnten auch Chan et al. (1996) beobachten.

Im System ohne Zellen lag die Wiederfindung bei Klameth in sekretorischer Richtung sogar bei ca. 90 % und in absorptiver Richtung bei 67 %. In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Wiederfindung im System ohne Zellen untersucht (vgl. Abbildung 3-10). Jedoch lag hier die Wiederfindung (Akzeptor + Donor) in sekretorischer Richtung bei ca. 50 %. In dieser Arbeit lag die Wiederfindung im unbehandelten Well für SK807 ebenfalls bei ca. 50 % (Tabelle 3-2), jedoch ist in einem Transwell zusätzlich das Insert vorhanden, an welches die Substanz adsorbieren kann, weshalb die Wiederfindung für das Transwell ohne Zellen geringer ausfallen müsste. In absorptiver Richtung lag

die Wiederfindung für das Transwell ohne Zellen bei ca. 30 %. In dieser Richtung konnte im Vergleich zum System mit Zellen zwar auch wie bei Klameth eine Steigerung erreicht werden, jedoch war im System mit Zellen im Vergleich zum System ohne Zellen der „intrazelluläre“ Anteil höher. Die Adsorption an das Insert (apikal) war im System mit Zellen oder ohne Zellen vergleichbar, weshalb der Unterschied auf die Anreicherung in bzw. an den Zellen zurückzuführen ist.

Klameth untersuchte ebenfalls das Adsorptionsverhalten der p38 α -MAPK-Inhibitoren an die Oberflächen des Transwell-Systems (vgl. Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Adsorbierte Anteile an SK807, Vergleich zwischen Klameth und der vorliegenden Arbeit

	Klameth	vorliegende Arbeit
SK (+) Insert	0,5 %	25 %
SK (+) Well	1 %	0,5 %
SK (-) PE-Membran	4 %	30 %

SK: SK807; (+) Transwell mit Zellen; (-) Transwell ohne Zellen

Der adsorbierte Anteil im Well ist für die beiden Arbeiten ähnlich. Wieso es beim Insert und der PE-Membran zu so hohen Unterschieden kam, ist fraglich. Für Well und Insert spülte Klameth diese mit Methanol nach, trocknete die Proben mittels Vakuumpumpe und nahm sie in einem geringeren Volumen Methanol wieder auf. In dieser Arbeit wurden die Oberflächen im Transwell mit ACN/H₃PO₄ nachgespült. Sowohl Methanol als auch Acetonitril verdunsten bei Raumtemperatur. Jedoch wird beim Nachspülen schnell gearbeitet, so dass die Aufkonzentrierung nur gering sein sollte. Ein Unterschied von über 20 % kann dadurch nicht zustande kommen. Die Proben der PE-Membran arbeitete Klameth mittels Gefriertrocknung und Wiederaufnahme in Methanol auf. Hierbei kann es sein, dass Klameth nicht die vollständige Menge an SK807 lösen konnte, da sie die PE-Membran zuerst mit NaOH 0,1 N versetzte. Im Basischen liegen die p38 α -MAPK-Inhibitoren nicht ionisiert vor (Abbildung 3-3), weshalb sie schlechter in Lösung gehen. Zusätzlich lag die Wiederfindung bei der Wiederaufnahme in Methanol nach der Gefriertrocknung nur bei 31 %, weshalb sie BB400 für die Proben mit SK807 als internen Standard verwendete. Jedoch beschreibt Klameth in ihrer Arbeit nicht, ob die Wiederfindung von BB400 mit der von SK807 vergleichbar ist. Zwar soll diese Verbindung strukturähnlich zu SK807 sein, ob die Wiederfindungen vergleichbar sind bleibt jedoch offen. In dieser Arbeit wurde die PE-Membran, wie bei der Bestimmung der intrazellulären Menge, mit Triton X-100, einem

starken Detergenz, behandelt (vgl. 2.5.3). 1 Teil Probe wurde mit 2 Teilen Acetonitril versetzt und mittels HPLC quantifiziert.

Ein weiterer Unterschied sind die eingesetzten Volumina im apikalen und basolateralen Kompartiment. In der vorliegenden Arbeit wurden 0,5 mL apikal und 1,5 mL basolateral eingesetzt. Klameth setzte 0,3 mL apikal und 1,0 mL basolateral ein. Die Menge an API ist dadurch geringer. Allerdings waren dadurch auch die Oberflächen, an denen das API adsorbieren kann, geringer. Die Oberfläche der PE-Membran war allerdings gleich. Da immer die gleiche Menge an Substanz an eine Oberfläche bestimmter Größe adsorbiert (Palmgrén et al. 2006), müsste die Wiederfindung an der PE-Membran bei Klameth sogar größer sein, da sich auf die initial eingesetzte Menge an SK807 bezogen wurde.

Klameth bereitete ihre Proben in HBSS pH 7,4 am Versuchstag vor und setzte eine Konzentration von 10 μM ein. In dieser Arbeit wurde allerdings festgestellt, dass bei einer Lagerung von SK807 10 μM für eine Stunde bei 37 °C die Wiederfindung im Falcon Tube nur noch ca. 50 % betrug (Abbildung 3-5). Wenn Klameth die Proben vorbereitete und direkt apikal auftrug, könnte sie eine Konzentration von 10 μM erreicht haben. Da die Proben aber normalerweise immer vortemperiert werden, dürfte die Konzentration nicht 10 μM betragen haben. Wenn nun die gleiche Menge API an die Oberflächen adsorbierte, müsste folglich der Anteil nochmals höher ausfallen, da dann die initiale Menge geringer war als in der vorliegenden Arbeit.

Die asymmetrischen Effekte bei den Wiederfindungen waren in der vorliegenden Arbeit und bei Klameth jeweils beobachtbar, jedoch unterschied sich die Wiederfindung, insbesondere hinsichtlich des an das Transwell adsorbierten Anteils. Da es durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden zu Diskrepanzen kommen kann, ist fraglich, ob viel (vorliegende Arbeit) oder wenig (Klameth) der p38 α -MAPK-Inhibitoren an das Transwell adsorbieren. Dies müsste nochmals genauer untersucht werden.

4.1.2 Permeationsstudien SK807 in HBSS

Klameth fand in ihrer Arbeit heraus, dass SK807 hauptsächlich einem Transport durch MRP2 unterlag. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in Permeationsexperimenten mit HBSS in beiden Kompartimenten untersucht.

Der P_{app} für SK807 betrug bei Klameth ca. $2,0 \times 10^{-6}$ cm/s in absorptiver Richtung und ca. $2,5 \times 10^{-6}$ cm/s in sekretorischer Richtung. In der vorliegenden Arbeit betrug der P_{app}

$6,4 \times 10^{-7}$ cm/s in absorptiver Richtung und $5,4 \times 10^{-7}$ cm/s in sekretorischer Richtung. Ein Unterschied in den apparenten Permeabilitätskoeffizienten ist nicht verwunderlich, da diese Werte oftmals zwischen Laboren nicht vergleichbar sind. Da es sich hierbei allerdings um das gleiche Labor handelte und die gleichen Zellen der gleichen Passagen verwendet wurden (vorliegende Arbeit: #30 - 38, Klameth: #28 - 37) sollte der Unterschied in den Permeabilitätskoeffizienten geringer ausfallen. Da die Werte für Rhodamin aber durchaus vergleichbar waren, sollte eine Vergleichbarkeit der Zellen gegeben sein.

Die Permeationsexperimente unterschieden sich jedoch in mehreren Details, weshalb daraus auch unterschiedliche Permeabilitätskoeffizienten resultieren könnten. Die experimentellen Unterschiede sind in Tabelle 4-3 nochmals aufgelistet.

Tabelle 4-3: Unterschiede zwischen den Permeationsexperimenten von Klameth und der vorliegenden Arbeit

Parameter	Klameth	vorliegende Arbeit
Volumen apikal	0,3 mL	0,5 mL
Volumen basolateral	1,0 mL	1,5 mL
Vorbehandlung Well	nein	ja (2 % BSA)
Aufarbeitung Proben Akzeptor und Donor	Gefriertrocknung, Wiederaufnahme in MeOH	2 Teile Probe + 1 Teil ACN/H ₃ PO ₄ (3+1)
Lyse Zellen	NaOH 0,1 N	2 % Triton X-100
Aufarbeitung Proben intrazellulär	Neutralisierung der Lyseprobe auf pH 7, Gefriertrocknung, Wiederaufnahme in MeOH	1 Teil Lyseprobe + 2 Teile Acetonitril

Die Aufarbeitung der Proben mittels Gefriertrocknung ist sehr kompliziert, wodurch die Methode eher fehleranfällig ist. Zudem erfordert die Methode den Einsatz eines internen Standards. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden verwendet, die weniger fehleranfällig sind und keinen internen Standard erfordern.

Auch wenn sich die absoluten P_{app} unterschieden, so sollten die Effekte durch Inhibition eines Transporters dennoch in beiden Arbeiten zu sehen sein. Durch die Verwendung von MK571 konnte Klameth für SK807 eine signifikante Zunahme des P_{app} in absorptiver Richtung beobachten. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 3-8 A). In sekretorischer Richtung konnte Klameth unter Inhibierung von MRP2 keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle

feststellen. Jedoch konnte sie einen höheren P_{app} im Vergleich zur Kontrolle bestimmen. Zudem war der P_{app} von SK807 ohne MK571 in sekretorischer Richtung höher als in absorptiver Richtung. In der vorliegenden Arbeit war der P_{app} von SK807 in sekretorischer Richtung niedriger als in absorptiver Richtung. Außerdem stieg der P_{app} in dieser Arbeit in sekretorischer Richtung unter Inhibierung von MRP2 im Vergleich zur Kontrolle signifikant an. In beiden Arbeiten konnte somit ein vergleichbarer Trend bezüglich der P_{app} für SK807 unter Inhibierung von MRP2 erzielt werden. Wieso bei Klameth der P_{app} in absorptiver Richtung niedriger war als in sekretorischer Richtung ist zunächst unerwartet, da die Wiederfindung im Akzeptor – wie auch in der vorliegenden Arbeit – in absorptiver Richtung größer war als in sekretorischer Richtung. Im Akzeptor konnte sie in absorptiver Richtung einen Anteil von 6 % (basolaterales Kompartiment, 1 mL) und in sekretorischer Richtung einen Anteil von 2 % (apikales Kompartiment, 0,3 mL) wiederfinden. Aus diesen Werten resultiert eine Effluxrate von 1,11. Die Effluxrate wird berechnet, indem der P_{app} in sekretorischer Richtung durch den P_{app} in absorptiver Richtung geteilt wird (Formel 2-2). Da die Zeit und die Fläche, über die das API permeiert, gleich sein sollten, kürzen sich diese Faktoren aus der Formel heraus. Die Anfangskonzentration und die Volumina in Akzeptor und Donor sind bereits in der Wiederfindung enthalten (Formel 4-1), weshalb die Wiederfindung mit dem Donorvolumen multipliziert werden muss (Formel 4-2). Wird dies auf die vorliegende Arbeit angewendet, so resultiert eine Effluxrate von 0,82. Die Wiederfindung im Akzeptor in absorptiver Richtung lag bei einem Anteil von 1,1 % und in sekretorischer Richtung bei einem Anteil von 0,3 % (Abbildung 3-9). Zwar war der Trend in der Wiederfindung vergleichbar, durch die unterschiedlichen Volumina im Permeationsexperiment errechnen sich daraus aber unterschiedliche Effluxraten.

