

"Zelluläre Pharmakokinetik von Foslovudin Tidoxil"

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I/ Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Diplom-Humanbiologin Antje Breske
geb. am 11. November 1978 in Greifswald

Gutachter /in

1. PD Dr. Dr. Michael Kurowski
2. Prof. Dr. Andreas Langner
3. Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi

Halle (Saale), 11. Mai 2009

*Für meine Eltern
Grenzach-Wyhlen, Mai 2009*

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
---------------------------	----------

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
------------------------------	-----------

TABELLENVERZEICHNIS	VIII
----------------------------	-------------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
------------------------------	----------

1. EINLEITUNG	1
----------------------	----------

2. GRUNDLAGEN	4
----------------------	----------

2.1 DAS HUMANE IMMUNSCHWÄCHE VIRUS	4
---	----------

2.2 DIE HIV-INFektion	7
------------------------------	----------

2.2.1 REPLIKATIONSZYKLUS DES HI-VIRUS	7
---------------------------------------	---

2.2.2 KLINISCHER VERLAUF DER HIV-INFektion	9
--	---

2.2.3 CDC-KLASSIFIKATION	10
--------------------------	----

2.3 HIV-THERAPIE	11
-------------------------	-----------

2.3.1 GESCHICHTLICHE ENTWICKLUNG	11
----------------------------------	----

2.3.2 WIRKMECHANISMUS DER NRTI	13
--------------------------------	----

2.3.3 WIRKMECHANISMUS DER NNRTI	14
---------------------------------	----

2.3.4 WIRKMECHANISMUS DER PROTEASE-INHIBITOREN	14
--	----

2.3.5 WIRKMECHANISMUS DER VIRALEN FUSIONS-INHIBITOREN	15
---	----

2.3.6 WIRKMECHANISMUS DER INTEGRASE-INHIBITOREN	16
---	----

2.4. THYMIDIN-ANALOGA ALS NUKLEOSIDISCHE REVERSE TRANSKRIPTASE INHIBITOREN	16
---	-----------

2.4.1 STRUKTUR DER THYMIDIN-ANALOGA	16
-------------------------------------	----

2.4.2 PHARMAKOKINETIK VON ZIDOVUDIN UND STAVUDIN	17
--	----

2.4.3 ZELLULÄRE TOXIZITÄT UND ZELLULÄRES INTERAKTIONSPOTENTIAL VON AZT UND D4T	19
2.5 FOSALVUDIN TIDOXIL, EIN NEUES THYMIDIN-ANALOGON	21
2.5.1 STRUKTUR VON FOSALVUDIN	21
2.5.2 DOSIERUNG VON FOSALVUDIN	22
2.5.3 PHARMAKOLOGIE VON FOSALVUDIN	22
2.5.4 NEBENWIRKUNGEN VON FOSALVUDIN	23
2.6 METHODEN ZUR QUANTITATIVEN INTRAZELLULÄREN MESSUNG VON THYMIDIN-ANALOGA	23
2.7 FRAGESTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT	25
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 MATERIAL	26
3.1.1 MATERIAL FÜR DIE LC-MS/MS	26
3.1.2 MATERIAL FÜR DIE LYMPHOZYTEN-ISOLATION	27
3.1.3 MATERIAL FÜR DIE PROBENAUFBEREITUNG	27
3.1.4 MATERIAL FÜR DEN „EX VIVO“ ZELLVERSUCH	28
3.2. METHODENENTWICKLUNG ZUR INTRAZELLULÄREN ANALYTIK VON FLT-TP	28
3.2.1 DAS PRINZIP DER IONENPAARCHROMATOGRAPHIE	28
3.2.2 DAS PRINZIP DER ESI-TANDEM-MASSENSPEKTROMETRIE	30
3.2.3 OPTIMIERUNG DER MS-BEDINGUNGEN FÜR DAS FLT-TP UND DEN INTERNEN STANDARD	33
3.2.4 ENTWICKLUNG DER HPLC FÜR DAS FLT-TP	36
3.2.5 PRÜFUNG DER ENTWICKELTEN FLT-TP BEDINGUNGEN AN DER BIOLOGISCHEN MATRIX	37
3.2.5.1 Lymphozyten-Isolation aus Buffy-Coats	37
3.2.5.2 Zellaufbereitung	38
3.2.6 IDENTIFIZIERUNG DER ENDOGENEN INTERFERENZ	39
3.2.7 OPTIMIERUNG DER MS- UND HPLC-BEDINGUNGEN BEI AUFTRETEN DER ENDOGENEN INTERFERENZ	40

3.2.7.1 Methode A: zur chromatographischen Trennung von FLT-TP und UTP	40
3.2.7.2 Methode B: für den FLT-TP spezifischen Massenübergang 482,7/259,2	43
3.3 VALIDIERUNG DER BEIDEN METHODEN ZUR INTRAZELLULÄREN ANALYTIK VON FLT-TP	44
3.3.1 PARAMETER DER VALIDIERUNG	44
3.3.1.1 Selektivität	44
3.3.1.2 Richtigkeit und Präzision	45
3.3.1.3 Wiederfindung	45
3.3.1.4 Kalibrationskurven	46
3.3.1.5 Re-Injektion einer Probenmessung und Temperaturstabilität	46
3.3.2 HERSTELLUNG DER KALIBRATIONS-KURVEN UND QUALITÄTSKONTROLLEN	47
3.4 „EX VIVO“ ZELLVERSUCH	48
3.4.1 LYMPHOZYTEN-ISOLATION FÜR DIE ZELLKULTUR	49
3.4.2 KULTIVIERUNG DER LYMPHOZYTEN	50
3.4.3 INKUBATION DER ZELLKULTUR MIT FOSALVUDIN	51
3.4.4 KONTROLLE DER ZELLVITALITÄT	52
3.5 DIE KLINISCHE PHASE-II STUDIE	52
3.5.1 LYMPHOZYTEN-ISOLATIONS-PROTOKOLL FÜR DIE KLINISCHE STUDIE	53
3.6 STATISTIK	55
4. ERGEBNISSE	56
<hr/>	
4.1 METHODENENTWICKLUNG FÜR DIE INTRAZELLULÄRE ANALYTIK VON FLT-TP	56
4.1.1 OPTIMIERUNG DER MS-BEDINGUNGEN FÜR FLT-TP UND INTERNEN STANDARD	56
4.1.2 OPTIMIERUNG DER HPLC-METHODE	58
4.1.3 ÜBERPRÜFUNG DER METHODE AN DER BIOLOGISCHEN MATRIX	61
4.1.4 IDENTIFIZIERUNG DER ENDOGENEN INTERFERENZ	62
4.1.5 OPTIMIERUNG DER MS- UND HPLC-BEDINGUNGEN FÜR DIE ENDOGENE INTERFERENZ	65

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>IV</u>
4.1.5.1 Optimierung der Methode A	65
4.1.5.2 Optimierung der Methode B	67
4.2 VALIDIERUNG DER METHODEN	68
4.2.1 VALIDIERUNG DER METHODE A	68
4.2.1.1 Selektivität der Methode A	69
4.2.1.2 Richtigkeit und Präzision bei der Methode A	69
4.2.1.3 Wiederfindung bei der Methode A	70
4.2.1.4 Kalibrationskurven bei der Methode A	70
4.2.1.5 Re-Injektion einer Probenmessung und Temperaturstabilität	71
4.2.2 VALIDIERUNG DER METHODE B MIT DEM FLT-TP SIGNALÄRMEREN MASSENÜBERGANG	73
4.2.2.1 Selektivität der Methode B	73
4.2.2.2 Richtigkeit und Präzision der Methode B	73
4.2.2.3 Wiederfindung mit der Methode B	74
4.2.2.4 Kalibrationskurven der Methode B	75
4.3 „EX VIVO“ ZELLVERSUCH	75
4.3.1 MESSUNG VON FLT-TP MIT DER METHODE A ZUR TRENNUNG VON UTP UND FLT-TP	76
4.3.2 MESSUNG MIT DER METHODE B MIT DEM SIGNALÄRMEREN FLT-TP MASSENÜBERGANG	76
4.4 DIE KLINISCHE PHASE-II STUDIE	78
4.4.1 FLT-TP MESSUNG MIT METHODE A ZUR TRENNUNG VON UTP UND FLT-TP	78
4.4.2 FLT-TP MESSUNG MIT DER METHODE B	79
5. DISKUSSION	82
5.1 ENTWICKLUNG UND VALIDIERUNG DER INTRAZELLULÄREN ANALYTIK VON FLT-TP	82
5.1.1 VALIDIERUNG	85
5.2 „EX VIVO ZELLVERSUCH“	88
5.3 DIE KLINISCHE PHASE-II STUDIE	90

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>V</u>
5.4 AUSBLICK	92
6. ZUSAMMENFASSUNG	94
LITERATURVERZEICHNIS	96

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Aufbau eines HIV-1-Virions
Abb. 2.2	Genomstruktur des HIV-1
Abb. 2.3	Replikationszyklus des HI-Virus
Abb. 2.4	Verlauf der HIV-Infektion
Abb. 2.5	Strukturformeln der Thymidinanaloga
Abb. 2.6	Zelluläre Phosphorylierung der Thymidinanaloga
Abb. 2.7	Strukturformeln von FLT, FLT-MP und Fosalvudin Tidoxil (Natriumsalz)
Abb. 3.1	Schematische Darstellung des Gleichgewichtssystems in der MPIC
Abb. 3.2	Schematische Darstellung der Ionenbildung bei der Elektrosprayionisierung
Abb. 3.3	Prinzipieller Aufbau eines „Triple Quadrupol“ Massenspektrometers
Abb. 4.1	Produkt-Ion-Scan von FLT-TP
Abb. 4.2	m/z der Transitionen von FLT-TP
Abb. 4.3	m/z der Transitionen von Chloradenosin-Triphosphat (2Cl-ATP)
Abb. 4.4	m/z der Transitionen von Zalcitabin-Triphosphat (ddC-TP)
Abb. 4.5	N'-N-DMHA Konzentration in Bezug auf den Ionisierungsgrad von FLT-TP
Abb. 4.6	Optimum des pH-Wertes bei unterschiedlichen DMHA Konzentrationen
Abb. 4.7	Gradientenoptimierung
Abb. 4.8	Chromatogramm von FLT-TP, ddC-TP und 2Cl-ATP unter optimierten Bedingungen
Abb. 4.9	Chromatogramm der endogenen Interferenz
Abb. 4.10	Strukturformeln der untersuchten endogenen Triphosphate
Abb. 4.11	m/z der Transitionen von UTP
Abb. 4.12	Fragmentation von FLT-TP und UTP im Massenspektrum
Abb. 4.13	Gradientenoptimierung für Methode A
Abb. 4.14	Chromatogramm von allen vier Analyten als Reinsubstanz bei Methode A
Abb. 4.15	m/z der Transitionen von FLT-TP (Methode B)
Abb. 4.16	Gradientenoptimierung für Methode B mit FLT-TP 482,7/259,2

Abb. 4.17	Wiederfindung von FLT-TP mit Methode A
Abb. 4.18	Graphische Darstellung einer Kalibrationskurve von FLT-TP mit Methode A
Abb. 4.19	Re-Injektion und Temperaturstabilität von FLT-TP
Abb. 4.20	Wiederfindung von FLT-TP bei Methode B
Abb. 4.21	FLT-TP Konzentration des Zellversuchs mit Methode B
Abb. 4.22	FLT-TP (E1) Chromatogramm mit Methode A
Abb. 4.23	Chromatogramm eines 3h-Wertes mit Methode A
Abb. 4.24	Chromatogramm von Q1 mit Methode B
Abb. 4.25	FLT-TP Chromatogramm eines 3h-Wertes mit Methode B

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Bezeichnung und Funktion der Gene
Tab. 2.2	Klassifikation der HIV-Krankheit (CDC 1993)
Tab. 2.3	Zusammensetzung aller bisher zugelassenen HIV-Medikamente
Tab. 2.4	Physikalische, chemische und pharmakologische Eigenschaften von Zidovudin (AZT)
Tab. 2.5	Physikalische, chemische und pharmakologische Eigenschaften von Stavudin (d4T)
Tab. 2.6	Physikalische, chemische und pharmakologische Eigenschaften von Fosalvudin Tidoxil (Na)
Tab. 3.1	Chemikalien für die LC-MS/MS
Tab. 3.2	Chemikalien für die Lymphozyten-Isolation
Tab. 3.3	Chemikalien für die Zellkultur
Tab. 3.4	Versuchsaufbau für die Optimierung der MS-Bedingungen
Tab. 3.5	Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für FLT-TP
Tab. 3.6	Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für ddC-TP
Tab. 3.7	Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für 2CI-ATP
Tab. 3.8	Gruppenspezifische Einstellungen des MS
Tab. 3.9	Zusammensetzung der mobilen Phasen A und B
Tab. 3.10	Gradient der mobilen Phasen für die FLT-TP Analytik
Tab. 3.11	Zusammensetzung der internen Standardlösung (iS) für die Zell-Lyse
Tab. 3.12	Versuchsaufbau für die Identifizierung des endogenen Störsignals
Tab. 3.13	Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für FLT-TP (Methode A)
Tab. 3.14	UTP spezifischer Massenübergang m/z und stoffspezifische Parameter (Methode A)
Tab. 3.15	Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für ddC-TP (Methode A)
Tab. 3.16	Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für 2CI-ATP (Methode A)
Tab. 3.17	Gruppenspezifische Einstellungen des MS (Methode A)
Tab. 3.18	Zusammensetzung der mobilen Phasen A und B für Methode A