$$WF_A = \frac{c_{A(t)} * V_A}{c_{D(0)} * V_D}$$

$c_{x(t)}$ Konzentration in Kompartiment x zum Zeitpunkt t
 V_x Volumen in Kompartiment x

Formel 4-1: Berechnung der Wiederfindung im Akzeptor

$$ER = \frac{WF_{A; BL \rightarrow AP} * V_{D; BL \rightarrow AP}}{WF_{A; AP \rightarrow BL} * V_{D; AP \rightarrow BL}}$$

Formel 4-2: Berechnung der Effluxrate über die Wiederfindung im Akzeptor

Bei Betrachtung der Effluxrate konnte Klameth durch die Inhibition von MRP2 eine signifikante Verringerung sehen, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die Effluxrate

gleich blieb. Werden die intrazellulären Mengen in absorptiver Richtung betrachtet, so konnte Klameth eine signifikante Steigerung beobachten, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die intrazelluläre Menge an SK807 unter Inhibierung von MRP2 signifikant sank (Abbildung 3-8, C). Bei Klameth lag jedoch die Wiederfindung in absorptiver Richtung in der Kontrolle bei 19 % und unter Inhibierung von MRP2 bei 62 %. Dagegen konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied zwischen der Wiederfindung in der Kontrolle und unter Inhibierung von MRP2 beobachtet werden (Abbildung 3-8, B). Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte eine unspezifische Adsorption durch MK571 sein, weshalb die Wiederfindung bei Klameth unter Inhibierung von MRP2 höher war als in der Kontrolle. Dadurch stand auch mehr SK807 für die Permeation zur Verfügung, weshalb es zu einer gesteigerten intrazellulären Anreicherung kam und der P_{app} in absorptiver Richtung höher war. In der vorliegenden Arbeit müsste dann allerdings auch die Wiederfindung unter Inhibierung von MRP2 höher sein, was aber nicht der Fall war. MK571 neigt zur unspezifischen Adsorption, was bei der Lagerung einer FS100-Lösung in Glas- und Plastikgefäßen beobachtet werden konnte (Abbildung 3-2). Allerdings wurde die Wiederfindung nur leicht erhöht. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch die P_{app} sehr gering ausfielen, kann es durchaus sein, dass durch eine leicht erhöhte Wiederfindung etwas mehr SK807 permeieren konnte und es somit zu einem signifikanten Anstieg des P_{app} kam. Für die unspezifische Adsorption und die dadurch gesteigerten P_{app} spricht zudem, dass die Effluxrate gleich blieb. Es stellt sich die Frage, wieso Klameth eine Senkung der Effluxrate beobachten konnte. Das basolaterale Kompartiment stellt eine größere Oberfläche für die Adsorption als das apikale Kompartiment. Eventuell reichte die Menge an MK571 im basolateralen Kompartiment nicht aus, um die Oberfläche dort in gleicher Weise abzusättigen wie im apikalen Kompartiment. Somit konnte im basolateralen Kompartiment mehr SK807 an die Oberflächen adsorbieren als im apikalen Kompartiment. In der vorliegenden Arbeit wurde das basolaterale Kompartiment mit BSA vorbehandelt, wodurch die Oberfläche schon stärker abgesättigt war. Somit reichte scheinbar die Menge an MK571 aus, um die Oberflächen zusätzlich in gleicher Weise wie im apikalen Kompartiment abzusättigen. Dadurch konnte im jeweiligen Akzeptorkompartiment weniger SK807 unspezifisch adsorbieren, wodurch der P_{app} unter Inhibierung von MRP2 stieg. Werden die P_{app} für SK807 in der vorliegenden Arbeit in absorptiver und sekretorischer Richtung um die adsorbierte Menge im Akzeptorkompartiment korrigiert, sind diese mit oder ohne

MK571 nahezu gleich. Dies zeigt, dass ein Anstieg des P_{app} unter Inhibierung von MRP2 auf eine unspezifische Adsorption von MK571 zurückzuführen ist (vgl. 3.3).

Klameth fand außerdem heraus, dass FS100 einem stärkeren Transport durch P-Gp unterlag. Zudem konnte sie unter gleichzeitiger Inhibierung von BCRP, MRP2 und P-Gp eine signifikante Reduktion der Effluxrate und eine erhöhte intrazelluläre Aufnahme von FS089 beobachten. Auch hier waren die Wiederfindungen unter Inhibierung der jeweiligen Transporter im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Somit sind die Ergebnisse von Klameth auf unterschiedliche Wiederfindungen durch Einsatz der Transporter-Inhibitoren zurückzuführen, da auch keine Korrektur bezüglich der Massenbilanz erfolgte.

Aufgrund von unspezifischer Adsorption ist eine Interpretation der Permeationsdaten lipophiler Substanzen schwierig (Fossati et al. 2008, Lakeram et al. 2008), weshalb die von den genannten Autoren vorgeschlagene Methode herangezogen wurde, um die unspezifische Adsorption zu verhindern und verlässlichere Ergebnisse zu erhalten.

4.2 Permeationsstudien in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)

Wie im vorangegangenen Kapitel diskutiert, ist eine Interpretation der Permeationsdaten lipophiler Substanzen, die zu unspezifischer Adsorption neigen, schwierig.

Um die Löslichkeit von APIs zu verbessern oder um unspezifische Adsorption zu verhindern, gibt es unterschiedliche Lösungsansätze.

Buckley et al. (2012) schlagen in einem Review bei Auftreten von Adsorption an die Oberflächen der Versuchsanlage vor BSA, Tenside oder biorelevantes Medium (z.B. FaSSIF) einzusetzen, die Apparatur mit BSA vorzubehandeln oder die Apparatur nach dem Versuch nachzuspülen.

Wie bereits zuvor erwähnt, führte die Vorbehandlung mit BSA nicht zu einer entsprechenden Verringerung der unspezifischen Adsorption. Durch das Nachspülen des Transwells konnte die Wiederfindung zwar insgesamt gesteigert werden, jedoch nicht auf 100 %, sondern nur auf 78 - 95 %, weshalb eine Korrektur über die Massenbilanz – insbesondere für die niedrigere Wiederfindung von 78 % – dennoch keine belastbaren Ergebnisse liefern würde.

Da Tenside, wie Cremophor EL oder Polysorbat 80, inhibierende Effekte auf Efflux-Transporter, wie BCRP, MRP2 oder P-Gp, haben (Al-Ali et al. 2019, Hugger et al. 2002, Löw 2017, Rege et al. 2001, Vasconcelos et al. 2017) wäre unter Verwendung dieser Substanzen eine Interpretation der Daten schwierig. Die in Wasser praktisch unlöslichen p38 α -MAPK-Inhibitoren könnten zudem ebenfalls mit den Tensiden interagieren, z.B. in Tensidmizellen solubilisiert werden, wodurch die Permeation verändert werden würde.

Fossati et al. (2008) und Lakeram et al. (2008) untersuchten die Verwendung von FaSSIF im apikalen und BSA im basolateralen Kompartiment für Permeationsexperimente mit Caco-2 Zellen.

Fossati et al. (2008) verwendeten FaSSIF mit 0,3 mM Natriumtaurocholat und 0,075 mM Lecithin apikal und 1 % (w/v) BSA basolateral. 4 % BSA verursachten Probleme während der LC-MS/MS-Analyse. Eine Rührgeschwindigkeit war nicht angegeben.

Lakeram et al. (2008) untersuchten systematisch den Einfluss unterschiedlicher Natriumtaurocholat- und BSA-Konzentrationen sowie die Rührgeschwindigkeit auf die Permeation von Parabenen anhand eines Box-Behnen Versuchsplans. Dadurch

konnten sie die optimalen experimentellen Bedingungen für die Permeation der Parabene vorhersagen. Die optimalen Parameter waren:

- basolaterales Kompartiment: 1,55 % BSA
- apikales Kompartiment: simulierte Darmflüssigkeit mit 3,02 mM Natriumtaurocholat und 1,51 mM Lecithin
- Rührgeschwindigkeit: 215 rpm

In der vorliegenden Arbeit wurden die Parameter für die Permeationsexperimente wie folgt gewählt:

- apikales Kompartiment: FaSSIF mit 3 mM Natriumtaurocholat und 0,75 mM Lecithin
- basolaterales Kompartiment: 4 % (w/v) BSA
- Schüttelrate: 67 spm bei 37 °C bzw. 250 rpm bei 4 °C

Die Konzentrationen von Natriumtaurocholat und Lecithin waren durch das kommerziell erhältliche FaSSIF (biorelevant.com) festgelegt. Eine Konzentration von 4 % BSA wurde gewählt, da diese der Albuminkonzentration im Blut entspricht. Die Schüttelrate für die Experimente unterschieden sich, da für 37 °C ein Schüttelwasserbad und für 4 °C ein Bioshaker verwendet wurden.

Die festgelegten Parameter waren somit nah an den *in vivo* Bedingungen.

Da die Vitalität der Zellen unter Verwendung von FaSSIF nicht beeinträchtigt war (3.4.2) und die Wiederfindung bei über 90 % lag (Abbildung 3-15 E) wurde das System für die p38 α -MAPK-Inhibitoren als geeigneter angesehen als ein Experiment mit HBSS in beiden Kompartimenten.

Bei den Permeationsexperimenten mit FaSSIF konnte eine Beteiligung der Efflux-Transporter BCRP, MRP2 und P-Gp für die p38 α -MAPK-Inhibitoren nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ingels et al. (2004) vermuteten, dass das in FaSSIF vorhandene Natriumtaurocholat einen P-Gp inhibierenden Effekt hat. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mittels Rhodamins überprüft, ob die gewählten Parameter einen Einfluss auf die Permeation desselben haben. Zwar nahm die Sekretion für Rhodamin ab (Abbildung 3-13), dies konnte allerdings auf die Albuminbindung zurückgeführt werden (vgl. 3.4.3 und 3.8.3). Durch Korrektur des P_{app} um die ungebundene Fraktion von Rhodamin konnte gezeigt werden, dass der P_{app} in HBSS und in FaSSIF/BSA in sekretorischer Richtung gleich war und FaSSIF keine P-Gp inhibierende Effekte aufweist (Abbildung 3-14).