Tab. 3.19	Gradient der mobilen Phasen für die FLT-TP Analytik (Methode A)
Tab. 3.20	Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für FLT-TP (Methode B)
Tab. 3.21	Gradient der mobilen Phasen für Methode B
Tab. 3.22	Konzentration der FLT-TP Kalibrationskurven in ng/ml und in $\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen bei Methode A
Tab. 3.23	Konzentration der FLT-TP Qualitätskontrollen in ng/ml und in $\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen bei Methode A
Tab. 3.24	Konzentration der FLT-TP Kalibrationskurven und der Qualitätskontrollen in ng/ml und in $\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen bei der Methode B
Tab. 3.25	Lymphozyten-Isolation für den „ex vivo“ Zellversuch
Tab. 3.26	Medien für die Kultivierung der Lymphozyten
Tab. 3.27	Protokoll der Lymphozyten-Kultivierung
Tab. 3.28	Well-Belegung einer 24-Well-Platte für die Inkubation mit Fosalvudin
Tab. 3.29	Protokoll für den MTT-Test
Tab. 3.30	Protokoll zur Zellpräparation bei NRTI-TP Bestimmungen
Tab. 4.1	Getestete HPLC-Säulen
Tab. 4.2	Selektivität der Methode A
Tab. 4.3	Richtigkeit und Präzision der Methode A
Tab. 4.4	Werte von zwei Kalibrationskurven von FLT-TP mit Methode A bei einer Auswertung mit linear $1/x$
Tab. 4.5	Re-Injektion und Temperaturstabilität von FLT-TP
Tab. 4.6	Selektivität der Methode B
Tab. 4.7	Richtigkeit und Präzision der Methode B
Tab. 4.8	Mittelwerte der Kalibrationskurven von FLT-TP bei der Auswertung linear $1/x$ (Methode B)
Tab. 4.9	Qualitätskontrollen bei der FLT-TP Messung mit Methode B
Tab. 4.10	FLT-TP Konzentrationen im „ex vivo“ Zellversuch mit Methode B
Tab. 4.11	Qualitätskontrollen bei der klinischen Studie mit Methode A
Tab. 4.12	Qualitätskontrollen bei der klinischen Studie mit Methode B

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Abacavir
ACN	Acetonitril
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AMT	3'-Amino-3'-Deoxythymidin
APV	Amprenavir
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATV	Atazanavir
AUC	area under the curve
AZT	Zidovudin
BID	zweimal am Tag
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CAD	Kollisionsgas
CCR5	Chemokin-(C-C-Motiv)-Rezeptor 5
CD	cluster of differentiation
CDC	Centers for Disease Control
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	Kollisionsenergie
2Cl-ATP	2-Chloradenosin-Triphosphat
C _{max}	maximaler Plasmaspiegel
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cps	counts per second
CPT	Cell Preparation Tube
CRM	Charged Residue Model
CTP	Cytidin-Triphosphat
C _{trough}	Basisplasmaspiegel
CUR	Curtain Gas
C.V.	Variationskoeffizient
CXCR4	Chemokin- (C-X-C-Motiv)-Rezeptor 4

CXP	Cell Exit Potential
2Cl-ATP	2-Chlor-Adenosinriphosphat
DC	Gleichspannung
ddC	Zalcitabin
ddC-TP	Zalcitabin-Triphosphat
ddl	Didanosin
dGTP	desoxy-Guanosin-Triphosphat
DLV	Delavirdin
DMHA	Dimethylhexylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nukleosidtriphosphat
DP	declustering Potential
DRV	Darunavir
d4T	Stavudin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFV	Efavirenz
EMA	European Medicines Agency
ENF	Enfuvirtid (T-20)
EP	Entrance Potential
ESI	Elektrospray Ionisation
FCS	Fetales Kälber Serum
FDA	Food and Drug Administration
FLT	Alovudin
FLT-DP	Alovudin-Diphosphat (Fosalvudin-Diphosphat)
FLT-MP	Alovudin-Monophosphat
FLT-TP	Alovudin-Triphosphat (Fosalvudin-Triphosphat)
fmol	Femtomol
fmol ^{10⁶}	Femtomol pro einer Million Zellen
FP	Focusing Potential
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabin
g	Gramm

GAMT	5'-O-Glucuronid-3'-Amino-3'-Deoxythymidin
GZDV	Zidovudinglucuronid
h	Stunde
HAART	hochaktive antiretrovirale Kombinationstherapie
HCOOH	Ameisensäure
HIV	humanes Immunschwächevirus
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
H ₂ O	Wasser
IDV	Indinavir
IEM	Ionen Emission Modell
IPC	Ionenpaarchromatographie
IS	Ionenspray
iS	interner Standard
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
L	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt an ein Tandem-Massenspektrometer
LLOQ	Lower Limit of Quantification
LPV	Lopinavir
LTR	Long terminal Repeat
mM	Millimol
mm	Millimeter
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Million
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Mol

MPIC	Mobile Phase Ionenchromatographie
MRM	Multiple Reaction Monitoring
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometer
msec	Millisekunde
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MVC	Maraviroc
MW	Mittelwert
m/z	Masse / Ladung Wert
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
NEB	Nebulizergas
NFV	Nelfinavir
nm	Nanometer
NNRTI	Nicht Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTI	Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTI-TP	Triphosphate der Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren
NVP	Nevirapin
ng	Nanogramm
OH	Hydroxigruppe
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PHA-M	Phytohämagglutinin-M
PI	Protease Inhibitoren
QC	Qualitätskontrolle
qd	einmal täglich
Q 0-3	Quadrupole 0 bis 3
RAL	Raltegravir
RANTES	Regulated upon Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted
R.E.	Relativer Fehler
RF	Wechselspannung
rH	reiner Wasserstoff

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per min
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Retentionszeit
RTV	Ritonavir
SD	Standardabweichung
SQV	Saquinavir
TDF	Tenofovir
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
Tem	Temperatur
TMC 125	Etravirin
TPV	Tipranavir
TRIS-HCL	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Salzsäure
TTP	Thymidin-Triphosphat
UTP	Uridin-Triphosphat
V	Volt
v/v	Abkürzung für "by volume"
3TC	Lamivudin

1. Einleitung

1981 wurde erstmals das Auftreten von AIDS (acquired immunodeficiency syndrome), der erworbenen Immunschwäche, beschrieben [1]. Zwei Jahre später, 1983, entdeckte der französische Wissenschaftler Luc Montagnier das humane Immundefizienzvirus (HIV) [2]. Das HI-Virus ist ein Retrovirus aus der Familie der Lentiviren. Die beiden Typen HIV-1 und HIV-2 werden jeweils noch in mehrere Subtypen unterteilt.

Die HIV-Infektion verläuft zunächst akut. Der im weiteren Verlauf fortschreitende Immundefekt wird durch die kontinuierliche Vermehrung des HI-Virus in CD4-Rezeptor tragenden Zellen hervorgerufen und führt zur Zerstörung der Immunzellen. Weiterhin kennzeichnend sind die lange klinische Latenzzeit mit persistierender Virämie, und die Manifestation opportunistischer Infektionen nach vielen Jahren.

Ende 2007 wurden weltweit 33 Millionen (30,3 Millionen - 36,1 Millionen) HIV-Infizierte registriert, von denen ca. 2,4 % in Westeuropa leben [3].

Für die HIV-Therapie stehen Ende 2008 fünf antiretrovirale Substanzklassen zur Verfügung: Nukleosidische-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), Nicht-Nukleosidische-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), Protease-Inhibitoren (PI), Fusions- oder Entry-Inhibitoren und ein Integrase-Inhibitor. Für die Initialtherapie („Firstline“-Therapie) gilt die Kombinationen eines PI mit zwei NRTI und die Kombination eines NNRTI mit zwei NRTI als aktueller Standard [4, 5].

Ziele der hochaktiven antiretroviralen Kombinationstherapie (HAART) sind erstens die HIV-Replikation weitestgehend zu unterdrücken, zweitens die Selektion von resistenten Virusstämmen zu verhindern und drittens die Progression der HIV-Erkrankung aufzuhalten. Bei erfolgreicher Therapie kann eine Rückbildung HIV-bedingter Symptome und eine partielle Immunrestitution erreicht werden [6-9].

Mögliche Ursachen für einen unzureichenden Therapieerfolg bzw. ein Therapieversagen sind die verminderte Absorption einer Wirksubstanz und deren beschleunigte oder verlangsamte Metabolisierung.

Auch Arzneimittel-Interaktionen können zu subtherapeutischen Wirkstoffspiegeln führen. Unter diesen Bedingungen kann das HI-Virus Resistenzmutationen entwickeln, was sich negativ auf den Effekt der antiretroviralen Behandlung auswirken kann.

Nicht zuletzt ist die Einnahme der Medikation durch den Patienten von entscheidender Bedeutung für den Erfolg bzw. Misserfolg einer Therapie [10].

Seit 1981 ist die Optimierung der HIV-Therapie Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. Einerseits werden neue Wirkstoffklassen entwickelt, andererseits werden etablierte Wirkstoffe weiterentwickelt, z.B. durch so genannte „Pro-Drugs“ wie Fosamprenavir oder Tenofovir, um die Bioverfügbarkeit und Verträglichkeit der Wirkstoffe zu erhöhen.

Fosamprenavir ist ein Phosphatester-„Pro-Drug“ auf Basis von Amprenavir. Durch die Veresterung mit Phosphorsäure wird die ursprüngliche Lipophilie von Amprenavir gesenkt, so dass der Wirkstoff besser aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden kann.

Tenofovir liegt als Disoproxilfumarat vor und enthält schon eine Phosphatgruppe. Durch die zusätzlichen Alkyl-Methyl-Carbonatester wird die Bioverfügbarkeit von Tenofovir verbessert. Nach oraler Aufnahme wird Tenofovir-Disoproxilfumarat durch Esterasen hydrolysiert und anschließend durch Kinasen zum Triphosphat phosphoryliert.

Die Firma Heidelberg Pharma hat das „Pro-Drug“ Fosalvudin Tidoxil (HDP 99.0003) aus dem bekannten, aber sehr toxischen Wirkstoff Alovudin (FLT) entwickelt: Fosalvudin Tidoxil, auch Fosalvudin genannt, ist ein Thymidin-Analogon, das zur antiretroviralen Substanzklasse der NRTI gehört, und ist in Phase-II der klinischen Entwicklung (Stand September 2008).

Fosalvudin besteht aus einem lipophilen Trägermolekül und FLT-Monophosphat (FLT-MP), das beim Transport in die Zelle durch zelluläre Enzyme abgespalten und durch körpereigene Kinasen zum aktiven Metaboliten FLT-Triphosphat (FLT-TP) phosphoryliert wird. FLT-TP stellt die aktive Wirksubstanz dar. Weil die Konzentration des zellulären Triphosphates mit der antiretroviralen Wirksamkeit korrelieren sollte, empfiehlt die europäische Arzneimittelagentur EMEA in den Richtlinien für die Entwicklung von NRTI die Untersuchung der intrazellulären Pharmakokinetik der aktiven Metabolite [11]. Zu beachten ist, dass auch bei NRTI Interaktionen mit anderen NRTI-TP und deren Vorstufen auftreten: So hemmt beispielsweise Lamivudin bei gleichzeitiger Gabe mit Apricitabin die intrazelluläre Phosphorylierung von Apricitabin und damit die Bildung des aktiven Metaboliten [12].

Die beiden Ziele dieser Arbeit sind erstens die Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS Methode zur intrazellulären Wirkstoffspiegelbestimmung des aktiven Metaboliten FLT-TP. Zweitens soll die validierte Methode zur Bestimmung der zellulären Konzentration von FLT-TP im Rahmen einer klinischen Studie eingesetzt werden.

Nach Zulassung von Foslovudin Tidoxil und Etablierung der Methode könnten die FLT-TP Messungen zukünftig der antiretroviralen Therapie-Optimierung im Rahmen des „Therapeutischen Drug Monitorings“ (TDM) dienen und im klinischen Alltag eingesetzt werden.

2. Grundlagen

2.1 Das humane Immunschwäche Virus

Das 1983 entdeckte humane Immunschwäche Virus ist ein Retrovirus aus der Familie der Lentiviren. Charakteristisch für diese Virenfamilie sind die persistierende Virämie und lange klinische Latenzzeit [13]. Zwei Typen des HI-Virus sind bekannt: HIV-1 [2] und HIV-2 [14]. HIV-1 ist weltweit der hauptsächliche Erreger der HIV-Erkrankung. HIV-2 dagegen tritt vorwiegend in Westafrika und in anderen Gegenden endemisch auf. Die weitere Unterteilung von HIV-1 erfolgt auf Grund spezifischer Nukleotidsequenzen des env- und/oder gag-Gens in genotypische Subtypen A bis I. Die Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich verschiedener biologischer und pathogenetischer Eigenschaften [15].

Der Aufbau des HI-Virus ist vergleichsweise einfach. Es besteht nur aus einer äußeren Hülle mit Andockstellen für die Verbindung mit der Wirtszelle, einer inneren Hülle, der Erbsubstanz und bestimmten Enzymen, die eine virale Vermehrung in der Wirtszelle katalysieren.

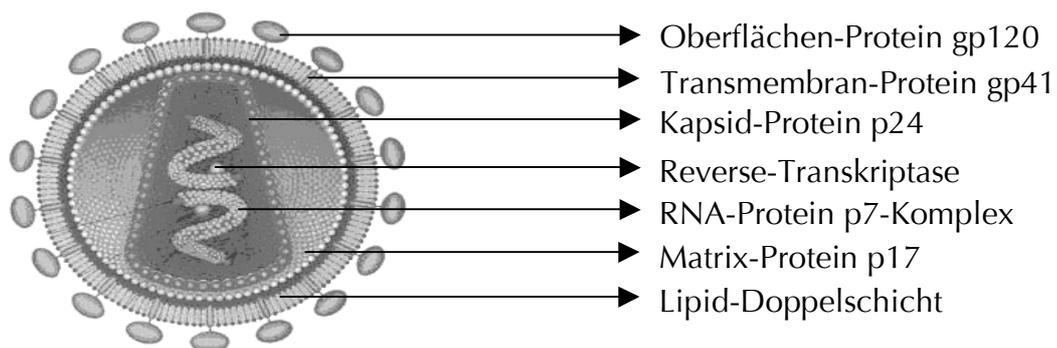


Abb. 2.1: Aufbau eines HIV-1-Virions [13]

Aufbau eines typischen HIV-1-Virions mit den strukturelevanten Komponenten.