Die Permeation war sowohl in absorptiver als auch in sekretorischer Richtung gering. Auch Frank et al. (2012) konnten durch den Einsatz von FaSSIF und BSA keine Steigerung des P_{app} bei ihren Untersuchungen mit ABT-102 feststellen. ABT-102 weist einen clogP von 5,28 auf und ist in HBSS schlecht löslich. Durch die Verwendung von FaSSIF konnten sie zwar die Löslichkeit um das 30-fache steigern, jedoch konnten sie durch Gleichgewichtsdialyse nachweisen, dass die Konzentration des „freien Arzneistoffs“, also des nicht in Mizellen eingelagerten Anteils, in Puffer und FaSSIF gleich waren. Somit könnte es analog der Fall sein, dass sich die p38 α -MAPK-Inhibitoren in die Mischmizellen einlagern und es zu keiner erhöhten Permeation durch den Einsatz von FaSSIF kommt. Ingels et al. (2004) stellten diese Vermutung ebenfalls für die von ihnen untersuchten Substanzen auf. So blieb der P_{app} in absorptiver Richtung z.B. für Digoxin, Doxorubicin und Talinolol unverändert.

Zudem vermuteten Ingels et al. (2004), dass auch der Inhibitor in Mischmizellen eingeschlossen werden könnte und somit für die Inhibition des Efflux-Transporters nicht zur Verfügung steht. Im P-Gp-Inhibierungsassay im Rahmen dieser Arbeit (3.4.3) konnte jedoch eine Inhibition von P-Gp durch Zosuquidar in FaSSIF/BSA erreicht werden, sodass die Vermutung von Ingels et al. (2004) zumindest für Zosuquidar offensichtlich nicht zutrifft.

Da sich bei den Experimenten mit FaSSIF im basolateralen Kompartiment BSA befand und die p38 α -MAPK-Inhibitoren zu 99 % an BSA binden (Tabelle 3-14), steht auch in sekretorischer Richtung nur eine geringe Menge für die Permeation zur Verfügung, was ebenfalls den dafür ermittelten geringen P_{app} erklärt.

Zusätzlich lagern sich die p38 α -MAPK-Inhibitoren in die Zellmembran ein und rigidisieren diese (3.7). So könnte es einerseits sein, dass sie zum Teil in der Zellmembran gefangen sind und nur schlecht durch die Zelle permeieren, und andererseits, dass sich die p38 α -MAPK-Inhibitoren selbst durch die Rigidisierung der Zellmembran an der Permeation hindern, indem die Diffusionsgeschwindigkeit in der Zellmembran abnimmt.

Eine weitere Möglichkeit die Beteiligung eines Efflux-Transporters zu untersuchen ist die Verkürzung der Inkubationszeit. Da sich bei einer verkürzten Inkubationszeit von 30 min noch kein intrazelluläres Gleichgewicht eingestellt hat (vgl. Abbildung 3-21), sollte hier, sofern SK807 ein Substrat der Efflux-Transporter ist, eine intrazelluläre Anreicherung zu sehen sein. Die Ergebnisse zeigten keine erhöhte intrazelluläre

Anreicherung von SK807 unter Inhibierung der Efflux-Transporter (Abbildung 3-19). Demnach konnte eine Beteiligung der Efflux-Transporter nicht nachgewiesen werden. Versuche bei 4 °C gaben jedoch Hinweise darauf, dass ein basolateral gelegener Uptake- oder Efflux-Transporter an der Permeation von SK807 beteiligt sein könnte oder die Substanzen vermehrt mit der Zellmembran interagierten (3.4.6).

Insgesamt begründen die eigenen Untersuchungsergebnisse, dass sowohl apikal als auch basolateral gelegene Efflux-Transporter einen Einfluss auf die Permeation der p38 α -MAPK-Inhibitoren haben. Ihr Effekt ist aber als eher gering einzustufen. So gehen FDA und EMA davon aus, dass bei einer Effluxrate zwischen 0,5 und 2 die passive Diffusion die Permeationsrate dominiert (FDA 2017; EMA 2020).

4.3 Beteiligung von apikal gelegenen Efflux-Transportern: Nachweis mittels Fluoreszenz-Assays

Fluoreszenz-Assays stellen eine einfache Methode dar, um festzustellen, ob Substanzen die entsprechenden Efflux-Transporter modulieren. Ein Nachteil ist jedoch, dass diese Assays keine Rückschlüsse daraufhin zulassen, ob ein API ein Substrat oder ein Inhibitor des Transporters ist.

Die Ergebnisse der durchgeführten Fluoreszenz-Assays zeigten, dass die p38 α -MAPK-Inhibitoren P-Gp und BCRP, nicht aber MRP2 modulierten (vgl. Abbildung 3-30, Abbildung 3-32 und Abbildung 3-33). Hierbei zeigte SK807 die höchste effektive Konzentration, was bedeutet, dass es unter den untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren die niedrigste Affinität zu diesen Transportern aufweist. Jedoch konnten die Effekte für P-Gp und BCRP nur in den entsprechend überexprimierenden MDCKII Zellen nachgewiesen werden. Die in den Permeationsexperimenten eingesetzten Caco-2/TC7 Zellen bildeten die Transporter zwar ebenfalls aus, allerdings in einer deutlich geringeren Menge (3.6).

Dabei ist ferner zu berücksichtigen, dass die Kultivierungsbedingungen die Expression der Efflux-Transporter beeinflussen. Im Fluoreszenz-Assay wurden die Zellen in Zellkulturplatten, direkt auf Plastik kultiviert. Bei den Permeationsstudien wurden sie hingegen auf Filtern ausgesät. Ölander et al. (2016) zeigten, dass bei Caco-2 Zellen, die auf Filtern kultiviert wurden im Vergleich zu Zellen, die auf Plastik ausgesät wurden, v.a. Proteine, die im Zusammenhang mit Metabolisierung oder Molekültransport stehen, hochreguliert waren. Für die Permeationsstudien wurden die Caco-2/TC7 Zellen hingegen auf Filtern kultiviert. Somit müsste die Expression der Efflux-Transporter dort höher gewesen sein als in den Fluoreszenz-Assays. Da in den Permeationsstudien aber keine eindeutige Beteiligung von P-Gp und BCRP nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass die modulierenden Effekte durch die p38 α -MAPK-Inhibitoren vernachlässigbar sind.

Die beobachteten Effekte in den Fluoreszenz-Assays könnten durch die Änderung der Membranfluidität durch die p38 α -MAPK-Inhibitoren verursacht worden sein. Laut Rege et al. (2002) könnte die Membranfluidität ebenfalls einen Einfluss auf die Efflux-Transporter haben. Die P-Gp umgebende Membran hat einen Einfluss auf die Stabilität des Transporters, die Bindung von ATP, die ATP-Hydrolyse, die Bindung eines APIs und den Transport eines Substrats (Sharom 2014). Für Phospholipide, die die

Membran fluidisieren, konnten jedoch keine Zusammenhänge zwischen der Membranfluidisierung und dem P-Gp-inhibierenden Effekt festgestellt werden (Weinheimer et al. 2017).

Dahingegen führte beispielsweise Vitamin E TPGS zu einer Rigidisierung der Membran, wohingegen für Polysorbat 80 und Cremophor EL eine Fluidisierung beobachtet werden konnte (Rege et al. 2002). Beide Änderungen in der Membranfluidität führten bei den genannten Substanzen auch zu einer verringerten ATPase Aktivität und einer Inhibierung von P-Gp (Vasconcelos et al. 2017). Collnot et al. (2007) vermuteten, dass die ATPase Inhibierung durch ein sterisches Abblocken der Substratbindung und/oder eine allosterische Modulierung von P-Gp verursacht wurde und nicht durch eine Rigidisierung oder Fluidisierung der Membran.

Tang et al. (2002) vermuteten, dass aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Zellmembranen sich Substrate oder Inhibitoren anders in die Zellmembranen einlagern, woraus unterschiedliche Affinitäten zu den entsprechenden Transportern, im speziellen P-Gp, resultierten.

Da die P-Gp- und BCRP-modulierenden Effekte, wie bereits erwähnt, nur für die entsprechend überexprimierenden MDCKII Zellen eindeutig zu sehen waren und in den Permeationsstudien der Einfluss durch die apikal gelegenen Efflux-Transporter auf die Permeation der p38 α -MAPK-Inhibitoren gering ausfielen, scheinen die p38 α -MAPK-Inhibitoren die apikal gelegenen Efflux-Transporter nicht in ausreichender Weise zu modulieren.

4.4 Vergleich der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen aus dem Vollblutassay

Im Vollblutassay zeigte SK807 eine gute inhibitorische Potenz mit einer IC_{50} von $0,08 \mu\text{M}$. FS089 und FS100 wiesen dagegen eine geringe inhibitorische Potenz mit einer entsprechenden IC_{50} von $200 \mu\text{M}$ und $40 \mu\text{M}$ auf (Tabelle 1-1) (Koeberle et al. 2012).

Beim Vollblutassay wurde Cremophor EL in Kombination mit Ethanol eingesetzt. Wurde der Vollblutassay mit DMSO durchgeführt, so betrug die IC_{50} für SK807 $0,468 \mu\text{M}$, für FS100 $37,8 \mu\text{M}$ und für FS089 konnte sie nicht bestimmt werden, jedoch läge sie höher als die IC_{50} von FS100 (Löw 2017). Wurden SK807 und MK571 kombiniert, so betrug die IC_{50} für SK807 $0,116 \mu\text{M}$ (Löw 2017). Zwar wurde vermutet, dass die Absenkung der IC_{50} unter Einsatz von MK571 auf eine Beteiligung von MRP2 zurückzuführen ist (Löw 2017), jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit weder bei den Permeationsstudien (vgl. 3.4.4.2) noch bei den Fluoreszenz-Assays (vgl. 3.5.1.3) ein Hinweis darauf gefunden werden, dass SK807 ein Substrat von MRP2 ist. Da MK571 zu 99,5 % an Plasmaproteine bindet (Tocco et al. 1990), könnten MK571 und SK807 um die Bindestellen konkurrieren, weshalb mehr SK807 ungebunden vorlag und dies in einer niedrigeren IC_{50} resultierte. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass SK807 zu ca. 99 % an BSA bindet (vgl. 3.8.3).

Cremophor EL inhibiert viele Transporter (Al-Ali et al. 2019, Vasconcelos et al. 2017), wie z.B. BCRP (Sawangrat et al. 2019; Xiao et al. 2016; Yamagata et al. 2007), MRP2 (Hanke et al. 2010; Xiao et al. 2016) und P-Gp (Hanke et al. 2010; Löw 2017; Rege et al. 2001; Yamagata et al. 2007). Da die Werte im Vollblutassay mit DMSO nicht stark von den Werten mit Cremophor EL abwichen, waren die Efflux-Transporter offensichtlich nicht die Ursache für die höheren IC_{50} für FS100 und FS089, obwohl die Blutzellen ebenfalls die untersuchten Efflux-Transporter BCRP, MRP2 und P-Gp ausbilden (Albermann et al. 2005, Janneh et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind somit konsistent mit den Ergebnissen aus den Vollblutassays.

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurden für die drei untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren immer ähnliche Ergebnisse erhalten. Sie unterschieden sich weder in den Permeationsraten noch in der Albuminbindung. Bei den Effluxraten wurden für SK807 und FS089 Werte unter 1 und für FS100 Werte über 1 erzielt. Sollten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Efflux-Transporter an der

Permeation beteiligt sein, hätte für FS100 im Vollblutassay ein Effekt zu sehen sein müssen, wenn Cremophor EL statt DMSO verwendet wurde. Dies war allerdings nicht der Fall.

Am isolierten Enzym p38 α zeigten die p38 α -MAPK-Inhibitoren ebenfalls vergleichbare Ergebnisse mit einer IC₅₀ von 0,01, 0,02 und 0,03 μ M (SK807, FS100, FS089) (Koeberle et al. 2012).

Die Versuche der vorliegenden Arbeit und am isolierten Enzym spiegelten jedoch nicht die Situation *in vivo* wider. Der Vollblutassay hingegen ist ein *ex vivo* Versuch. Dies zeigt, dass eine Übertragung von Ergebnissen von *in vitro* auf *in vivo* schwierig ist, da die *in vitro* Versuche die Bedingungen *in vivo* meist nur unvollständig abbilden können. Jedoch konnte mit den *in vitro* und *ex vivo* Versuchen nachgewiesen werden, dass die p38 α -MAPK-Inhibitoren durch die Efflux-Transporter P-Gp, BCRP und MRP2 an der Permeation nicht beeinflusst werden. Dahingehend ist eine Korrelation gegeben.

Für das Dihydroxypropoxy-Dibenzosuberone Skepinone-L und die entsprechenden Analoga mit der Dihydroxypropoxy-Gruppe an Position 8 oder 9 waren vergleichbare Ergebnisse zwischen dem *in vitro* Versuch am isolierten Enzym und dem *ex vivo* Versuch im verdünnten humanen Vollblut zu sehen. Skepinone-L mit der Dihydroxypropoxy-Gruppe an Position 7 zeigte *in vitro* eine IC₅₀ von 0,005 μ M und *ex vivo* eine IC₅₀ von 0,04 μ M. Ein Analogon zu Skepinone-L mit der Dihydroxypropoxy-Gruppe an Position 8 zeigte *in vitro* eine IC₅₀ von 0,03 μ M und *ex vivo* eine IC₅₀ von 10,4 μ M. Wurde die Dihydroxypropoxy-Gruppe an Position 9 des Dibenzosuberone-Derivats substituiert betrug die IC₅₀ *in vitro* 0,02 μ M, *ex vivo* dagegen 100 μ M (Koeberle et al. 2012). Die Ergebnisse sind somit vergleichbar mit SK807 (Position 7 substituiert), FS100 (Position 8 substituiert) und FS089 (Position 9 substituiert). Klameth (2016) überprüfte die Permeation von Skepinone-L und konnte dabei keine Beteiligung der Efflux-Transporter feststellen. Da für SK807, FS089 und FS100 ebenfalls keine Beteiligung der Efflux-Transporter in der vorliegenden Arbeit zu sehen war, wird vermutet, dass die abweichenden Ergebnisse zwischen *in vitro* mit isolierter p38 α MAPK und *ex vivo* im humanen Vollblut dadurch zustande kommen, dass die Affinität oder die Verweilzeit der an Position 7 substituierten Moleküle zur p38 α MAPK in der Zelle höher ist, als für die an Position 8 oder 9 substituierten Moleküle. Koeberle et al. (2011) konnten zeigen, dass für Skepinone-L durch die Dihydroxypropoxy-Gruppe eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen der terminalen Hydroxygruppe des Dihydroxypropoxy-Rests und der Carbonylgruppe des Rückgrats

von Gly110 gebildet wird. Für SK807 liegt der Donor für die Wasserstoffbrückenbindung in gleicher Distanz wie die OH-Gruppe von Skepinone-L, weshalb vermutet wurde, dass SK807 ebenfalls eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit Gly110 bildet (Koeberle et al. 2012). Für FS089 wird keine zusätzliche Wasserstoffbrücke zu Gly110 dafür aber eine zu Gly33 über den Sauerstoff im Morpholinring gebildet. Ein in Position 8 substituiertes Dibenzosuberone konnte diese zusätzliche Wasserstoffbrücke zu Gly110 ebenfalls nicht ausbilden (Koeberle et al. 2012).

Darüber hinaus sind auch noch andere Faktoren, wie z.B. die Beteiligung von Uptake-Transportern oder die Bindung an andere Blutbestandteile, als Ursache für die abweichenden Ergebnisse in Betracht zu ziehen.

Offensichtlich spielen für den Gesamtprozess insbesondere bei zellbasierten Untersuchungen sehr viele einzelne Mechanismen eine gewisse Rolle, die im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig untersucht werden konnten. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen letztlich aber zum Gesamtverständnis des komplexen Geschehens bei.

5. Zusammenfassung

Die p38 α -MAPK-Inhibitoren FS089, FS100 und SK807 wiesen Unterschiede im Enzym- und humanen Vollblutassay auf, wobei für SK807 in beiden Assays niedrige inhibitorische Konzentrationen ermittelt wurden, für FS089 und FS100 dagegen fielen die Werte im humanen Vollblutassay deutlich höher aus. Es wurde vermutet, dass spezifische Transporter, Unterschiede in den Permeationsraten oder der Plasmaproteinbindung Ursachen für die genannten Ergebnisse sein könnten (Koeberle et al. 2012).

Klameth (2016) untersuchte in ihrer Arbeit mit Caco-2/TC7 Zellen bereits die Beteiligung der apikal gelegenen Efflux-Transporter BCRP, MRP2 und P-Gp. Die Ergebnisse sollten im humanen Vollblutassay überprüft werden, jedoch wurden durch den Einsatz des Calcium-Kanal-Blockers Verapamil als P-Gp-Inhibitor falsch positive Ergebnisse erhalten (Löw 2017).

In der vorliegenden Arbeit sollte nochmals mit Caco-2/TC7 Zellen überprüft werden, ob BCRP, MRP2 und P-Gp an der Permeation der Dibenzosuberonderivate FS089, FS100 und SK807 beteiligt sind. Dazu sollte zunächst die Eignung eines alternativen P-Gp-Inhibitors zu Verapamil getestet werden. Anhand eines P-Gp-Inhibierungsassays mit Rhodamin wurde Zosuquidar in einer Konzentration von 5 μ M als geeigneter P-Gp-Inhibitor identifiziert.

Aufgrund einer niedrigen Wiederfindung der p38 α -MAPK-Inhibitoren im Transwell-System mit HBSS in beiden Kompartimenten (Klameth 2016) sollte diese Methode zunächst optimiert werden. Durch eine Vorbehandlung der Zellkulturplatte mit 2 % BSA konnte die Wiederfindung für SK807 in der Zellkulturplatte auf über 80 % gesteigert werden. Jedoch betragen die Wiederfindungen für SK807 im Transwell-System in absorptiver Richtung ca. 11 %, in sekretorischer Richtung dagegen ca. 50 %. Intrazellulär reicherten sich von der anfangs eingesetzten Menge zwischen 35,6 und 37,7 % in absorptiver und zwischen 17,4 und 20,9 % in sekretorischer Richtung an. MK571, ein MRP2-Inhibitor, hatte – im Gegensatz zu der Arbeit von Klameth (2016) – keinen erkennbaren Einfluss auf die Wiederfindung.

Zur weiteren Optimierung wurde ein Konzept von Fossati et al. (2008) und Lakeram et al. (2008) aufgegriffen und FaSSIF im apikalen und BSA im basolateralen Kompartiment verwendet. Die Wiederfindungen für SK807 konnten dadurch auf ca. 100 % im Transwell-System ohne Zellen bzw. auf über 90 % im Transwell-System mit

Zellen gesteigert werden. Für die Permeation von SK807 konnte gezeigt werden, dass sich keine signifikanten Unterschiede ergaben, wenn HBSS (AP, BL) oder FaSSIF (AP) und BSA (BL) verwendet wurden. Des Weiteren konnte ein P-Gp-inhibierender Effekt von FaSSIF ausgeschlossen werden.

Aus den Ergebnissen der Inhibierungsstudien mit den Dibenzosuberone-Derivaten konnte eine Beteiligung der apikal gelegenen Efflux-Transporter BCRP, MRP2 oder P-Gp nicht eindeutig nachgewiesen werden. Versuche bei 4 °C ließen vermuten, dass ein basolateral gelegener Efflux- oder Uptake-Transporter an der Permeation von SK807 beteiligt sein könnte.

Mittels Fluoreszenz-Assays mit Caco-2/TC7 und überexprimierenden MDCKII Zellen konnte gezeigt werden, dass die p38 α -MAPK-Inhibitoren MRP2 nicht modulierten, dafür aber P-Gp und BCRP. Die P-Gp und BCRP-modulierenden Effekte traten allerdings nur bei entsprechend überexprimierenden MDCKII Zellen auf. Ein Western Blot offenbarte, dass die Caco-2/TC7 Zellen P-Gp und BCRP in einer deutlich geringeren Menge ausbildeten als die entsprechend überexprimierenden MDCKII Zellen, was die unterschiedlichen Ergebnisse der Fluoreszenz-Assays schlüssig erklärte.

Da die Effluxraten von FS089, FS100 und SK807 zwischen 0,5 und 2 lagen, ist davon auszugehen, dass eine passive Diffusion bei der Permeation der Dibenzosuberonderivate überwiegt.

Zudem konnte für die Dibenzosuberonderivate mittels Gleichgewichtsdialyse eine sehr hohe Bindung an BSA belegt werden, die bei einer eingesetzten Konzentration von 10 μ M ca. 99 % betrug.

Die an Caco-2/TC7 Zellen ermittelten Permeationsraten der p38 α -MAPK-Inhibitoren lagen zwischen $0,7 \times 10^{-6}$ und $1,1 \times 10^{-6}$ cm/s.