Im Gegensatz zu anderen Retroviren hat das HI-Virus eine komplexere Genomstruktur. HIV-1 besitzt zwei Moleküle einer ca. 9000 Basen großen RNA, die jeweils von zwei langen Wiederholungseinheiten (LTR) begrenzt sind und für neun offene Leserahmen codieren. In Tab. 2.1 sind die neun Gene mit den durch sie codierten Proteinen, sowie deren Funktion aufgeführt.

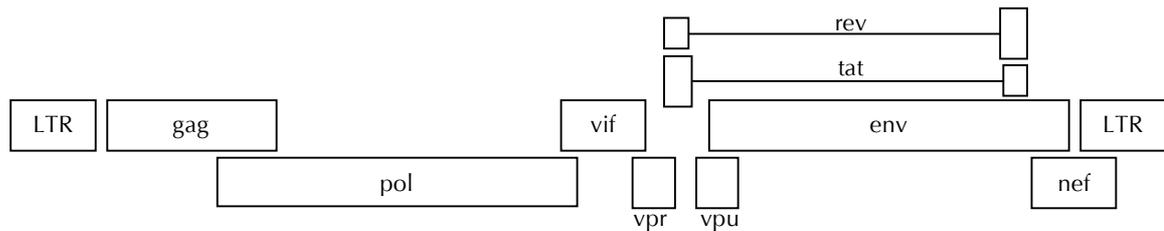


Abb. 2.2: Genomstruktur des HIV-1 [13]

Die einzelnen Abkürzungen sind im folgenden Text und in Tab. 2.1 beschrieben.

Die RNA liegt mit dem Nukleokapsid-Protein p7 verknüpft vor. Dieser Komplex aus RNA und Nukleokapsid ist in eine Hülle aus dem Kapsid-Protein p24 eingelagert. Die Viruskernmembran, die aus dem Matrix-Protein p17 besteht, umgibt diesen Komplex und ist durch das Link-Protein p6 mit dem Nukleokapsid verbunden. Im Viruskern werden auch die drei Enzyme, die Reverse-Transkriptase, die Protease und die Integrase mitverpackt. Das so entstandene HI-Virus-Kern („Core“) ist von der äußeren Hülle des HI-Virus umschlossen. Die äußere Hülle besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, aus der 72 kugelförmige „Andockproteine“ herausragen.

Diese Proteine werden aus dem Transmembran-Protein gp41 und dem mit gp41 verbundenen Oberflächen-Protein gp120 gebildet [16]. Sie spielen eine essentielle Rolle für die Rezeptorbindungsfähigkeit und die immunologischen Eigenschaften des HI-Virus [17].

Tab. 2.1: Bezeichnung und Funktion der Gene [13]

Gen		Proteine/Größe	Funktion der Proteine
Strukturproteine			
env	envelope	Vorläuferprotein gp160 Oberflächen-Protein gp120 Transmembran-Protein gp41	Adsorption des Virus an die Zielzelle Fusion des Virus in die Zielzelle
gag	Gruppen-spezifische Antigene	Gag-Vorläuferprotein pr55 Matrix-Protein (MA) p17 Kapsid-Protein (CA) p24 Nukleokapsid-Protein p7 Link-Protein p6	Mit der Hüllmembran assoziiert Strukturprotein des Kapsids Assoziation mit RNA-Genom Verbindung zwischen Kapsid und Membran
Enzyme			
pol	Polymerase-Gen	Gag/Pol-Vorläuferprotein pr160 Reverse-Transkriptase p51/66 Protease (PR) p9 Integrase (IN) p38	RNA-abhängige-DNA-Polymerase Spaltet Gag- und Gag/Pol-Vorläufer-Proteine in die Einzelkomponenten Endonuklease und Ligase
Regulatorproteine			
tat	transcriptional activator in trans	Transaktivator der Transkription p9/14	Bindet an der tat-Akzeptor-Region der langen Wiederholungseinheiten (LTR) an den 5'-Enden der RNA und ermöglicht die Elongation
rev	regulator of expression of virion proteins	Posttranskriptioneller Transaktivator p19	Fördert den Transport einfach gespleißter und ungespleißter mRNA aus dem Kern
Hilfsproteine			
vpr	virus protein R	Virales Protein R p18	Mögliche Unterstützung der Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle
vpu	virus protein U	Virales Protein U p15	Mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums assoziiert, verhindert die intrazelluläre Komplexbildung zwischen gp160 und CD4-Rezeptoren
vif	virion infectivity factor	Virion-Infektionsfaktor p23	Beschleunigt die Infektion in peripheren Blutlymphozyten
nef	negative factor	Nef-Protein p25/27	potenter Inhibitor der Virus-mRNA-Produktion

2.2 Die HIV-Infektion

Die Infektion mit dem HI-Virus kann durch ungeschützten Geschlechtsverkehr, durch infiziertes Blut und Blutprodukte, oder durch pränatale (über die Plazenta auf den Fötus), perinatale (auf Neugeborene von HIV-infizierten Müttern) und postnatale (durch Stillen) Transmission erfolgen.

Nach der Infektion vermehrt sich das HI-Virus hauptsächlich in CD4-Rezeptor-tragenden (CD4⁺) Zellen. CD steht für "cluster of differentiation" und beschreibt die auf der Zelloberfläche der Wirtszellen befindlichen Bindungsstellen. Die wichtigsten Zielzellen des HI-Virus sind die zum menschlichen Immunsystem gehörenden T-Helfer-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen. Zielzellen im Zentralnervensystem sind Mikrogliazellen - diese CD4⁺-Zellen gehören zur Monozyten- und Makrophagenlinie.

Das HI-Virus kann auch CD4⁻-Zellen infizieren wie z.B. CD8-Lymphozyten, Hepatozyten oder auch Stammzellen des Knochenmarks.

2.2.1 Replikationszyklus des HI-Virus

Neben dem CD4-Rezeptor benötigt HIV für den Eintritt in die Wirtszelle weitere Ko-Rezeptoren, die zu den Chemokin-Rezeptoren aus der Familie der T7-Transmembranproteine gehören. CXCR4 (Fusin) und CCR5 zählen zu den effektivsten Ko-Rezeptoren [18]. Die Bezeichnungen leiten sich aus charakteristischen Aminosäuremotiven der Liganden ab.

Hat das HI-Virus mit seinem Oberflächen-Protein gp 120 an das CD4-Protein der Wirtszelle "angedockt" [19], wird eine Konformationsänderung des Oberflächen-Proteins ausgelöst [20]. Dadurch wird die Fusionsdomäne des Transmembran-Protein gp 41 freigelegt, so dass gp 120 mit dem Ko-Rezeptor CCR5 oder CXCR4 interagieren kann.

Anschließend erfolgt die Insertion von gp41 in die Zellmembran und die Fusion des HI-Virus mit der Zielzelle.

Nach dem Eintritt in die Wirtszelle erfolgt bei HIV - wie bei allen Retroviren - eine reverse Transkription des RNA-Genoms in DNA [21]. Dieser Vorgang wird von der Reversen-Transkriptase, einer RNA-abhängigen-DNA-Polymerase, vermittelt. Die Reverse-Transkriptase synthetisiert unter Verwendung von RNA als Matrize DNA in 5`→ 3`-Richtung. Die entstandene Doppelstrang-DNA wird durch die Integrase in den Zellkern der infizierten Zelle geschleust und dort in die zelleigene DNA integriert [22, 23]. Nach Einbau der DNA in das Wirtszellgenom ist die Zelle bei jeder Aktivierung in der Lage Viren zu produzieren. Die Virusbestandteile, die durch Transkription und Translation entstehen, werden durch die Protease in funktionsfähige Virusproteine geschnitten und bilden das infektiöse Virion.

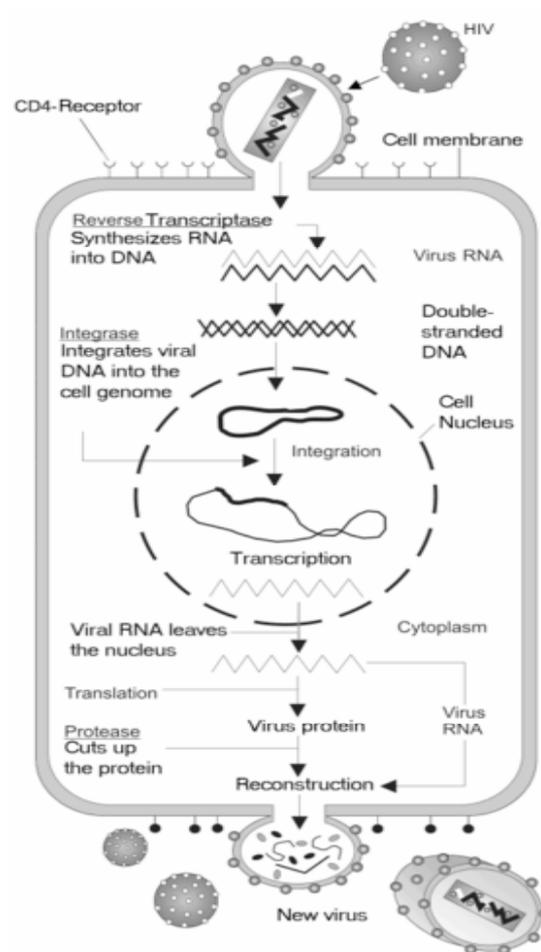


Abb. 2.3: Replikationszyklus des HI-Virus

Die wesentlichen Schritte der HIV-Replikation werden im Text erklärt.

2.2.2 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

Als chronische, langsam progrediente Infektion durchläuft die HIV-Infektion mehrere Phasen, die klinisch unterschieden werden können (Abb.4): Die akute HIV-Infektion wird nur von einem geringen Teil der Patienten bemerkt. Nach dem mehrere Jahre andauernden asymptomatischen Stadium folgt ein symptomatisches Stadium, das durch das Auftreten opportunistischer Erkrankungen gekennzeichnet ist. Das Endstadium einer chronischen HIV-Infektion wird als AIDS bezeichnet und ist durch das Auftreten von Indikatorkrankheiten charakterisiert, den so genannten „AIDS-definierenden“ Erkrankungen.

Während der akuten Infektion breitet sich das HI-Virus vom Eintrittsort über das Lymph- und Blutgefäßsystem im Körper aus und verteilt sich in die lymphatischen Gewebe. Innerhalb weniger Tage kommt es durch eine massive Virusreplikation zu einem starken Anstieg der HIV-RNA (Viruslast) und einem gleichzeitigen Abfall der CD4-Lymphozyten. Mit einer Latenz von mehreren Wochen oder Monaten bilden sich Antikörper gegen das HI-Virus (Serokonversion). Während dieser Phase kann der Patient symptomatisch werden. Die Symptome sind variabel und unspezifisch (wie Fieber, Müdigkeit, Hautläsionen, Lymphknotenschwellungen und Pharyngitis), dauern einige Tage bis Wochen an und verschwinden wieder. Der Patient bleibt dennoch weiterhin seropositiv, d.h. die Antikörper persistieren und bleiben nachweisbar.

Das anschließende asymptomatische Stadium kann mehrere Jahre dauern. Innerhalb dieser Phase sind die CD4-Zellzahl und HIV-RNA Viruslast wichtige Surrogatmarker zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs bzw. der Wirksamkeit einer Therapie. Immunologisch ist ein zunehmender Abfall der T-Helferzellen sowie des CD4/CD8-Verhältnisses charakteristisch, virologisch der Nachweis von HIV-RNA im Blutplasma als Kennzeichen der aktiven HIV-Replikation.

Der kontinuierliche Abfall der CD4-Zellen führt zu einem häufigeren Auftreten von klinischen Symptomen und weist auf den bestehenden Immundefekt hin.

Das symptomatische Stadium ist durch das Auftreten von zunächst nicht lebensbedrohlichen opportunistischen Infektionen gekennzeichnet wie z.B. Candida- und Herpes-Zoster-Infektionen.

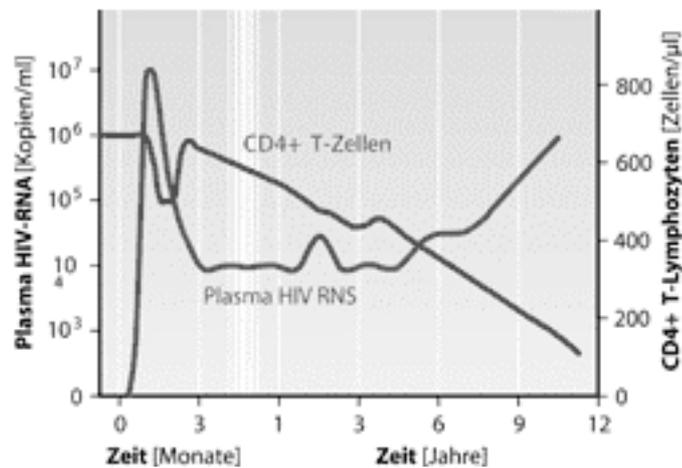


Abb. 2.4: Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

Typische Konzentrations-Zeit-Profile der Plasma HIV-RNA und der CD4-Zellzahl während der einzelnen Phasen der HIV-Infektion.

Das Vollbild der AIDS-Erkrankung wird durch das Auftreten von lebensbedrohlichen opportunistischen Infektionen (Indikatorkrankheiten) charakterisiert. Dieser Phase geht häufig ein Abfall der CD4-Zellen auf Werte $<200/\mu\text{l}$ voraus.

2.2.3 CDC-Klassifikation

Verschiedene Klassifikationssysteme wurden entwickelt, um den Verlauf der HIV-Infektion zu beschreiben. 1993 publizierte das Center for Disease Control (CDC) die aktuell gültige Klassifikation.

Die CDC-Klassifikation gliedert die HIV-Erkrankung nach klinischen Symptomen in die Stadien A bis C und in drei CD4-Zellzahlbereiche (1 bis 3). Diese 3 x 3-Matrix klassifiziert zusätzlich noch die Untergruppen A1 bis C3 (Tab. 2.2.) [24].

Tab. 2.2: Klassifikation der HIV-Krankheit (CDC 1993)

	Laborkategorie CD4-Zellen/ μ l	Klinische Kategorien		
		A	B	C
1	$\geq 500/\mu$ l	A1	B1	C1
2	200-499/ μ l	A2	B2	C2
3	<200/ μ l	A3	B3	C3

A asymptomatische, akute HIV-Infektion oder PGL (persistierende generalisierte Lymphadenopathie)

B HIV-assoziierte klinische Symptome und Erkrankungen, die nicht unter die Kategorie der AIDS-definierenden Erkrankungen fallen

C AIDS definierende Erkrankung

Die Steuerung der Therapie erfolgt anhand der CD4-Lymphozyten und der HIV-RNA Viruslast: Nach internationalen Richtlinien sollte bei einem Abfall der CD4-Zellen in den Bereich zwischen 200-500 Zellen/ μ l und einem Anstieg der Viruslast über 50.000-100.000 HIV-RNA Kopien/ μ l mit einer antiretroviralen Therapie begonnen werden [4].

2.3 HIV-Therapie

2.3.1 Geschichtliche Entwicklung

Bereits 1987, nur vier Jahre nach Entdeckung des HI-Virus, wurde in den USA der erste antiretrovirale Wirkstoff, Zidovudin (AZT), zur Monotherapie der HIV-Infektion zugelassen. AZT gehört zu der Substanzklasse der Nukleosidischen-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI).

Doch der Einsatz von AZT als Monotherapie brachte nicht den gewünschten Therapieerfolg, wie die Ergebnisse der Concorde-Studie zeigten. Die Studie analysierte 1749 asymptomatische HIV-positive Patienten über einen Zeitraum von 3 Jahren. Die Monotherapie mit AZT führte nur zu einer kurzfristigen Virussuppression, so dass die Krankheit erneut ausbrach [25]. In den folgenden Jahren entdeckte man weitere NRTI, die in Kombination mit AZT eingesetzt wurden [26, 27].

Erst Anfang 1996 gelang der Durchbruch in der HIV-Therapie mit Zulassung der ersten Protease-Inhibitoren (PI) Saquinavir (SQV), Ritonavir (RTV) und Indinavir (IDV). Mit verschiedenen Kombinationen aus PI und zwei Reverse-Transkriptase-Inhibitoren konnte ein Anstieg der CD4-Zellzahl und dauerhafter Abfall der HIV-RNA Viruslast unter die Nachweisgrenze erzielt werden [8, 28, 29].

Nach den PI wurde 1996 mit Nevirapin (NVP) auch das erste Arzneimittel aus einer dritten Wirkstoffklasse eingeführt, die Nicht-Nukleosidischen-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI). Damit stand ein größeres Spektrum an medikamentösen Kombinationsmöglichkeiten zur Verfügung, um Therapieanpassungen bei Unverträglichkeiten oder Auftreten von Resistenzmutationen durchführen zu können. In zahlreichen Studien konnte die bessere Wirksamkeit der Dreierkombinationen (zwei NRTI plus NVP) im Vergleich zu der dualen NRTI-Therapie belegt werden [30-32].

In den folgenden Jahren konnten weitere Arzneimittel aus den drei Substanzklassen zugelassen werden, die zu weiteren Therapieverbesserungen führen sollten. Doch mit zunehmender Komplexität der HIV-Therapie stellten Nebenwirkungen, Resistenzentwicklungen, Arzneimittelinteraktionen und Compliance-Probleme aufgrund der hohen Tablettenanzahl, auch neue Herausforderungen für Ärzte und HIV-Patienten dar.

2003 stand mit dem Fusionsinhibitor Enfuvirtid (ENF, T-20) der Vertreter einer vierten antiretroviralen Substanzklasse zur Verfügung, gefolgt von Maraviroc (MVC) in 2007.

Mit dem Integrase-Inhibitor Raltegravir (RAL) führte man 2007 die fünfte antiretrovirale Substanzklasse ein.

Ende 2008 sind 22 Arzneimittel aus fünf verschiedenen Wirkstoffklassen für die Behandlung der HIV-Infektion zugelassen (Tab. 2.3).

Neben neuen, patientenfreundlicheren Formulierungen eines Wirkstoffes zur einmal täglichen Anwendung steht auch eine Fix-Kombination aus zwei NRTI (Tenofovir und Emtricitabin) und einem NNRTI (Efavirenz) in einer Tablette (Atripla®) zur einmal täglichen Einnahme zur Verfügung.

Tab. 2.3: Zusammenfassung aller bisher zugelassenen HIV-Medikamente

Wirkstoffklasse	Wirkstoffname, Abkürzung	Handelsname
Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI)	Zidovudin, AZT	Retrovir®
	Didanosin, ddl	Videx®
	Stavudin, d4T	Zerit®
	Lamivudin, 3TC	Epivir®
	Abacavir, ABC	Ziagen®
	Emtricitabin, FTC	Emtriva®
	Tenofovir, TDF	Viread®
Nicht Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI)	Nevirapin, NVP	Viramune®
	Efavirenz, EFV	Sustiva®, Stocrin®
	Etravirin, TMC125	Intelence®
Protease Inhibitoren (PI)	Saquinavir, SQV	Fortovase® /Invirase® 500
	Ritonavir, RTV	Norvir®
	Indinavir, IDV	Crixivan®
	Nelfinavir, NFV	Viracept®
	Fosamprenavir, FPV	Telzir®
	Lopinavir (mit RTV)	Kaletra®
	Atazanavir, ATV	Reyataz®
	Tipranavir, TPV	Aptivus®
	Darunavir, DRV	Prezista®
Fusions Inhibitoren	Enfuvirtid, ENF/T-20	Fuzeon®
	Maraviroc, MCV	Celsentri®
Integrase Inhibitoren	Raltegravir, RAL	Isentress®
Kombinationen aus mehreren Wirkstoffen	AZT und 3TC	Combivir®
	AZT, 3TC und ABC	Trizivir®
	EFV, FTC und TDF	Atripla®

2.3.2 Wirkmechanismus der NRTI

Mit Einführung des ersten NRTI, Zidovudin, war 1987 erstmals eine kausale HIV-Therapie möglich. Bis Ende 1998 wurden weltweit weitere NRTI zugelassen - Zalcitabin (ddC), Didanosin (ddl), Stavudin (d4T), Lamivudin (3TC), Abacavir (ABC), Emtricitabin (FTC) und Tenofovir (TDF). Zalcitabin wurde 2006 aufgrund seiner toxischen Eigenschaften vom Markt genommen.

Der antiretrovirale Wirkmechanismus der NRTI wird über die kompetitive Hemmung der Reversen-Transkriptase und einen vorzeitigen DNA-Kettenabbruch vermittelt.

Alle Nukleosid-Analoga werden durch intrazelluläre Phosphorylierung zu ihren aktiven Metaboliten, den Triphosphaten, metabolisiert. Die aktiven Metaboliten konkurrieren mit den physiologischen Nukleotiden um die Substratbindungsstelle des HIV-spezifischen Enzyms Reverse-Transkriptase. NRTI werden als falsche Nukleotidbausteine beim Umschreiben der genetischen Information von RNA in DNA eingebaut. Weitere Nukleotide werden nicht angelagert, weil durch die fehlende 3'OH-Gruppe an der Ribose keine beständigen 5'→ 3' Phosphodiesterbrücken gebildet werden können. Dadurch kommt es zum Kettenabbruch und zum Ende der reversen Transkription. Für jedes der vier endogenen Deoxyribonukleoside wurden Nukleosid-Analoga für die HIV-Therapie entwickelt (Thymidin-, Cytidin-, Guanosin- und Adenosin-Analoga).

2.3.3 Wirkmechanismus der NNRTI

Seit 1997 werden auch NNRTI Delavirdin (DLV, nicht mehr in Deutschland zugelassen), Efavirenz (EFV) und Nevirapin (NVP) in der antiretroviralen Therapie genutzt.

Diese Inhibitoren der Reversen-Transkriptase interagieren ohne Phosphorylierung allosterisch an einer hydrophoben Region nahe der Substratbindungsstelle des Enzyms [33]. Die Bildung eines inaktiven Komplexes führt zur Blockade der katalytisch aktiven Bindungsstelle der Reversen-Transkriptase.

Die physiologischen Liganden können nicht mehr am aktiven Zentrum binden.

Weil NRTI und NNRTI unterschiedliche Angriffspunkte an dem gleichen Enzym haben, wirken beide Substanzklassen synergistisch: Durch Kombination beider Wirkstoffklassen kann die Hemmung der Reversen-Transkriptase verstärkt werden.

2.3.4 Wirkmechanismus der Protease-Inhibitoren

Der Durchbruch in der HIV-Therapie gelang 1996 mit Einführung des ersten Protease-Inhibitors (PI) Saquinavir (SQV). Seitdem sind weitere acht PI zugelassen worden:

Indinavir (IDV), Ritonavir (RTV), Nelfinavir (NFV), Amprenavir/Fosamprenavir (APV/FPV), Lopinavir (LPV), Atazanavir (ATV), Tipranavir (TPV) und Darunavir (DRV).

Der Angriffspunkt dieser Substanzklasse ist die HIV-Protease. Die Funktion der Protease besteht in der Spaltung des gag und gag-pol Vorläuferproteins in die Strukturproteine und viralen Enzyme (siehe Tab. 2.1). Als Ergebnis dieser Proteinspaltung entstehen reife infektiöse Viruspartikel mit funktionsfähigen viralen Strukturproteinen und Enzymen. Wird die HIV-Protease jedoch durch PI blockiert, können keine funktionsfähigen und infektiösen Viren neu synthetisiert werden. [34].

2.3.5 Wirkmechanismus der viralen Fusions-Inhibitoren

Der Eintritt des HI-Virus in die CD4-Zelle bietet drei verschiedene Ansatzpunkte für eine medikamentöse Therapie - die Bindung des Virus an den CD4-Rezeptor, die Bindung an Ko-Rezeptoren und die Fusion des Virus mit der Zelle.

Seit 2003 ist Enfuvirtid (ENF, T-20) als erster Fusions-Inhibitor in Europa für die Therapie von vorbehandelten HIV-Patienten zugelassen.

ENF ist ein Peptid, das aus 36 Aminosäuren aufgebaut ist und an eine Intermediärstruktur des viralen Proteins gp41 bindet. Diese Intermediärstruktur entsteht bei der Fusion des HI-Virus mit der CD4-Zelle, so dass die Aufnahme des Virus in die Zelle blockiert wird.

Bei der Bindung des HI-Virus an den CD4-Rezeptor (durch gp120 an den CXCR4- oder den CCR5-Korezeptor) findet eine Konformationsänderung des gp41 statt, ohne die das HI-Virus nicht in die Zelle eindringen kann. CXCR4 fungiert als Ko-Rezeptor für HI-Viren, die T-Zellen infizieren (T-trope Viren), während CCR5 als Ko-Rezeptor für Viren agiert, die vorwiegend Makrophagen infizieren (M-trope Viren). Zu Beginn einer HIV-Infektion weisen etwa 80 % der Viren einen CCR5-Tropismus auf, der häufig im Krankheitsverlauf wechselt [35]. Maraviroc (siehe Tab. 2.3) ist der erste zugelassene CCR5-Antagonist, der die Interaktion zwischen den natürlichen Liganden MIP sowie RANTES und dem CCR5-Rezeptor blockiert und somit den Eintritt des HI-Virus in die Zelle verhindert.

2.3.6 Wirkmechanismus der Integrase-Inhibitoren

Die Genexpression der viralen DNA ist erst nach deren Integration in das Wirtszellgenom möglich. Dieser Vorgang wird durch die vom HI-Virus kodierte Integrase vermittelt und bietet somit einen weiteren Angriffspunkt für eine medikamentöse Therapie. Raltegravir (RAL) ist der erste zugelassene Wirkstoff dieser Substanzklasse und blockiert den so genannten Strangtransfer [36]. Dabei wird das Andocken und die irreversible Bindung der Hydroxylenden der viralen DNA an die Phosphodiesterbrücken der Wirtszell-DNA blockiert und somit der vollständige HIV-Replikationsmechanismus verhindert.

2.4. Thymidin-Analoga als Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren

2.4.1 Struktur der Thymidin-Analoga

Für die HIV-Therapie stehen derzeit zwei Thymidin-Analoga zur Verfügung, die beiden NRTI Zidovudin (AZT) und Stavudin (d4T).

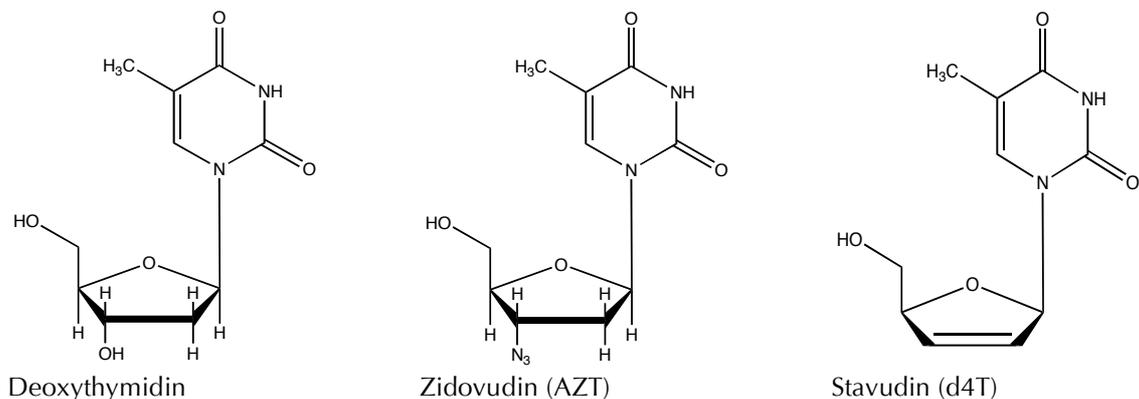


Abb. 2.5: Strukturformeln der Thymidin-Analoga

Strukturformeln des Deoxythymidins und der daraus modifizierten Thymidin-Analoga Zidovudin und Stavudin.