Somit konnte durch die vorliegenden Untersuchungen schlüssig belegt werden, dass die untersuchten p38 α -MAPK-Inhibitoren sich weder in der Permeation, der Modulierung von BCRP, MRP2 und P-Gp, noch in der Albuminbindung stark unterscheiden und daher bisher nicht beachtete Faktoren für die Unterschiede in den IC₅₀-Werten im Enzym- und im humanen Vollblutassay verantwortlich sein müssen.

6. Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- Al-Ali AAA, Nielsen RB, Steffansen B, Holm R, Nielsen CU (2019) Nonionic surfactants modulate the transport activity of ATP-binding cassette (ABC) transporters and solute carriers (SLC): Relevance to oral drug absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 566:410–433
- Alam A, Kowal J, Broude E, Roninson I, Locher KP (2019) Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein. *Science (New York, N.Y.)* 363:753–756
- Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, Weiss J (2005) Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochemical Pharmacology* 70:949–958
- Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J, Schinkel AH (1999) The Mouse Bcrp1/Mxr/Abcp Gene: Amplification and Overexpression in Cell Lines Selected for Resistance to Topotecan, Mitoxantrone, or Doxorubicin. *Cancer Research* 59:4237–4241
- Allen JD, Loevezijn A van, Lakhai JM, Valk M van der, Tellingn O van, Reid G, Schellens JHM, Koomen G-J, Schinkel AH (2002) Potent and Specific Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Multidrug Transporter in Vitro and in Mouse Intestine by a Novel Analogue of Fumitremorgin C. *Molecular Cancer Therapeutics* 1:417–425
- Ando H, Nishio Y, Ito K, Nakao A, Wang L, Zhao YL, Kitaichi K, Takagi K, Hasegawa T (2001) Effect of endotoxin on P-glycoprotein-mediated biliary and renal excretion of rhodamine-123 in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45:3462–3467
- Artursson P, Palm K, Luthman K (2001) Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced drug delivery reviews* 46:27–43
- Audus KL, Guillot FL, Mark Braughler J (1991) Evidence for 21-aminosteroid association with the hydrophobic domains of brain microvessel endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 11:361–371
- Bandler PE, Westlake CJ, Grant CE, Cole SPC, Deeley RG (2008) Identification of regions required for apical membrane localization of human multidrug resistance protein 2. *Molecular pharmacology* 74:9–19
- Bauer B, Miller DS, Fricker G (2003) Compound Profiling for P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier Using a Microplate Screening System. *Pharmaceutical Research* Vol. 20:1170–1176
- Berben P, Brouwers J, Augustijns P (2018a) Assessment of Passive Intestinal Permeability Using an Artificial Membrane Insert System. *Journal of pharmaceutical sciences* 107:250–256

- Berben P, Bauer-Brandl A, Brandl M, Faller B, Flaten GE, Jacobsen A-C, Brouwers J, Augustijns P (2018b) Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: Overview and applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 119:219–233
- Bohnert T, Gan L-S (2013) Plasma protein binding: from discovery to development. *Journal of pharmaceutical sciences* 102:2953–2994
- Braicu C, Buse M, Busuioc C, Drula R, Gulei D, Raduly L, Rusu A, Irimie A, Atanasov AG, Slaby O, Ionescu C, Berindan-Neagoe I (2019) A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* 11. doi:10.3390/cancers11101618
- Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura J-J, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ (2003) Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes & development* 17:1969–1978
- Braun A, Hämmerle S, Suda K, Rothen-Rutishauser B, Günthert M, Krämer SD, Wunderli-Allenspach H (2000) Cell cultures as tools in biopharmacy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11:S51-S60
- Brück S, Strohmeier J, Busch D, Drozdik M, Oswald S (2017) Caco-2 cells - expression, regulation and function of drug transporters compared with human jejunal tissue. *Biopharmaceutics & drug disposition* 38:115–126
- Bruin M de, Miyake K, Litman T, Robey R, Bates SE (1999) Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer letters* 146:117–126
- Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *The Journal of biological chemistry* 271:15091–15098
- Buckley ST, Fischer SM, Fricker G, Brandl M (2012) In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: challenges and perspectives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 45:235–250
- Canovas B, Nebreda AR (2021) Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 22:346–366
- Caro I, Boulenc X, Rousset M, Meunier V, Bourrié M, Julian B, Joyeux H, Roques C, Berger Y, Zweibaum A, Fabre G (1995) Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 116:147–158
- Chan OH, Schmid HL, Kuo BS, Wright DS, Howson W, Stewart BH (1996) Absorption of Cam-2445, and NK1 neurokinin receptor antagonist: in vivo, in situ, and in vitro evaluations. *Journal of pharmaceutical sciences* 85:253–257
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37–40

- Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, Rousset M (1994) Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science* 107:213–225
- Chen C, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB (1986) Internal Duplication and Homology with Bacterial Transport Proteins in the *mdr1* (P-Glycoprotein) Gene from Multidrug-Resistant Human Cells. *Cell* 47:381–389
- Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J (2016) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer letters* 370:153–164
- Cho MJ, Thompson DP, Cramer CT, Vidmar TJ, Scieszka JF (1989) The Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Epithelial Cell Monolayer as a Model Cellular Transport Barrier. *Pharmaceutical Research* 6:71–77
- Cicenas J, Zalyte E, Rimkus A, Dapkus D, Noreika R, Urbonavicius S (2017) JNK, p38, ERK, and SGK1 Inhibitors in Cancer. *Cancers* 10:1–12
- Collnot E-M, Baldes C, Wempe MF, Kappl R, Hüttermann J, Hyatt JA, Edgar KJ, Schaefer UF, Lehr C-M (2007) Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: influence on ATPase activity and membrane fluidity. *Molecular pharmaceutics* 4:465–474
- Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal* 429:403–417
- Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773:1358–1375
- Damme K, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M (2011) Mammalian MATE (SLC47A) transport proteins: impact on efflux of endogenous substrates and xenobiotics. *Drug metabolism reviews* 43:499–523
- Dantzig AH, Shepard RL, Cao J, Law KL, Ehlhardt WJ, Baughman TM, Bumol TF, Starling JJ (1996) Reversal of P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance by a Potent Cyclopropyldibenzosuberane Modulator, LY335979. *Cancer Research* 56:4171–4179
- Dantzig AH, Shepard RL, Law KL, Tabas L, Pratt S, Gillespie JS, Binkley SN, Kuhfeld MT, Starling JJ, Wrighton SS (1999) Selectivity of the Multidrug Resistance Modulator, LY335979, for P-Glycoprotein and Effect on Cytochrome P-450 Activities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290:854–862
- Dasgupta A (2007) Usefulness of monitoring free (unbound) concentrations of therapeutic drugs in patient management. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 377:1–13
- Di L, Umland JP, Trapa PE, Maurer TS (2012) Impact of recovery on fraction unbound using equilibrium dialysis. *Journal of pharmaceutical sciences* 101:1327–1335

- Di Cagno M, Bibi HA, Bauer-Brandl A (2015) New biomimetic barrier Permeapad™ for efficient investigation of passive permeability of drugs. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 73:29–34
- Diestra JE, Scheffer GL, Català I, Maliepaard M, Schellens JHM, Scheper RJ, Germà-Lluch JR, Izquierdo MA (2002) Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *The Journal of pathology* 198:213–219
- Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD (2011) The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC cell biology* 12:43
- Ecker G, Chiba P (Hrsg) (2009) *Transporters as drug carriers; Structure, function, substrates*. WILEY-VCH-Verl., Weinheim
- EMA (1995) ICH Topic Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
- EMA (2012) Guideline on the investigation of drug interactions
- EMA (2020) ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers
- Enerson BE, Drewes LR (2003) Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences* 92:1531–1544
- English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Experimental cell research* 253:255–270
- Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *The Journal of biological chemistry* 273:1741–1748
- Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ (2013) Intestinal drug transporters: an overview. *Advanced drug delivery reviews* 65:1340–1356
- Faust D, Schmitt C, Oesch F, Oesch-Bartlomowicz B, Schreck I, Weiss C, Dietrich C (2012) Differential p38-dependent signalling in response to cellular stress and mitogenic stimulation in fibroblasts. *Cell communication and signaling : CCS* 10:6
- FDA (2017) Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry
- FDA (2020) In Vitro Drug Interaction Studies - Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions - Guidance for Industry
- Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M (2006) Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 27:80–90

- Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977a) Absence of HeLa cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 58:209–214
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977b) One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice. *Journal of the National Cancer Institute* 59:221–226
- Förster F, Volz A, Fricker G (2008) Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a fluorescent microplate assay system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69:396–403
- Fossati L, Dechaume R, Hardillier E, Chevillon D, Prevost C, Bolze S, Maubon N (2008) Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 360:148–155
- Frank KJ, Westedt U, Rosenblatt KM, Hölig P, Rosenberg J, Mägerlein M, Brandl M, Fricker G (2012) Impact of FaSSIF on the solubility and dissolution-/permeation rate of a poorly water-soluble compound. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 47:16–20
- Gao F, Liu W-J (2016) Advance in the study on p38 MAPK mediated drug resistance in leukemia. *European Review for Medical and Pharmacological Science* 20:1064–1070
- Gaush CR, Hard WL, Smith TF (1966) Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 122:931–935
- Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J (2002) MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science (New York, N.Y.)* 295:1291–1294
- Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P (1997) Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *The EMBO journal* 16:3563–3571
- Hämmerle SP, Rothen-Rutishauser B, Krämer SD, Günthert M, Wunderli-Allenspach H (2000) P-Glycoprotein in cell cultures: a combined approach to study expression, localisation, and functionality in the confocal microscope. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12:69–77
- Han J, Wu J, Silke J (2020) An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 9
- Hanke U, May K, Rozehnal V, Nagel S, Siegmund W, Weitschies W (2010) Commonly used nonionic surfactants interact differently with the human efflux transporters ABCB1 (p-glycoprotein) and ABCC2 (MRP2). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 76:260–268