2.4.2 Pharmakokinetik von Zidovudin und Stavudin

Nach oraler Einnahme erfolgt die Resorption von AZT im Magen-Darm-Trakt sehr schnell und vollständig durch passive Diffusion. Die Resorption von AZT ist durch Zeitpunkt und Zusammensetzung der Nahrungsaufnahme beeinflussbar. Deshalb sollte Zidovudin nüchtern verabreicht werden.

AZT hat einen ausgeprägten first-pass Metabolismus. Die Bioverfügbarkeit beträgt ca. 60-70 %.

Zidovudin wird in der Leber durch 5'-Glucuronidierung zum Hauptmetaboliten AZT-Glucuronid (GZDV) verstoffwechselt, das über die Nieren ausgeschieden wird. Weitere Metaboliten sind 3'-Amino-3'-Deoxythymidin (AMT) und 5'-O-Glucuronid GAMT.

14-20 % des unverstoffwechselten AZT und 60-75 % des Hauptmetaboliten werden über den Urin ausgeschieden [37, 38].

Tab. 2.4: Physikalische, chemische und pharmakologische Eigenschaften von Zidovudin (AZT)

Medikament	AZT
Chemischer Name	3'-azido-3'-Deoxythymidin
Summenformel	$C_{10} H_{13} N_5 O_4$
Molekulargewicht	267,25 g/mol
Löslichkeit	20 mg/ml in Wasser bei 25°C
Bioverfügbarkeit	65%
Proteinbindung	20 %
Verteilungsvolumen	1,6 L/kg
T_{max}	0,5 – 1,0 h
Serum $T_{1/2}$	1,0 – 1,5 h
Tagesdosis/Intervall	300 mg BID
Nahrungseffekte	nüchtern

AZT wird intrazellulär an der 5'-Position durch die Thymidin-Kinase zum AZT-Monophosphat (AZT-MP) phosphoryliert.

Danach erfolgt die Umwandlung zum AZT-Diphosphat (AZT-DP) durch die Thymidilat-Kinase. Anschließend wird der intrazellulär aktive Metabolit, AZT-Triphosphat (AZT-TP), durch die unspezifische Nukleosiddiphosphat-Kinase (5'-NDP-Kinase) phosphoryliert. AZT-MP wird bei der Metabolisierung zum aktiven Metaboliten am häufigsten gebildet, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist jedoch die Bildung des AZT-DP [37, 39].

Nach oraler Einnahme wird d4T vollständig resorbiert und ist mit ca. 82-100 % bioverfügbar. D4T wird zu ca. 40 % unverändert über den Urin ausgeschieden.

Ob die restlichen 60 % metabolisiert werden, ist nicht abschließend geklärt [40-42].

Tab. 2.5: physikalische, chemische und pharmakologische Eigenschaften von Stavudin (d4T)

Medikament	d4T
Chemischer Name	2',3'-Didehydro- oder 3'-Deoxythymidin
Summenformel	$C_{10} H_{12} N_2 O_4$
Molekulargewicht	224,22 g/mol
Löslichkeit	80 mg/ml in Wasser bei 23°C
Bioverfügbarkeit	90 %
Proteinbindung	1 %
Verteilungsvolumen	1,0 L/kg
T_{max}	0,5 – 0,7 h
Serum $T_{1/2}$	21,3 h
Tagesdosis/Intervall	40 mg BID

D4T wird über die gleichen Enzyme wie AZT über das 5'-Monophosphat und 5'-Diphosphat zum aktiven Metaboliten Stavudin-Triphosphat (d4T-TP) umgewandelt. Im Gegensatz zum AZT stellt bei d4T die Bildung des d4T-MP den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar [39-42].

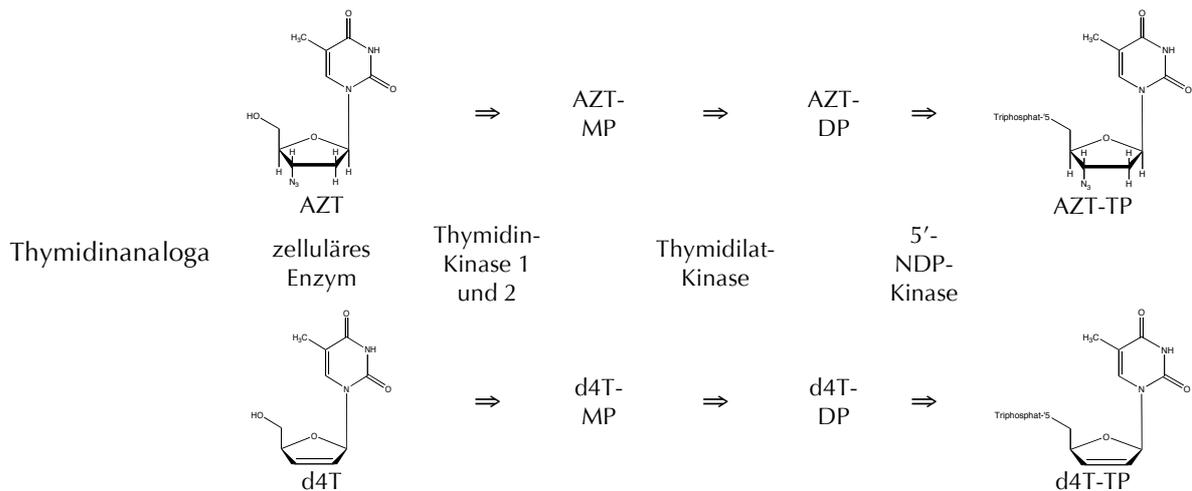


Abb. 2.6: Zelluläre Phosphorylierung der Thymidin-Analoga in ihre jeweiligen aktiven Metaboliten. Die Abkürzungen sind im Text erklärt.

2.4.3 Zelluläre Toxizität und zelluläres Interaktionspotential von AZT und d4T

Alle NRTIs werden erst durch intrazelluläre Phosphorylierung zu ihren aktiven Metaboliten, den Triphosphaten, umgewandelt.

Die Nebenwirkungen, die nach einer Langzeittherapie mit NRTIs auftreten können, beinhalten Hyperlaktatämie, Laktatazidose, Hepatomegalie mit Steatose, periphere Neuropathie, Myopathie und Kardiomyopathie, Ototoxizität, Zytopenie, Pankreatitis und Lipotrophie [43]. Diese Toxizitäten werden auf eine mögliche Inhibition der humanen DNA-Polymerase- γ durch AZT-TP und d4T-TP zurückgeführt [44, 45]. DNA-Polymerase- γ wird in den Mitochondrien für die Synthese der mitochondrialen DNA (mtDNA) verwendet. Die kompetitive Hemmung der DNA-Polymerase- γ führt zu einer verminderten Anzahl an Proteinen der mitochondrialen Atmungskette. Die Beeinträchtigung der aeroben Atmung induziert oxidativen Stress, steigert die Anzahl von Mutationen in der mtDNA und führt letztendlich zu einer hypoxischen Gewebsschädigung [46].

Neben zellulären Toxizitäten sind auch intrazelluläre Interaktionen bei der Therapie mit NRTIs von klinischer Bedeutung.

Weil NRTI erst durch intrazelluläre Phosphorylierung in ihre aktive Wirkform überführt werden, unterliegen sie der Beeinflussung durch verschiedenen interne und externe Faktoren: Interne Faktoren sind der Plasmaspiegel des inaktiven Medikaments, der Zelltyp, Zellzyklus, das Verhältnis zwischen endogenen Triphosphaten und Wirkstoff-Triphosphaten, der Grad der Dephosphorylierung sowie intrazelluläre Arzneimittel-Interaktionen. Externe Faktoren sind der Aktivierungsstatus der Zellen (stimuliert oder ruhend), der Status oder das Stadium der HIV-Infektion oder das Geschlecht[39]. So wurde beispielsweise in klinischen Studien gezeigt, dass die intrazelluläre AZT-TP-Konzentration bei Frauen bis zu doppelt so hoch ist wie bei Männern [47, 48]. „In vitro“ senkt AZT bei gleichzeitiger Gabe mit d4T die Konzentration von d4T-TP aufgrund der Konkurrenz um die intrazelluläre Phosphorylierung zum Triphosphat [49-51].

Ko-Infektionen von HIV-Patienten mit Hepatitis-, Herpes-, und Zytomegalie-Viren erfordern aufgrund potentieller Arzneimittelinteraktionen eine sorgfältige Abklärung im Hinblick auf deren klinische Relevanz. Obwohl Ribavirin *in vitro* die intrazelluläre Phosphorylierung von AZT reduziert [52], hat Ribavirin *in vivo* keinen Einfluss auf die antiretrovirale Aktivität von AZT [53]. Ähnliche Effekte wurden auch für das d4T beschrieben [53-55].

Das unterstreicht die Bedeutung von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen, bei denen neben der Pharmakokinetik der NRTI im Plasma auch die intrazelluläre Pharmakokinetik bestimmt wird. Untersuchungen der intrazellulären Pharmakokinetik sind insbesondere bei der Neuentwicklung von NRTIs erforderlich: So wurde bei der Entwicklung von Apricitabin, einem neuen NRTI, gezeigt, dass die intrazelluläre Phosphorylierung von Apricitabin durch die gleichzeitige Kombination mit Lamivudin gehemmt wird, so dass die AUC von Apricitabin 15 % niedriger ist als bei alleiniger Gabe von Apricitabin. Daher wird empfohlen, Apricitabin nicht mit Cytidin-Analoga zu kombinieren [12].

Auch die Untersuchung der zellulären Halbwertszeiten führte zu einer klinisch relevanten Anwendungsempfehlung, d.h. einer Änderung der Dosisfrequenz der NRTI: Weil NRTI eine relativ geringe Plasmahalbwertszeit besitzen, wurden die Wirkstoffe zunächst dreimal täglich verabreicht. Untersuchungen in Lymphozyten ergaben jedoch, dass die NRTI in Lymphozyten wesentlich länger persistieren. Daher wurde die Dosisfrequenz auf eine zweimal tägliche Gabe angepasst.

2.5 Fosalvudin Tidoxil, ein neues Thymidin-Analogon

2.5.1 Struktur von Fosalvudin

Fosalvudin Tidoxil ist ein antiretrovirales Thymidin-Analogon aus der Gruppe der NRTI und besteht aus Alovudin-Monophosphat (3'-Deoxy-3'-fluorothymidin-Monophosphat, FLT-MP) und einem kovalent gebundenen lipophilen Trägermolekül.

Die Firma Heidelberg Pharma hat das Pro-Drug Fosalvudin Tidoxil (HDP 99.0003) unter Verwendung einer firmeninternen Technologie aus dem sehr toxischen Wirkstoff Alovudin (3'-Deoxy-3'-fluorothymidin, FLT) entwickelt. Fosalvudin wird derzeit in klinischen Phase-II Studien bei Patienten eingesetzt, die eine NRTI-multiresistente HIV-1 Infektion aufweisen.

Obwohl die hervorragende antiretrovirale Aktivität von Alovudin gegen HIV-1 und multiresistenten Varianten von HIV-1 im Vergleich zu AZT in zahlreichen Studien nachgewiesen wurde, entwickelten sich *in vivo* gravierende Toxizitäten [56-63]. Diese Toxizitäten sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Alovudin DNA Fragmentationen induziert, die zur Apoptose führen [64].

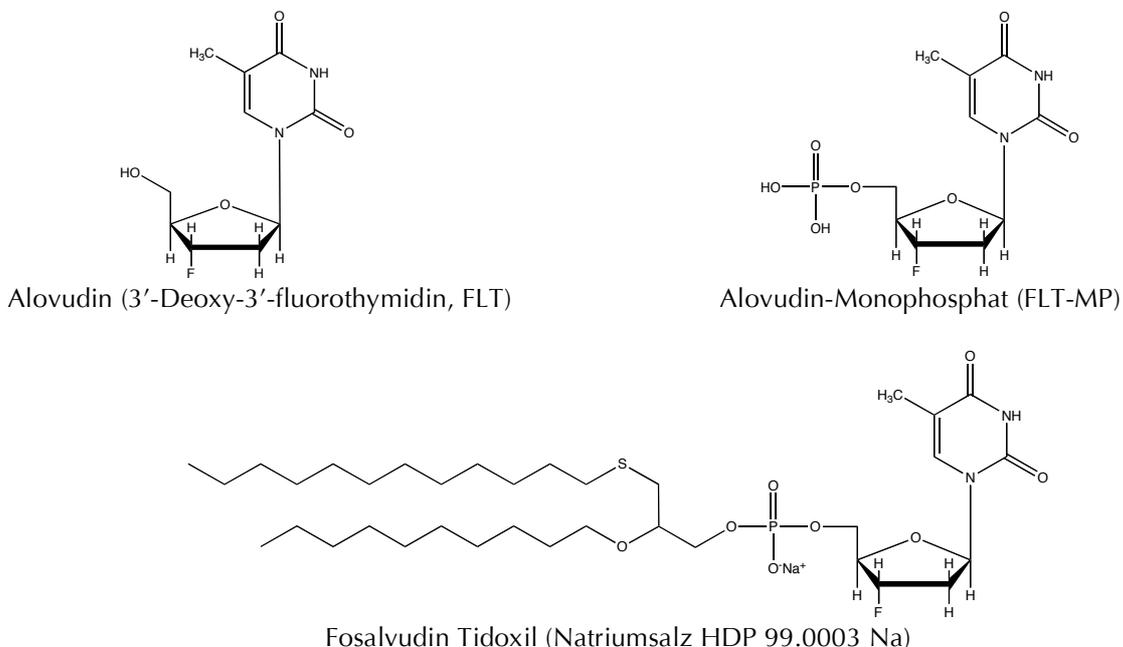


Abb. 2.7: Strukturformeln von FLT, FLT-MP und Fosalvudin Tidoxil (Natriumsalz)

Strukturformeln der einzelnen Komponenten, aus denen sich der Wirkstoff Fosalvudin Tidoxil zusammensetzt.