- Harwood MD, Achour B, Neuhoff S, Russell MR, Carlson G, Warhurst G, Rostami-Hodjegan A (2016) In Vitro-In Vivo Extrapolation Scaling Factors for Intestinal P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein: Part II. The Impact of Cross-Laboratory Variations of Intestinal Transporter Relative Expression Factors on Predicted Drug Disposition. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 44:476–480
- Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT (1989) Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology* 96:736–749
- Highley MS, De Bruijn EA (1996) Erythrocytes and the Transport of Drugs and Endogenous Compounds. *Pharmaceutical Research* 13:186–195
- Howard ML, Hill JJ, Galluppi GR, McLean MA (2010) Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 13:170–187
- Hu M, Borchardt RT (1990) Mechanism of L- α -Methyldopa Transport Through a Monolayer of Polarized Human Intestinal Epithelial Cells (Caco-2). *Pharmaceutical Research* 7:1313–1319
- Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P (2007) Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols* 2:2111–2119
- Hugger ED, Novak BL, Burton PS, Audus KL, Borchardt RT (2002) A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro. *Journal of pharmaceutical sciences* 91:1991–2002
- Ingels F, Deferme S, Destexhe E, Oth M, van den Mooter G, Augustijns P (2002) Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *International Journal of Pharmaceutics* 232:183–192
- Ingels F, Beck B, Oth M, Augustijns P (2004) Effect of simulated intestinal fluid on drug permeability estimation across Caco-2 monolayers. *International Journal of Pharmaceutics* 274:221–232
- Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR (1999) MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *Journal of pharmaceutical sciences* 88:28–33
- Jackson SM, Manolaridis I, Kowal J, Zechner M, Taylor NMI, Bause M, Bauer S, Bartholomaeus R, Bernhardt G, Koenig B, Buschauer A, Stahlberg H, Altmann K-H, Locher KP (2018) Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. *Nature structural & molecular biology* 25:333–340
- Janneh O, Owen A, Chandler B, Hartkoorn RC, Hart CA, Bray PG, Ward SA, Back DJ, Khoo SH (2005) Modulation of the intracellular accumulation of saquinavir in peripheral blood mononuclear cells by inhibitors of MRP1, MRP2, P-gp and BCRP. *AIDS (London, England)* 19:2097–2102
- Johnson ZL, Chen J (2017) Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell* 168:1075–1085

- Joubert R, Steyn JD, Heystek HJ, Steenekamp JH, Du Preez JL, Hamman JH (2017) In vitro oral drug permeation models: the importance of taking physiological and physico-chemical factors into consideration. *Expert Opinion on Drug Delivery* 14:179–187
- Juan-Carlos P-DM, Perla-Lidia P-P, Stephanie-Talia M-M, Mónica-Griselda A-M, Luz-María T-E (2021) ABC transporter superfamily. An updated overview, relevance in cancer multidrug resistance and perspectives with personalized medicine. *Molecular biology reports* 48:1883–1901
- Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 455:152–162
- Kannan P, Telu S, Shukla S, Ambudkar SV, Pike VW, Halldin C, Gottesman MM, Innis RB, Hall MD (2011) The "specific" P-glycoprotein inhibitor Tariquidar is also a substrate and an inhibitor for breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *ACS chemical neuroscience* 2:82–89
- Kansy M, Senner F, Gubernator K (1998) Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of medicinal chemistry* 41:1007–1010
- Klameth N (2016) Permeationsmechanismus und intrazelluläre Aufnahme von p38 α -MAP-Kinase-Inhibitoren. Dissertation
- Klotz IM, Walker FM, Pivan RB (1946) The Binding of Organic Ions by Proteins. *Journal of the American Chemical Society* 68:1486–1490
- Kodan A, Futamata R, Kimura Y, Kioka N, Nakatsu T, Kato H, Ueda K (2021) ABCB1/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs. *FEBS letters* 595:707–716
- Koeberle SC, Romir J, Fischer S, Koeberle A, Schattel V, Albrecht W, Grütter C, Werz O, Rauh D, Stehle T, Laufer SA (2011) Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Nature chemical biology* 8:141–143
- Koeberle SC, Fischer S, Schollmeyer D, Schattel V, Grütter C, Rauh D, Laufer SA (2012) Design, synthesis, and biological evaluation of novel disubstituted dibenzosuberones as highly potent and selective inhibitors of p38 mitogen activated protein kinase. *Journal of medicinal chemistry* 55:5868–5877
- Krämer SD, Lombardi D, Primorac A, Thomae AV, Wunderli-Allenspach H (2009) Lipid-Bilayer Permeation of Drug-Like Compounds. *Chemistry & Biodiversity* 6:1900–1916
- Krämer SD, Aschmann HE, Hatibovic M, Hermann KF, Neuhaus CS, Brunner C, Belli S (2016) When barriers ignore the "rule-of-five". *Advanced drug delivery reviews* 101:62–74
- Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR (2002) Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochemical Pharmacology* 64:1355–1374

- Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochemical and biophysical research communications* 235:533–538
- Kuteykin-Teplyakov K, Luna-Tortós C, Ambroziak K, Löscher W (2010) Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. *British journal of pharmacology* 160:1453–1463
- Lakeram M, Lockley DJ, Pendlington R, Forbes B (2008) Optimisation of the caco-2 permeability assay using experimental design methodology. *Pharmaceutical Research* 25:1544–1551
- Laufer S, Thuma S, Peifer C, Greim C, Herweh Y, Albrecht A, Dehner F (2005) An immunosorbent, nonradioactive p38 MAP kinase assay comparable to standard radioactive liquid-phase assays. *Analytical Biochemistry* 344:135–137
- Le Ferrec E, Chesne C, Artusson P, Brayden D, Fabre G, Gires P, Guillou F, Rousset M, Rubas W, Scarino M-L (2001) In Vitro Models of the Intestinal Barrier; The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46. *ATLA* 29:649–668
- Lebo DB, Gupta PK (1995) Modulation of membrane cholesterol content in cultured LLC-PK1 cells. *International Journal of Pharmaceutics* 125:1–5
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews* 23:3–25
- Lobell M, Hendrix M, Hinzen B, Keldenich J, Meier H, Schmeck C, Schohe-Loop R, Wunberg T, Hillisch A (2006) In silico ADMET traffic lights as a tool for the prioritization of HTS hits. *ChemMedChem* 1:1229–1236
- Löw N (2017) Permeationsuntersuchungen von p38 α -MAP-Kinase-Inhibitoren im humanen Vollblut. Masterarbeit, Tübingen
- Lusvarghi S, Robey RW, Gottesman MM, Ambudkar SV (2020) Multidrug transporters: recent insights from cryo-electron microscopy-derived atomic structures and animal models [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 9
- Madkour MM, Anbar HS, El-Gamal MI (2021) Current status and future prospects of p38 α /MAPK14 kinase and its inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 213:113216
- Mahringer A, Delzer J, Fricker G (2009) A fluorescence-based in vitro assay for drug interactions with breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72:605–613
- Margutti S, Laufer SA (2007) Are MAP kinases drug targets? Yes, but difficult ones. *ChemMedChem* 2:1116–1140

- Mease K, Sane R, Podila L, Taub ME (2012) Differential selectivity of efflux transporter inhibitors in Caco-2 and MDCK-MDR1 monolayers: a strategy to assess the interaction of a new chemical entity with P-gp, BCRP, and MRP2. *Journal of pharmaceutical sciences* 101:1888–1897
- Mehvar R (2005) Teachers' Topics: Role of Protein Binding in Pharmacokinetics. *American Journal of Pharmaceutical Education* 69:1–8
- Ming X, Knight BM, Thakker DR (2011) Vectorial transport of fexofenadine across Caco-2 cells: involvement of apical uptake and basolateral efflux transporters. *Molecular pharmaceutics* 8:1677–1686
- Nakanishi T, Ross DD (2012) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chinese Journal of Cancer* 31:73–99
- Neuhoff S, Artursson P, Zamora I, Ungell A-L (2006) Impact of extracellular protein binding on passive and active drug transport across Caco-2 cells. *Pharmaceutical Research* 23:350–359
- Nosol K, Romane K, Irobalieva RN, Alam A, Kowal J, Fujita N, Locher KP (2020) Cryo-EM structures reveal distinct mechanisms of inhibition of the human multidrug transporter ABCB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117:26245–26253
- Ölander M, Wiśniewski JR, Matsson P, Lundquist P, Artursson P (2016) The Proteome of Filter-Grown Caco-2 Cells With a Focus on Proteins Involved in Drug Disposition. *Journal of pharmaceutical sciences* 105:817–827
- Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH, Pinto MM (2012) Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Current medicinal chemistry* 19:1946–2025
- Palmgrén JJ, Mönkkönen J, Korjamo T, Hassinen A, Auriola S (2006) Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 64:369–378
- Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA (2020) A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical Biochemistry* 593:113608
- Rege BD, Yu LX, Hussain AS, Polli JE (2001) Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs. *Journal of pharmaceutical sciences* 90:1776–1786
- Rege BD, Kao JP, Polli JE (2002) Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 16:237–246
- Reitbauer S (2005) Einfluss pharmazeutischer Hilfsstoffe auf die Plasmamembran von Caco-2 Zellmonolayern ermittelt durch Fluoreszenzdepolarisation. Inauguraldissertation, Basel
- Rice AJ, Park A, Pinkett HW (2014) Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 49:426–437

- Roche Diagnostics GmbH (August 2018) Cell Proliferation Reagent WST-1.
<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/cellprorobul.pdf>. Zugegriffen: 13. April 2021
- Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E, Fornace AJ, Ashwell JD (2005) Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nature immunology* 6:390–395
- Sanghvi T, Ni N, Mayersohn M, Yalkowsky S (2003) Predicting Passive Intestinal Absorption Using A Single Parameter. *QSAR Comb. Sci.* 22:247–257
- Sawangrat K, Yamashita S, Tanaka A, Morishita M, Kusamori K, Katsumi H, Sakane T, Yamamoto A (2019) Modulation of Intestinal Transport and Absorption of Topotecan, a BCRP Substrate, by Various Pharmaceutical Excipients and Their Inhibitory Mechanisms of BCRP Transporter. *Journal of pharmaceutical sciences* 108:1315–1325
- Schindler JF, Monahan JB, Smith WG (2007) p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. *Journal of dental research* 86:800–811
- Schinkel AH, Jonker JW (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced drug delivery reviews* 55:3–29
- Schmidt S, Gonzalez D, Derendorf H (2010) Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of pharmaceutical sciences* 99:1107–1122
- Schneider E, Hunke S (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS microbiology reviews* 22:1–20
- Shapiro AB, Ling V (1997) Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *European Journal of Biochemistry* 250:130–137
- Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V (1999) Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *European Journal of Biochemistry* 259:841–850
- Sharom FJ (2014) Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Frontiers in oncology* 4:1–19
- Shepard RL, Cao J, Starling JJ, Dantzig AH (2003) Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *International journal of cancer* 103:121–125
- Smith D, Artursson P, Avdeef A, Di L, Ecker GF, Faller B, Houston JB, Kansy M, Kerns EH, Krämer SD, Lennernäs H, van de Waterbeemd H, Sugano K, Testa B (2014) Passive lipoidal diffusion and carrier-mediated cell uptake are both important mechanisms of membrane permeation in drug disposition. *Molecular pharmaceutics* 11:1727–1738
- Smith DA, Di L, Kerns EH (2010) The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 9:929–939