2.5.2 Dosierung von Fosalvudin

Fosalvudin ist eine neue antiretrovirale Substanz die sich in Phase-II der klinischen Entwicklung befindet (Stand September 2008). Die Substanz wurde in einer täglichen Dosierung von 10, 20 und 40 mg bei Patienten untersucht, die eine NRTI-multiresistente HIV-1 Infektion haben [65]. AZT wird zweimal täglich verabreicht, bei einer Dosis von 250 mg. D4T wird bei einer Dosis von 40 mg ebenfalls zweimal täglich gegeben. Damit liegt die tägliche Dosis von Fosalvudin deutlich unter der Dosis der beiden anderen Thymidin-Analoga.

2.5.3 Pharmakologie von Fosalvudin

Die Pharmakokinetik wurde bisher *in vitro*, in Tierversuchen, in einer klinischen Phase-I Studie mit 24 Patienten und in einer ersten klinischen Phase-II Studie an 43 Patienten untersucht [66-68]. Die bisher publizierten physikalischen, chemischen und pharmakologischen Eigenschaften von Fosalvudin sind in Tab. 2.6 dargestellt.

Bei Untersuchungen an Mäusen entdeckte man geringe Konzentrationen von Fosalvudin im Fettgewebe und im Knochenmark. Dies spricht für eine niedrige toxische Wirkung von Fosalvudin auf das blutbildende System [67]. In der ersten Phase-II Studie wurde eine Dosis-abhängige Wirkung von Fosalvudin nachgewiesen. Bei therapienaiven HIV-Patienten konnte die Viruslast innerhalb von zwei Wochen mit zunehmender Dosis um bis zu 90 % gesenkt werden im Vergleich zur Placebo-Gruppe [66].

Fosalvudin wird durch die zelluläre Thymidin-Kinase 1 zum FLT-MP anabolisiert [69], dann folgt die Bildung des Diphosphates und anschließend die Umwandlung zum FLT-TP, dem aktiven Metaboliten. *In vitro*-Versuche ergaben ein Verteilungsmuster, bei dem FLT-MP mit 40-76 % gebildet wurde, FLT-DP mit 8-23 % und FLT-TP mit 12-40 % [58].

Tab. 2.6: Physikalische, chemische und pharmakologische Eigenschaften von Fosalvudin

Wirkstoff	Fosalvudin
Chemischer Name	3'-Deoxy-3'-fluorthymidylsäure, mono [(3-dodecylthio-2-decyloxy) propyl] ester, Natriumsalz
Summenformel	C ₃₅ H ₆₃ N ₂ O ₈ F P S Na
Molekulargewicht	744,93 g/mol
Kurzbeschreibung	Weißes geruchsloses Pulver
Aggregatzustand	fest
Löslichkeit	> 150 mg/ml in Wasser (Gel)
Proteinbindung	95 %
T _{max}	6-7 h
Plasma T _{1/2}	5-6 h

2.5.4 Nebenwirkungen von Fosalvudin

Fosalvudin wurde in der ersten Phase-II Studie an therapienaiven HIV-1 Patienten gut vertragen. Es traten nur leichte Nebenwirkungen wie Brechreiz, Übelkeit, Durchfall und Kopfschmerzen auf [66].

2.6 Methoden zur quantitativen intrazellulären Messung von Thymidin-Analoga

Die Messung von intrazellulären Triphosphaten erfordert ein hoch sensitives Messverfahren mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze, weil die zu messenden Analyten nur im Femtomolbereich pro Million Zellen vorliegen.

Weltweit beschäftigen sich nur wenige Arbeitsgruppen mit dieser Analytik. Daher ist die Datenlage limitiert und nur eine begrenzte Anzahl von validierten Methoden verfügbar, die teilweise keine internen Standards verwenden.

Die meisten Methoden basieren auf einer indirekten Messung der Triphosphate.

Bei diesem Verfahren werden AZT-TP oder auch d4T-TP über eine Festphasenextraktion aufgereinigt, enzymatisch dephosphoryliert und als AZT oder d4T quantifiziert. Die Detektion erfolgt mit Radioimmunoassays [70-74] oder über LC-MS/MS [75-77]. Gegenüber einer direkten Messung haben diese Methoden den Nachteil, dass sie viele Schritte beinhalten, die zu einer größeren Messungenauigkeit führen und sehr zeitaufwendig sind.

Bei der direkten Quantifizierungsmethode werden AZT-TP oder d4T-TP durch Ionenaenchromatographie getrennt und mit einem Tandemmassenspektrometer nachgewiesen [78-83]. Allen Methoden geht die Isolierung von humanen Lymphozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation (Buffy-Coat) voraus, aus denen die Triphosphate extrahiert werden. Die Zellen werden mit einem internen Standard versetzt und durch eine eiskalte Lösung aus Tris-HCl (0,05 M pH 7,4)/Methanol 30:70 V/V zerstört, so dass die Analyten direkt im Puffer aufgenommen wurden. Anschließend wird der Überstand bis zu einem Lösungsvolumen von 120 – 150 µl eingedampft. Davon wurden 40 µl direkt über eine Reversed-Phase-HPLC-Säule aufgetrennt und in ein Massenspektrometer injiziert, wo das Zellextrakt zuerst über eine Elektrosprayquelle ionisiert und anschließend im MS fragmentiert wird. Für die Messung von d4T-TP wird die Transition 463 → 159 (m/z) verwendet und für AZT-TP der Massenübergang von 506 → 159 (m/z). Der mit dieser Methode durchschnittlich quantifizierte d4T-TP Spiegel liegt bei 31 fmol/Mio. Zellen (0 – 99 fmol/Mio. Zellen), der von AZT-TP bei 110 fmol/Mio. Zellen (19.3 – 244 fmol/Mio. Zellen).

Nachteile der quantitativen Bestimmung von AZT-TP bei dieser Messmethode sind Interferenzen durch endogene Triphosphate, die den gleichen Massenübergang 506 → 159 (m/z) besitzen (ATP und dGTP) [81]. Um diese Interferenzen zu vermeiden, entwickelte eine Arbeitsgruppe eine MALDI-TOF Methode, die jedoch nicht in allen Laboren routinemäßig verfügbar ist [84].

Die zelluläre Umsetzung von Alovudin zum Triphosphat ist bisher nur mit radioaktiv markierten (³H)FLT in einem *in vitro* Experiment an MT4-Zellen und in stimulierten humanen Lymphozyten untersucht. Die Auftrennung erfolgte mittels einer HPLC-Methode. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen [58].

2.7 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Wie alle Arzneimittel aus der Substanzklasse der NRTI muss auch Fosalvudin als inaktives Prodrug appliziert und durch zelluläre Enzyme in seine aktive Wirkform, das Triphosphat (FLT-TP), umgewandelt werden. Die europäische Arzneimittelagentur EMA empfiehlt in ihren Richtlinien für die Zulassung von neuen NRTI die Bestimmung der intrazellulären Triphosphatkonzentration. Die Messung der intrazellulären Triphosphatkonzentration gibt Auskunft darüber, wie effektiv die reverse Transkription bei der HIV-Replikation durch das Arzneimittel inhibiert werden kann und ermöglicht somit eine Aussage über den Erfolg einer NRTI-Therapie: bei HIV-positiven Patienten wurde ein Zusammenhang zwischen den intrazellulär gebildeten NRTI-Triphosphaten und dem klinischen Ansprechen auf die Medikation nachgewiesen [85, 86].

Bis dato wurde die intrazelluläre Umwandlung von Fosalvudin in seine aktive Wirkform, FLT-TP, nur in einem „ex vivo“ Experiment an stimulierten humanen Lymphozyten mit radioaktiv markierten FLT untersucht. Als Detektionsmethode wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Die Ergebnisse des Experiments, das von Heidelberg Pharma durchgeführt wurde, sind nicht publiziert.

Ziele dieser Arbeit sind erstens die Entwicklung und Validierung einer Messmethode für den aktiven Metaboliten von Fosalvudin Tidoxil, FLT-TP, auf Grundlage der direkten Quantifizierung von intrazellulären NRTI-Triphosphaten. Diese Methode soll eine einfache Probenaufbereitung und schnelle, zuverlässige Analytik mittels Ionenaarchromatographie gekoppelt an ein Tandemmassenspektrometer sicherstellen. Zweitens soll diese Methode in „ex vivo“ Zellversuchen an stimulierten humanen Lymphozyten überprüft und für die quantitative Bestimmung von intrazellulärem FLT-TP verwendet werden, um im Rahmen einer klinischen Studie von Heidelberg Pharma eine Aussage über die intrazelluläre Pharmakokinetik von FLT-TP treffen zu können.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Material für die LC-MS/MS

Für die LC-MS/MS wurde ein HPLC-System mit folgenden Bestandteilen zur Detektion verwendet: zwei HPLC-Pumpen (Rheos 2000, Flux Instruments AG, Basel und LC-9A, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg), ein Degasser (Rheos CPS-LC, Flux Instruments AG, Basel), ein Probenaufgeber (Gilson 233 XL on-Line Column Switch with 402 Syringe Pump, Gilson, Middleton, USA) und ein API 3000 Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (Darmstadt). Drei HPLC-Säulen wurden getestet: die C8-A 3u Säule, 150 x 2.0 mm, die Säule Pursuit XRs 5-C18, 150 x 2.0 mm und die Säule Pursuit XRs 3-C8, 150 x 2.0 mm der Firma Varian (Darmstadt). Für die validierten Ionenpaarchromatographie-Methoden, die nachstehend beschrieben werden, wurde die Säule Supelcogel ODP-50 5 µm, 150 x 2,1 mm von Sigma Aldrich (Steinheim) verwendet.

Tab. 3.1: Chemikalien für die LC-MS/MS

Bezeichnung	Bezugsquelle
Acetonitril, HPLC Optigrade® Gradient Grade Methanol, HPLC Optigrade® Wasser, LiChrosolv® für die Chromatographie	LGC Standards GmbH, Wesel (D)
Ameisensäure, zur Analyse pH-Set 1, zur Kalibration von pH-Messgeräten	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Ammoniumformiat N,N-Dimethylhexylamin 1,5-Dimethylhexylamin Kaliumchlorid, ACS Ammoniumdihydrogenphosphat 2-Chloradenosin-Triphosphat/ 2Cl-ATP 2',3'-Dideoxycytidin-Triphosphat/ ddC-TP Thymidin 5'-Triphosphat sodium salt/ TTP Cytidin 5'-Triphosphat disodium salt/ CTP Uridin 5'-Triphosphat tris salt/ UTP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
3'-Deoxy-3'-Fluorthymidin-Triphosphat/ FLT-TP Fosalvudin Tidoxil	Heidelberg Pharma GmbH, Ladenburg (D)

3.1.2 Material für die Lymphozyten-Isolation

Die Isolation von humanen Lymphozyten erfolgte mit handelsüblichen Zentrifugenröhrchen unterschiedlicher Größe der Firma Sarstedt (Nümbrecht) und mit CPT-Röhrchen, die Natriumcitrat enthielten (Firma Becton Dickinson, Basel). Für die Zentrifugation wurde eine Hettich Rotixa/P (Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen) mit variabler Temperatureinstellung verwendet. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer (LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf) unter einem Mikroskop der Firma Carl Zeiss Oberkochen (Oberkochen).

Tab. 3.2: Chemikalien für die Lymphozyten-Isolation

Bezeichnung	Bezugsquelle
Biocoll-Trennlösung RPMI-1640 PBS-Dulbecco (1x)	Biochrom AG, Berlin (D)
Sterofundin ISO	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Trypanblau-Lösung, für die Mikroskopie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

3.1.3 Material für die Probenaufbereitung

Zur Probenaufbereitung wurden herkömmliche 1,5 ml und 0,5 ml „Micro tubes“ sowie Pipettenspitzen der Firma Sarstedt (Nümbrecht) und Pipetten (10-100 µl, 50-250 µl) der Firma Eppendorf (Hamburg) verwendet. Des Weiteren kamen bei der Probenaufbereitung ein Vortexer (Heidolph Reax R1, Heidolph, Kelkheim), ein Ultraschall-Wasserbad (Transsonic T460/H, Elma, Singen), eine Zentrifuge (Centra MP4, International Equipment Company, Needham, USA) und ein Vakuumkonzentrator (Helmut Saur GmbH, Reutlingen) mit angeschlossener Vakuumpumpe (Leybold Vakuum GmbH, Köln) zum Einsatz.

3.1.4 Material für den „ex vivo“ Zellversuch

Die Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Sarstedt (Nümbrecht) und Greiner Bio-One (Solingen) bezogen.

Tab. 3.3: Chemikalien für die Zellkultur

Bezeichnung	Bezugsquelle
RPMI-1640	Biochrom AG, Berlin (D)
PBS-Dulbecco (1x)	
FCS	
L-Glutamin (200 mM)	
Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml / 10 mg/ml)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Phytohämagglutinin-M (PHA-M)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)

3.2. Methodenentwicklung zur intrazellulären Analytik von FLT-TP

3.2.1 Das Prinzip der Ionenpaarchromatographie

Die Ionenpaarchromatographie (IPC), auch Mobile-Phase Ionenchromatographie (MPIC) genannt, basiert auf dem Zusatz eines lipophilen Reagenz zur mobilen Phase, das mit den entgegengesetzt geladenen Analyten ein Ionenpaar bildet. Für kationische Analyten werden in der Regel organische Sulfonate mit unterschiedlich langen Alkylresten und Salz-, Perchlor- oder Perfluorsäuren als Ionenpaarreagenz verwendet.

Bei anionischen Analyten werden quartäre Amoniumionen, die in der Hydroxidform vorliegen müssen, als Gegenionen eingesetzt. Das Ionenpaarreagenz hat meist eine hydrophobe Region, die mit der stationären Phase interagiert und eine geladene Region, die mit dem zu trennenden Analyten in Wechselwirkung tritt.

Damit ist es möglich, eine normale Reversed-Phase (RP) Säule für die Trennung zu verwenden. Der Retentionsmechanismus der MPIC ist nicht abschließend geklärt. Hypothesen für drei verschiedene Retentionsmodelle wurden postuliert: Erstens die Bildung des Ionenpaares, zweitens der dynamische Ionenaustausch und drittens die Ionenwechselwirkung.

Beim ersten Modell wird davon ausgegangen, dass das Ionenpaarreagenz mit dem Analyten ein neutrales Paar bildet, das sich anhand der mobilen und der stationären Phase trennt [87]. Die Retentionszeit kann durch Konzentrationsveränderung des organischen Lösungsmittels kontrolliert werden.

Das Modell des dynamischen Ionenaustauschs geht von der Theorie aus, dass die hydrophoben Anteile des Ionenpaarreagenz mit den hydrophoben Komponenten der stationären Phase interagieren und so eine dynamische Ionenaustauschoberfläche bilden. Der Analyt wird aufgrund seiner Interaktion mit dieser Oberfläche retiniert [88-90].

Das dritte Retentionsmodell (Ionenwechselwirkung) postuliert die Ausbildung einer elektrisch geladenen Doppelschicht durch das Ionenpaarreagenz und ein Gegenion an der Oberfläche der stationären Phase [91].

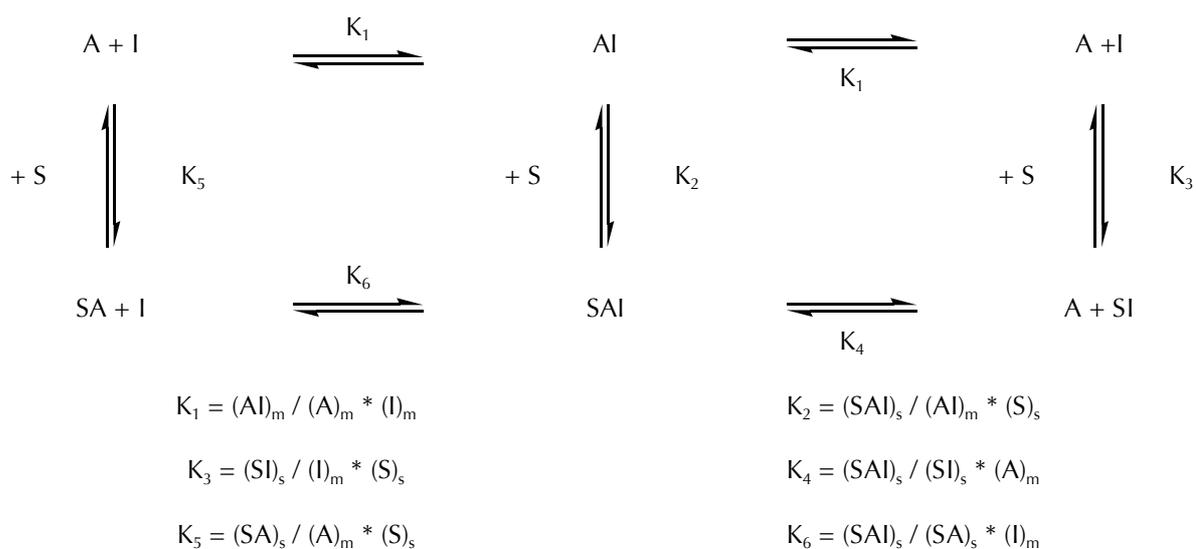


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Gleichgewichtssystems in der MPIC

Dargestellt ist das Gleichgewichtssystem an unpolaren stationären Phasen mit lipophilen Ionen in der mobilen Phase in der Ionenpaarchromatographie mit den entsprechenden Gleichgewichtskonstanten.

(A): Analyt-Ion; (I): lipophiles Ionenpaarreagenz-Ion; (AI): Komplex aus Analyt-Ion mit dem lipophilen Ion des Ionenpaarreagenz; (S): unpolare Oberfläche der stationäre Phase; (SAI): reversible Bindung des (AI)-Komplexes an die stationäre Phase; (SI): Adsorption von (I) an der Oberfläche der stationären Phase; (SA): unabhängige Wechselwirkung des Analyt-Ions mit der unpolaren stationären Phase; (K_{1-6}): Gleichgewichtskonstanten für die jeweiligen Bedingungen; ($_m$ und $_s$): Indices für die mobile oder stationäre Phase; (K_1) und (K_2) beschreiben die Verhältnisse, wenn das Modell der Ionenpaarbildung vorliegt; (K_3) und (K_4) beschreiben die Verhältnisse, wenn das Ionenaustausch-Modell vorherrscht; (K_5) und (K_6) beschreiben die unabhängigen Wechselwirkungen der Ionen mit der stationären Phase

Alle drei Hypothesen charakterisieren Grenzfälle, so dass es nicht möglich ist, den Retentionsmechanismus während der verschiedenen chromatographischen Phasen eindeutig zu beschreiben.

Darüber hinaus ist der Retentionsmechanismus nicht nur von den Wechselwirkungen der Ionen untereinander und mit der stationären Phase abhängig. Dieser Mechanismus wird ebenso durch Art und Konzentration des lipophilen Reagenz, des organischen Lösungsvermittlers in der mobilen Phase und der anorganischen Zusätze beeinflusst. Nicht zuletzt ist die Retention der Analyten vom pH-Wert der mobilen Phase abhängig. Für die polaren negativ geladenen FLT-TP Moleküle wurde das N'N- und das 1,5-Dimethylhexylamin bei einem pH-Wert von 9,0 bei der Entwicklung der chromatographischen Trennung nach dem Prinzip der Ionenpaarchromatographie ausgewählt.

3.2.2 Das Prinzip der ESI-Tandem-Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Analyse von nukleosidischen Triphosphaten müssen die polaren und geladenen Moleküle in Gasphasenionen überführt werden. Für die Überführung der FLT-TP Moleküle in die Gasphase eignet sich das Ionisierungsverfahren der Elektrospray-Ionisierung (ESI), weil in der Regel intakte Analytenmoleküle gebildet werden.

Bei der Elektrospray-Ionisierung wird die zu analysierende Lösung direkt unter atmosphärischem Druck in ein elektrisches Feld gesprüht. Dabei wird die Analytenlösung durch eine Metallkapillare geführt, an deren Spitze eine Spannung von 2-6 kV angelegt ist. Die Spannung kann je nach Analyt positiv oder negativ gewählt werden. Das entstehende elektrische Feld führt zu einer Ladungsseparation an der Oberfläche der Flüssigkeit. Als Ergebnis dieser Ladungsseparation bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss an gleichartig geladenen Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und als feines Aerosol über die Ausbildung des so genannten Taylor-Cones aus der Kapillare quellen. Durch die Zufuhr von Stickstoff und die Aufheizung der Elektrospray-Quelle, wird das Aerosol zunehmend getrocknet. Aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich die Tröpfchengröße, wobei das elektrische Feld auf der Oberfläche der Tröpfchen kontinuierlich zunimmt.

Am Ende dieser Desolvatisierung zerfallen die Tröpfchen, unter dem Einfluss der Abstoßung von gleichartigen Ladungen (Coulomb-Explosionen).

Für die Bildung freier Ionen in der Gasphase existieren zwei Modellvorstellungen - das Charge Residue Model (CRM, Modell des geladenen Rückstands) und das Ion Evaporation Model (IEM, Ionenemissionsmodell):

Das erste Modell geht davon aus, dass beim Desolvatisierungsprozeß immer kleinere Tröpfchen entstehen, die letztendlich ein ionisiertes Analytmolekül freisetzen [92].

Beim Ionenemissionsmodell wird angenommen, dass bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert werden [93].

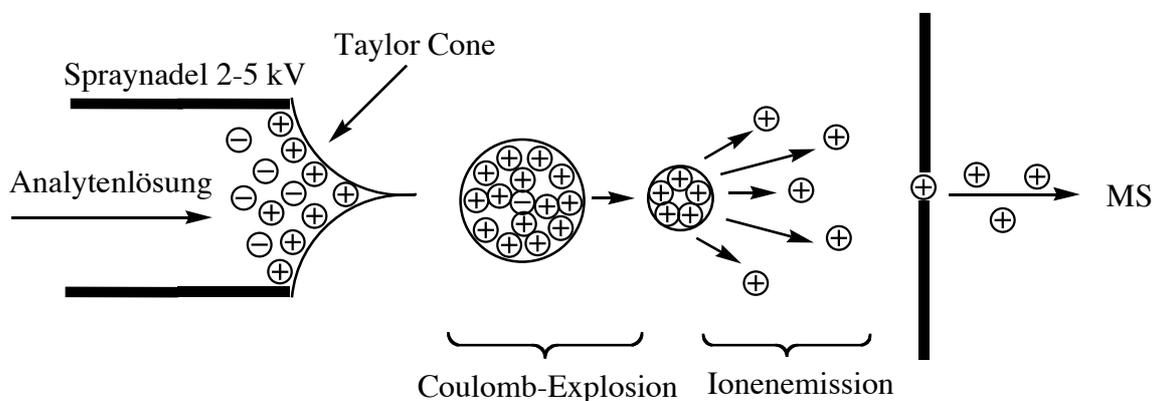


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Ionenbildung bei der Elektrosprayionisierung:

Die Analytenlösung wird durch eine Kapillare geführt, an der eine hohe elektrische Spannung anliegt. Dadurch werden entsprechend der anliegenden Spannung am Ende der ESI-Kapillare positiv geladene Elektrolytionen angereichert. An der austretenden Flüssigkeit bildet sich der Taylor-Cone aus, von dem kleine positiv geladene Tröpfchen abgesondert werden. Die Tröpfchen verringern durch das Verdampfen des Lösungsmittels solange ihre Größe, bis sie letztendlich durch die Coulomb-Explosionen zerfallen und einzelne Ionen emittiert werden, die ins Massenspektrometer gelangen.

Die erzeugten Ionen, $(M+H)^+$ oder $(M-H)^-$, werden durch eine Potentialdifferenz zwischen Sprayerkapillare und Curtainplatte in das MS gelenkt. Weil die Elektrosprayionisation bei atmosphärischem Druck stattfindet und im Massenspektrometer durch spezielle Turbopumpen ein Hochvakuum erzeugt wird, werden die Ionen durch ein Interface in das Massenspektrometer überführt. Dieses Interface besteht aus der Curtainplatte, dem Orifice und dem Skimmer. Zwischen der Curtainplatte und dem Orifice strömt das Curtaingas (Stickstoff) dem Elektrospray entgegen und verhindert das Ansaugen von Neutralteilchen in das Hochvakuum. Durch spezielle elektrische Spannungen, die am Orifice und am Skimmer angelegt sind, werden nur die gewünschten Ionen zu den Quadrupolen durchgeleitet.

Ein Quadrupol besteht aus vier Metallstäben, die so angeordnet sind, dass die gegenüberliegenden Paare (180°) elektrisch miteinander verbunden sind. Zwischen diesen Stäben liegt eine Spannung an, die gleichermaßen aus einer Wechselspannung (RF) und einer Gleichspannung (DC) besteht. Durch die spezielle Einstellung der Spannungen werden nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) durch die Metallstäbe zum Detektor geleitet. Alle anderen Ionen kollidieren aufgrund ihrer instabilen Flugbahn mit den Metallstäben und den Stickstoffteilchen. Dadurch können diese Ionen nicht zum Detektor durchdringen. Für die Analyse der FLT-TP Ionen wurde ein API 3000 Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems verwendet. Das API 3000 ist aus drei Quadrupolen aufgebaut. Die Ionen werden nach Eintritt durch das Interface über einen Ionen-Guide Quadrupol (Q0 und Stubbies) unter bestimmten Frequenzen zum ersten Massenfilter Q1 weitergeleitet. Q1 arbeitet nur auf einer fest eingestellten Frequenz und filtert demzufolge nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert heraus (Precursor- oder Parent-Ion), die dann in die Kollisionszelle (Q2, zweiter Quadrupol) gelassen werden. Q2 wird hier nicht als Massenfilter genutzt, sondern induziert die Fragmentation der Ionen durch die Kollision mit einströmendem Stickstoff (CID, collision-induced dissociation). Die spezifisch fragmentierten Ionen werden schließlich im letzten Quadrupol (Q3) noch einmal anhand ihres m/z -Wertes gefiltert (Produkt-Ion) und zum Detektor überführt.

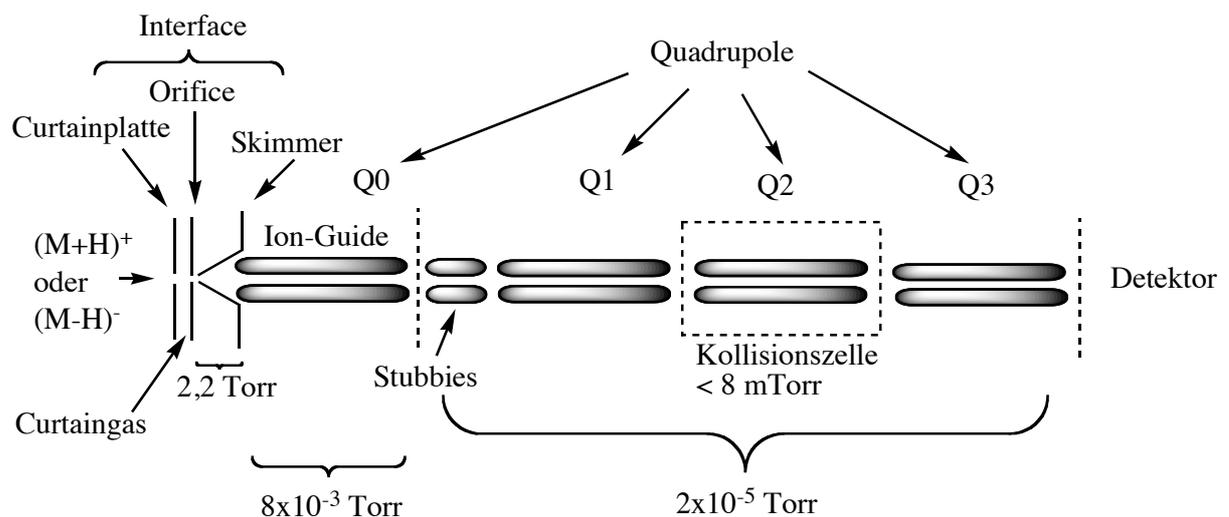


Abb. 3.3: Prinzipieller Aufbau eines „Triple Quadrupol“ Massenspektrometers

Die einzelnen Bezeichnungen und Vorgänge werden im Text beschrieben.