- Talevi A, Quiroga PAM (2018) ADME Processes in Pharmaceutical Sciences; Dosage, Design, and Pharmacotherapy Success. Springer International Publishing; Imprint: Springer, Cham
- Tang F, Kazutoshi H, Borchardt RT (2002) Are MDCK Cells Transfected with the Human MDR1 Gene a Good Model of the Human Intestinal Mucosa? *Pharmaceutical Research* 19:765–772
- Taylor NMI, Manolaridis I, Jackson SM, Kowal J, Stahlberg H, Locher KP (2017) Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature* 546:504–509
- Thwaites DT, Anderson CMH (2007) H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Experimental physiology* 92:603–619
- Tocco DJ, deLuna FA, Duncan AE, Hsieh JH, Lin JH (1990) Interspecies differences in stereoselective protein binding and clearance of MK-571. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 18:388–392
- Tormählen NM, Martorelli M, Kuhn A, Maier F, Guezzuez J, Burnet M, Albrecht W, Laufer SA, Koch P (2021) Design and Synthesis of Highly Selective Brain Penetrant p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*
- Trainor GL (2007) The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* 2:51–64
- Tsukimoto M, Ohashi R, Torimoto N, Togo Y, Suzuki T, Maeda T, Kagawa Y (2015) Effects of the inhibition of intestinal P-glycoprotein on aliskiren pharmacokinetics in cynomolgus monkeys. *Biopharmaceutics & drug disposition* 36:15–33
- Turco L, Catone T, Caloni F, Di Consiglio E, Testai E, Stamatii A (2011) Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology in Vitro* 25:13–20
- Uchida Y, Ohtsuki S, Kamiie J, Ohmine K, Iwase R, Terasaki T (2015) Quantitative targeted absolute proteomics for 28 human transporters in plasma membrane of Caco-2 cell monolayer cultured for 2, 3, and 4 weeks. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 30:205–208
- Vaessen SFC, van Lipzig MMH, Pieters RHH, Krul CAM, Wortelboer HM, van de Steeg E (2017) Regional Expression Levels of Drug Transporters and Metabolizing Enzymes along the Pig and Human Intestinal Tract and Comparison with Caco-2 Cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 45:353–360
- Vasconcelos T, Marques S, Sarmiento B (2017) The biopharmaceutical classification system of excipients. *Therapeutic delivery* 8:65–78
- Weinheimer M, Fricker G, Burhenne J, Mylius P, Schubert R (2017) The application of P-gp inhibiting phospholipids as novel oral bioavailability enhancers - An in vitro and in vivo comparison. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 108:13–22
- Wilkens S (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime reports* 7:14

- Wissel G, Deng F, Kudryavtsev P, Ghemtio L, Wipf P, Xhaard H, Kidron H (2017) A structure-activity relationship study of ABCC2 inhibitors. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 103:60–69
- Xiao L, Yi T, Chen M, Lam CWK, Zhou H (2016) A new mechanism for increasing the oral bioavailability of scutellarin with Cremophor EL: Activation of MRP3 with concurrent inhibition of MRP2 and BCRP. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 93:456–467
- Yamagata T, Kusuhara H, Morishita M, Takayama K, Benameur H, Sugiyama Y (2007) Effect of excipients on breast cancer resistance protein substrate uptake activity. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 124:1–5
- Zeitlinger MA, Derendorf H, Mouton JW, Cars O, Craig WA, Andes D, Theuretzbacher U (2011) Protein binding: do we ever learn? *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55:3067–3074
- Zeng H, Chen Z-S, Belinsky MG, Rea PA, Kruh GD (2001) Transport of Methotrexate (MTX) and Folates by Multidrug Resistance Protein (MRP) 3 and MRP1: Effect of Polyglutamylation on MTX Transport. *Cancer Research* 61:7225–7232
- Zhang H, Xu H, Ashby CR, Assaraf YG, Chen Z-S, Liu H-M (2021) Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp). *Medicinal research reviews* 41:525–555

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Bindemodus von Skepinone-L in der ATP-Bindetasche der p38 α MAPK (Tormählen et al. 2021).....	4
Abbildung 1-2: Struktur der Dibenzosuberonderivate (nach Koeberle et al. 2012)	5
Abbildung 1-3: Permeation über die Zellmembran	7
Abbildung 1-4: Der „twist-and-squeeze“ Mechanismus für den Export hydrophober Substanzen durch P-Gp (aus Kodan et al. 2021).....	13
Abbildung 1-5: Struktur von P-Gp mit zwei Zosuquidar-Molekülen (aus Alam et al. 2019).....	14
Abbildung 1-6: Struktur von BCRP (ABCG2) (modifiziert nach Taylor et al. 2017)	17
Abbildung 1-7: Topologie der ABC-Transporter P-Gp (A), MRP2 (B) und BCRP (C) (aus Chen et al. 2016)	18
Abbildung 3-1: Ergebnis P-Gp-Inhibierungsassay mit Rhodamin	55
Abbildung 3-2: Wiederfindung von FS100 10 μ M gelöst in HBSS in Plastik- oder Glasgefäßen nach Lagerung bei 4 $^{\circ}$ C oder 37 $^{\circ}$ C	57
Abbildung 3-3: Ionisationsgrad des Morpholinoethoxy-Substituenten ($pK_s=5,76$)	58
Abbildung 3-4: Wiederfindung FS100 in HBSS mit Acetonitril und Phosphorsäure in unterschiedlichen Konzentrationen in HPLC-Vials über die Zeit.....	59
Abbildung 3-5: Wiederfindung p38-MAPK-Inhibitoren in Plastikgefäßen bei unterschiedlichen pH-Werten	61
Abbildung 3-6: Wiederfindung SK807 Zellkulturplatte, vorbehandelt (BSA, Medium) bzw. unbehandelt (Blank)	63
Abbildung 3-7: Kalibrierkurven SK807 0,5-8,3 μ M initial und final.....	64
Abbildung 3-8: SK807 Inhibitionsstudien in HBSS	66
Abbildung 3-9: Massenbilanz Inhibitionsstudien SK807 in HBSS	68
Abbildung 3-10: Massenbilanz Inhibitionsstudien SK807 in HBSS inkl. adsorbierte Mengen.....	69
Abbildung 3-11: Spaltung des WST-1 zu Formazan	74
Abbildung 3-12: Ergebnis WST-1 Assay Caco-2/TC7	74
Abbildung 3-13: P-Gp-Inhibierungsassay mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) im Vergleich zu HBSS (AP, BL)	75
Abbildung 3-14: P-Gp-Inhibierungsassay mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) im Vergleich zu HBSS (AP, BL) unter Berücksichtigung der ungebundenen Fraktion.....	76
Abbildung 3-15: Vergleich Permeationsraten (A, B), intrazelluläre Anreicherung (C, D) und Massenbilanz (E) für SK807 mit oder ohne MK571 in HBSS (AP, BL) oder FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	78
Abbildung 3-16: Inhibierungsstudie SK807 10 μ M 37 $^{\circ}$ C, 2 h in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL).....	81
Abbildung 3-17: Inhibierungsstudie FS089 10 μ M 37 $^{\circ}$ C, 2 h in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL).....	83
Abbildung 3-18: Inhibierungsstudie FS100 10 μ M 37 $^{\circ}$ C, 2 h in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL).....	84
Abbildung 3-19: intrazelluläre Anreicherung SK807 37 $^{\circ}$ C, 30 min in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL) 85	
Abbildung 3-20: intrazelluläre Anreicherung SK807 4 $^{\circ}$ C, 2 h in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	86

Abbildung 3-21: Vergleich intrazelluläre Anreicherung SK807 10 µM 37 °C und 4 °C in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	87
Abbildung 3-22: Prinzip der Fluoreszenz-Assays	91
Abbildung 3-23: Struktur von CMFDA, CMF und GSMF (nach Förster et al. 2008)	92
Abbildung 3-24: Rhodamin-Assay 80 µM, 35 000 Zellen/Well, 2 h	93
Abbildung 3-25: Calcein AM-Assay 1 µM, Vergleich 15 000 und 35 000 Zellen/Well, 2 (A) und 4 h (B) Inkubationszeit	93
Abbildung 3-26: Vergleich der Fluoreszenzen in den Kontrollwells, 15 000 Zellen/Well.....	94
Abbildung 3-27: Calcein AM-Assay, 1 µM, 30 min, 15 000 Zellen/Well	94
Abbildung 3-28: Calcein AM-Assay, 0,25 µM, 30 min, 15 000 Zellen/Well	95
Abbildung 3-29: Mitoxantron-Assay, 15 µM, 60 min, 15 000 Zellen/Well.....	96
Abbildung 3-30: CMFDA-Assay, 1 µM, 90 min, 15 000 Zellen/Well	96
Abbildung 3-31: CMFDA-Assay, 1 µM, 90 min, 15 000 Zellen/Well, Zoom in Konzentrationsbereich Modulatoren 0-10 µM	97
Abbildung 3-32: Calcein AM-Assay, MDCKII MDR1 High 2, 1 µM, 30 min, 15 000 Zellen/Well.....	98
Abbildung 3-33: Mitoxantron-Assay, MDCKII BRCP, 15 µM, 60 min, 15 000 Zellen/Well	99
Abbildung 3-34: Western Blot Caco-2/TC7 und MDCKII MDR1-High2	100
Abbildung 3-35: Western Blot Caco-2/TC7 und MDCKII MDR1-High2 ohne Autoscale und Überlagerung mit Marker.....	101
Abbildung 3-36: Western Blot Caco-2/TC7 und MDCKII BCRP	101
Abbildung 3-37: Ergebnisse der Membranfluiditätsmessungen	103
Abbildung 3-38: Gleichgewichtsdialyseeinheit.....	106
Abbildung 3-39: Albuminbindung Lidocain 100 µM, zeitlicher Verlauf.....	107
Abbildung 7-1: Probenaufbereitung im HPLC-Vial, FS100 in HBSS mit oder ohne Zugabe von H ₃ PO ₄	144

6.3 Formelverzeichnis

Formel 2-1: Berechnung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten	36
Formel 2-2: Berechnung der Effluxrate	36
Formel 2-3: Berechnung der Wiederfindung Permeationsexperimente	36
Formel 2-4: Berechnung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)	38
Formel 2-5: Berechnung der Anisotropie	51
Formel 3-1: Berechnung der ungebundenen Konzentration	76
Formel 3-2: Berechnung des ungebundenen Anteils f_u	105
Formel 3-3: Berechnung des an Protein gebundenen Anteils f_b	105
Formel 4-1: Berechnung der Wiederfindung im Akzeptor	113
Formel 4-2: Berechnung der Effluxrate über die Wiederfindung im Akzeptor.....	113

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Inhibitionsdaten der Dibenzosuberone (aus Koeberle et al. 2012)	5
Tabelle 1-2: Physikochemische Parameter für die transzelluläre Permeation (Joubert et al. 2017; Lobell et al. 2006).....	7
Tabelle 2-1: Konzentrationen der Stammlösungen der verwendeten Inhibitoren in DMSO	21
Tabelle 2-2: verwendete Chemikalien und Substanzen	21
Tabelle 2-3: verwendete Materialien und Geräte	25
Tabelle 2-4: verwendete Software.....	28
Tabelle 2-5: HPLC-Gradient für die Quantifizierung der p38 α -MAPK-Inhibitoren.....	32
Tabelle 2-6: Kultivierung der Caco-2/TC7 Zellen, Aussaatdichte und Zeitraum	34
Tabelle 2-7: Kultivierung der MDCKII MDR1-High2 und MDCKII BCRP Zellen, Aussaatdichte und Zeitraum	35
Tabelle 2-8: Quantifizierungsmethode Fluorescein-Natrium für Platerader BioTek Synergy HT	38
Tabelle 2-9: Quantifizierungsmethode Rhodamin für Platerader BioTek Synergy HT.....	41
Tabelle 2-10: Zusammensetzung FaSSIF (biorelevant.com).....	43
Tabelle 2-11: Versuchsaufbau Wiederfindung Transwell, FaSSIF/4 % BSA.....	44
Tabelle 2-12: Versuchslösungen für WST-1 Assay.....	45
Tabelle 2-13: Übersicht Permeationsstudien p38 α -MAPK-Inhibitoren mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	47
Tabelle 2-14: Parameter für die Fluoreszenz-Assays	48
Tabelle 2-15: verwendete Primär- und Sekundäntikörper	50
Tabelle 2-16: HPLC-Gradient für die Quantifizierung der p38 α -MAPK-Inhibitoren.....	53
Tabelle 3-1: Stabilität Cocktails mit p38 α -MAPK-Inhibitoren im HPLC-Vial bei Zusatz von 25 % (v/v) ACN und 7,1 % (v/v) H ₃ PO ₄	60
Tabelle 3-2: Wiederfindung SK807 10 μ M in Zellkulturplatten, vorbehandelt oder unbehandelt.....	62
Tabelle 3-3: Ergebnisse Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte am Beispiel SK807	64
Tabelle 3-4: Wiederfindung Proben final berechnet anhand der Kalibrierung der initialen Proben	65
Tabelle 3-5: Kalibrierung SK807 in ACN/H ₃ PO ₄ /HBSS (25 % (v/v), 7,1 % (v/v), 67,9 % (v/v)) nach EMA (1995)	65
Tabelle 3-6: P _{app} und Effluxrate für SK807 ohne bzw. mit MK571 in HBSS (AP, BL) ohne Einbezug der adsorbierten Mengen an SK807	70
Tabelle 3-7: P _{app} und Effluxrate für SK807 ohne bzw. mit MK571 in HBSS (AP, BL) unter Einbezug der adsorbierten Mengen an SK807	70
Tabelle 3-8: Wiederfindung SK807 in einem Permeationsexperiment ohne Zellen mit FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL).....	73
Tabelle 3-9: Vergleich des Anteils an SK807 im Akzeptor bei Verwendung von HBSS (AP, BL) oder FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	79
Tabelle 3-10: Effluxraten SK807 10 μ M Inhibierungsstudien in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	81
Tabelle 3-11: Effluxraten FS089 10 μ M Inhibierungsstudien in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	83

Tabelle 3-12: Effluxraten FS100 10 μM Inhibierungsstudien in FaSSIF (AP) und 4 % BSA (BL)	85
Tabelle 3-13: Ergebnisse Albuminbindung Ibuprofen, Lidocain und Procain jeweils 100 μM	107
Tabelle 3-14: Ergebnisse Albuminbindung p38 α -MAPK-Inhibitoren 10 μM und Rhodamin 80 μM	108
Tabelle 4-1: Vergleich der Wiederfindung für SK807 im System mit Zellen (+) und ohne Zellen (-) zwischen Klameth und der vorliegenden Arbeit.....	109
Tabelle 4-2: Adsorbierte Anteile an SK807, Vergleich zwischen Klameth und der vorliegenden Arbeit.....	110
Tabelle 4-3: Unterschiede zwischen den Permeationsexperimenten von Klameth und der vorliegenden Arbeit.....	112
Tabelle 7-1: Ergebnisse Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte am Beispiel FS089	145
Tabelle 7-2: Ergebnisse Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte am Beispiel FS100	145
Tabelle 7-3: Kalibrierdaten p38 α -MAPK-Inhibitoren nach EMA (1995)	146
Tabelle 7-4: Kalibrierdaten Ibuprofen, Lidocain, Procain nach EMA (1995)	147

7. Anhang

7.1 Probenaufbereitung im HPLC-Vial, FS100 in HBSS

Zu einer Kontrollprobe mit FS100 10 μM wurden unterschiedliche Mengen 85 %-iger Phosphorsäure gegeben und die Proben mittels HPLC (2.3) über einen Zeitraum von 18,75 h quantifiziert. Die erste Injektion wurde als 100 % gesetzt.

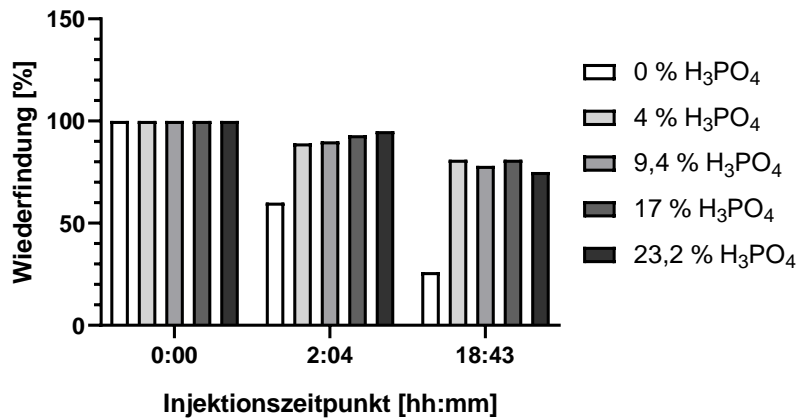


Abbildung 7-1: Probenaufbereitung im HPLC-Vial, FS100 in HBSS mit oder ohne Zugabe von H₃PO₄
n=1

Wie in Abbildung 7-1 zu sehen, führt eine Zugabe von Phosphorsäure zu einer höheren Wiederfindung auch nach 18,75 h, jedoch beträgt diese nicht 100 %. FS100-Proben in HBSS mit H₃PO₄ konnten somit nicht im HPLC-Vial gelagert werden.

7.2 Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption an Zellkulturplatten, Ergebnisse FS089 und FS100

Tabelle 7-1: Ergebnisse Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte am Beispiel FS089

Probe	Bereich [μM]	R ²	LOD [μM]	LOQ [μM]
Vorverdünnung	5,0 - 100	0,9955	11,0	33,4
Vorverdünnung	5,0 - 83	0,9967	8,50	25,8
initial	0,50 - 10	0,9952	1,15	4,41
initial	0,50 - 8,3	0,9954	1,08	3,27
final	0,50 - 10	0,9837	2,39	7,23
final	0,50 - 8,3	0,9923	1,02	3,09

Vorverdünnung: 10-fache Konzentration in 0,9 % NaCl, pH 4,1

initial: Probe nach Zugabe der Vorverdünnung

final: Probe nach 2 h Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad (67 spm)

Tabelle 7-2: Ergebnisse Überprüfung der Methode zur Verringerung der Adsorption in der Zellkulturplatte am Beispiel FS100

Probe	Bereich [μM]	R ²	LOD [μM]	LOQ [μM]
Vorverdünnung	5,0 - 100	0,9881	13,0	39,5
Vorverdünnung	5,0 - 83	0,9964	9,92	30,1
initial	0,50 - 10	0,9758	2,34	7,08
initial	0,50 - 8,3	0,9873	1,35	4,10
final	0,50 - 10	0,9934	2,01	6,10
final	0,50 - 8,3	0,9960	1,13	3,43

Vorverdünnung: 10-fache Konzentration in 0,9 % NaCl, pH 4,1

initial: Probe nach Zugabe der Vorverdünnung

final: Probe nach 2 h Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad (67 spm)

7.3 Kalibrierung p38 α -MAPK-Inhibitoren

Tabelle 7-3: Kalibrierdaten p38 α -MAPK-Inhibitoren nach EMA (1995)

Substanz	Medium	Bereich [μM]	R²	LOD [μM]	LOQ [μM]
FS089	FaSSIF	0,16 - 1,1	0,9996	0,04	0,12
FS089	FaSSIF	1,1 - 11,0	0,9999	0,56	1,69
FS089	4 % BSA/HBSS	0,16 - 1,1	0,9994	0,08	0,25
FS089	4 % BSA/HBSS	1,1 - 11,0	0,9996	0,60	1,81
FS100	FaSSIF	0,16 - 1,1	0,9987	0,12	0,35
FS100	FaSSIF	1,1 - 11,0	0,9995	1,22	3,69
FS100	4 % BSA/HBSS	0,16 - 1,1	0,9994	0,13	0,40
FS100	4 % BSA/HBSS	1,1 - 11,0	0,9996	1,24	3,75
SK807	FaSSIF	0,16 - 1,1	0,9986	0,07	0,20
SK807	FaSSIF	1,1 - 11,0	0,9995	0,55	1,67
SK807	4 % BSA/HBSS	0,16 - 1,1	0,9993	0,07	0,23
SK807	4 % BSA/HBSS	1,1 - 11,0	0,9992	0,48	1,46

Aufbereitung der BSA-Proben nach 2.8.2.1

7.4 Kalibrierung Ibuprofen, Lidocain, Procain

Tabelle 7-4: Kalibrierdaten Ibuprofen, Lidocain, Procain nach EMA (1995)

Substanz	HPLC-Methode	Bereich [μM]	R^2	LOD [μM]	LOQ [μM]
Ibuprofen	Gradient	0,74 - 7,4	0,9998	0,35	1,07
Ibuprofen	Gradient	11,0 - 110	0,9989	5,70	17,27
Lidocain	isokratisch	1,58 - 15,8	0,9770	2,33	7,06
Lidocain	isokratisch	11,0 - 110	0,9991	3,70	11,21
Lidocain	Gradient	11,0 - 110	0,9980	8,34	25,26
Procain	Gradient	11,0 - 110	0,9992	6,43	19,47

HPLC-Methoden 2.13.3.1 und 2.13.3.2