Durch die spezielle Anordnung der Quadrupole ist es möglich, sowohl nach den Mutterionen (Q1-Scan) als auch nach den Produktionen (Q3-Scan) zu suchen und diese aufgrund ihres spezifischen m/z - Wertes zu quantifizieren.

3.2.3 Optimierung der MS-Bedingungen für das FLT-TP und den internen Standard

FLT-TP hat ein Molekulargewicht von 484,16 g/mol und ist aufgrund seiner Phosphatgruppen negativ geladen. Deshalb wurde für die Entwicklung der Analytik am Massenspektrometer der negative Modus gewählt. Für die Quantifizierung des FLT-TP liefen zwei interne Standards mit, zum einen das ddC-TP mit einem Molekulargewicht von 451,20 g/mol und das 2Cl-ATP mit einer Masse von 541,68 g/mol. Alle NRTI-Triphosphate und alle endogenen Triphosphate fragmentieren unter diesen Bedingungen in mehrere Tochterionen. Dabei führt die Abspaltung des Pyrophosphates zu einem Fragment der Masse von 159 g/mol. Dieses Fragment zeigt jeweils die höchste Signalintensität. Obwohl dieser Massenübergang nicht substanzspezifisch für die einzelnen Triphosphate ist, wurde diese Transition zusätzlich zu den signalärmeren Massenübergängen mit in die MS-Methode aufgenommen. Durch die Kombination der substanzspezifischen Transition mit der 159 m/z Transition, können die drei Analyten besser von anderen endogenen Interferenzen differenziert werden.

Die Einstellung des Massenspektrometers für die Analyse von FLT-TP erfolgt in zwei Stufen: Erstens die Optimierung der stoffspezifischen Parameter, die für jeden Analyten oder den internen Standard separat eingestellt werden müssen. Zweitens werden die gruppenspezifischen Parameter für die Analyten und den internen Standard gemeinsam optimiert.

Bei der Einstellung der substanzspezifischen Parameter wurde das Declustering Potential (DP), das Focusing Potential (FP), das Entrance Potential (EP), die Collision Energy (CE) und das Collision Cell Exit Potential (CXP) für FLT-TP und die verwendeten internen Standards optimiert. Bei den gruppenspezifischen Parametern wurden die Temperatur (Tem), das Nebulizergas (NEB), das Curtaingas (CUR), das Kollisionsgas (CAD), die Ionenspray Spannung (IS), das Messzeitfenster (Dwell) und die Auflösung für Q1 und Q3 eingestellt.

Mit diesen Parametern wurde anschließend ein Precursor-Ion Scan (Q1-Scan) und ein Produkt-Ion Scan (Q3-Scan) durchgeführt.

Für diesen Versuch wurde die vorläufige mobile Phase zu gleichen Anteilen über ein T-Stück mit der jeweils zu optimierenden Triphosphatlösung mit Hilfe einer Infusionsspritzenpumpe direkt in die Quelle des Massenspektrometers injiziert, und eine manuelle Einstellung der Parameter über die Analytsoftware durchgeführt. In Tab. 3.4 sind die Versuchsbedingungen zur Einstellung der Parameter für das FLT-TP und die beiden internen Standards am MS dargestellt.

Tab. 3.4: Versuchsaufbau für die Optimierung der MS-Bedingungen

Lösungen	Zusammensetzung
Mobile Phase A	3 mM Ammoniumformiat 10 mM N’N-Dimethylhexylamin H ₂ O pH 9,0
Mobile Phase B	6 mM Ammoniumformiat 20 mM N’N-Dimethylhexylamin H ₂ O/ACN 50/50 (v/v) pH 9,0
FLT-TP	10000 ng/ml gelöst in 100 % H ₂ O, versetzt mit 10 µl HCOOH (10 %)
ddC-TP (interner Standard)	10000 ng/ml gelöst in 100 % H ₂ O, versetzt mit 10 µl HCOOH (10 %)
2Cl-ATP (interner Standard)	10000 ng/ml gelöst in 100 % H ₂ O, versetzt mit 10 µl HCOOH (10 %)

Die Tabellen 3.5 – 3.7 zeigen die jeweiligen Massenübergänge und die dazugehörigen substanzspezifischen Parameter von FLT-TP, ddC-TP und 2Cl-ATP.

Tab. 3.5: Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für FLT-TP

Substanz	Q1 Masse	Q3 Masse	Dwell(msec)	Parameter	Volt (V)
FLT-TP	483,10	385,10	150,00	DP	-50,00
				FP	-170,00
				EP	-14,00
				CE	-30,00
				CXP	-20,00
FLT-TP	483,10	159,00	150,00	DP	-50,00
				FP	-170,00
				EP	-14,00
				CE	-40,00
				CXP	-5,00

Tab. 3.6: Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für ddC-TP

Substanz	Q1 Masse	Q3 Masse	Dwell(msec)	Parameter	Volt (V)
ddC-TP	450,20	352,10	150,00	DP	-64,00
				FP	-225,00
				EP	-9,00
				CE	-25,00
				CXP	-30,00
ddC-TP	450,20	159,00	150,00	DP	-64,00
				FP	-225,00
				EP	-9,00
				CE	-25,00
				CXP	-10,00

Tab. 3.7: Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für 2Cl-ATP

Substanz	Q1 Masse	Q3 Masse	Dwell(msec)	Parameter	Volt (V)
2Cl-ATP	539,90	442,20	150,00	DP	-65,00
				FP	-230,00
				EP	-10,00
				CE	-30,00
				CXP	-25,00
2Cl-ATP	539,90	159,00	150,00	DP	-65,00
				FP	-230,00
				EP	-10,00
				CE	-40,00
				CXP	-17,00

Die gruppenspezifischen Parameter, die für alle drei verwendeten Substanzen eingestellt wurden, sind in Tab. 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.8: Gruppenspezifische Einstellungen des MS

Parameter	optimierter Wert
Nebulizer Gas	13,00
Curtain Gas	10,00
Ionen Spray	-4200,00 V
Cad Gas	4,00
Period time	10 min
Scan Type	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Polarity	Negative
Resolution Q1	Unit
Resolution Q3	Low
Quellentemperatur	450°C
Software	Analyst 1.2

3.2.4 Entwicklung der HPLC für das FLT-TP

Bevor intrazelluläres FLT-TP mit Hilfe des Massenspektrometers analysiert werden konnte, musste das Triphosphat chromatographisch aufgereinigt, von den beiden internen Standards getrennt und innerhalb einer adäquaten Retentionszeit von der Säule eluiert werden. Die beiden gewählten internen Standards sollten das FLT-TP chromatographisch einrahmen. Dafür wurde zunächst mit dem reinen Triphosphatgemisches eine HPLC-Methode mit der Ionenpaarchromatographie entwickelt. Weil bei dieser Analytik die intrazellulären Triphosphate im Femtomolbereich quantifiziert werden sollten, wurde eine Stammlösung von 200 ng/ml FLT-TP in reinem Wasser hergestellt. Diese Konzentration entspricht ungefähr $1721 \text{ fmol} \cdot 10^6$ ausgehend von sechs Millionen Zellen.

Bei der Methodenentwicklung wurden drei verschiedene Umkehrphase-Säulen von der Firma Varian getestet. Dazu gehörten eine Polaris C8-A 3u Säule, 150 x 2.0 mm; eine Pursuit XRs 3-C8, 150 x 2.0 mm und eine Pursuit XRs 5-C18, 150 x 2.0 mm. Außerdem wurden verschiedene Ionenpaarreagenz-Konzentrationen (N'N-DMHA: 5-30 mM), pH-Werte (8,0-9,5) und Gradienten (60-75 % B) für den Zusammenfluss der mobilen Phasen getestet. Zusätzlich zu den mobilen Phasen wurde das Massenspektrometer mit einer Mischung aus gleichen Anteilen Wasser und Methanol über eine weitere Pumpe mit einer Flussrate von 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ gespült.

Als Ergebnis dieser Methodenentwicklung wurde die chromatographische Trennung von FLT-TP mit der Pursuit XRs 5-C18 RP-Säule, einer 20 μl Schleife und den unten aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tab. 3.9: Zusammensetzung der mobilen Phasen A und B

Mobile Phase	Zusammensetzung
mobile Phase A	30 mM N'N-Dimethylhexylamin 9 mM Ammoniumformiat H ₂ O pH 9
mobile Phase B	60 mM N'N-Dimethylhexylamin 18 mM Ammoniumformiat H ₂ O/ACN 50/50 (v/v) pH 9

Tab. 3.10: Gradient der mobilen Phasen für die FLT-TP Analytik

Zeit (min)	A (%)	B (%)	Flussrate (µl/min)
0,00	98	2	200
0,10	98	2	200
2,30	30	70	200
5,10	30	70	200
5,20	98	2	200
6,10	98	2	200
15,00	98	2	200

3.2.5 Prüfung der entwickelten FLT-TP Bedingungen an der biologischen Matrix

FLT wird nach dem Transport in die Zelle durch körpereigene Kinasen zum aktiven Metaboliten FLT-Triphosphat (FLT-TP) phosphoryliert. Um den Wirkstoffspiegel intrazellulär bestimmen zu können, müssen für die Entwicklung der ionenchromatographischen Methode Lymphozyten aus humanem Vollblut isoliert werden. Im Anschluss daran erfolgen die Validierung der Methode, die Herstellung von Kalibrationskurven und Durchführung von Qualitätskontrollen. Dazu werden die Lymphozyten mit FLT-TP und den internen Standards versetzt, um die spätere Anwendung der Methode an Proben aus einem Zellversuch und der klinischen Studie zu simulieren. Danach müssen die zu analysierenden Triphosphate aus den Lymphozyten extrahiert und für den Nachweis am Massenspektrometer aufbereitet werden.

3.2.5.1 Lymphozyten-Isolation aus Buffy-Coats

Die Methode beruht auf einer Dichtegradientenzentrifugation, bei der die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte getrennt werden. Biocoll hat mit 1,077 g/ml eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten sowie eine geringere als Erythrozyten und Granulozyten.

Zur Isolierung wurden jeweils 7,5 ml heparinisertes Blut 1:1 mit PBS verdünnt. In einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 4 ml Biocoll vorgelegt und mit 10 ml des verdünnten Blut-PBS-Gemisches vorsichtig überschichtet, so dass sich die zwei Schichten nicht vermischten. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 2950 rpm über 25 min bei 4°C.

Danach liegen drei Zellschichten vor: im oberen Teil des Zentrifugenröhrchens ist das Blutplasma, im mittleren Teil eine Schicht mit einem Lymphozytenring auf der Biocoll-Lösung, und im unten Teil sind Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und die toten Zellen.

Nach Absaugen der mittleren Lymphozytenschicht werden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 1200 rpm bei 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die einzelnen Zellpellets werden gepoolt, und das erhaltene Zellpellet in 1 ml PBS wird resuspendiert. Davon wurden 100 µl zur Zellzahlbestimmung mit Trypanblau angefärbt und mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Der restliche Teil der Suspension wurde in je sechs Millionen Zellen aliquotiert und anschließend bei 2900 rpm über 5 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig komplett abgesaugt und die Zellen bei -25°C eingefroren.

Im weiteren Verlauf wurden die Zellen lysiert, um FLT-TP möglichst vollständig aus den Lymphozyten zu extrahieren. Dafür wurde zunächst eine Lösung zur Zell-Lyse hergestellt, welche die beiden internen Standards enthielt, damit diese simultan zum FLT-TP alle Extraktionsschritte durchliefen. Anhand des nachfolgenden Protokolls wurden die lysierten Lymphozyten für die Analyse am Massenspektrometer aufbereitet.

Tab. 3.11: Zusammensetzung der internen Standardlösung (iS) für die Zell-Lyse

Bestandteile

60 mM N'N-Dimethylhexylamin
MeOH/H₂O 70/30 (v/v)
5000 ng/ml ddC-TP
5000 ng/ml 2Cl-ATP

3.2.5.2 Zellaufbereitung

Die Zellen wurden aufgetaut und durch leichtes Schlagen mit der Fingerkuppe gelockert. 25 µl der FLT-TP Stammlösung (200 ng/ml) oder 25 µl der mobilen Phase A (bei Kontrollzellen) wurden hinzu pipettiert. Anschließend wurde das Zellpellet durch die Zugabe von 200 µl der gekühlten internen Standardlösung lysiert. Um den Vorgang der Extraktion manuell zu unterstützen, wurde die Zelllösung kurz gevortext und für 5 min mit Ultraschall behandelt.

Danach wurden die Zelltrümmer durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 8360 rpm entfernt und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Eindampfung der Zelllösung im Vakuumkonzentrator bis zur vollständigen Trockene, folgte das Resuspendieren der Probe in 65 µl der mobilen Phase A. Die so extrahierten Proben wurden bis zur darauf folgenden Chromatographie bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.6 Identifizierung der endogenen Interferenz

Während der ersten Messungen des FLT-TP in humanen Lymphozyten im Vergleich zu leeren Kontrollzellen trat ein endogenes Störsignal auf, das im folgenden Verlauf der Methodenentwicklung identifiziert werden musste. Die genaue Charakterisierung des endogenen Störsignals war essentiell für die Methodenentwicklung, da ansonsten keine chromatographische Trennung und massenspezifische Analyse des FLT-TP möglich war. Für diesen Versuch wurden ein Q1-Scan der Kontrollzellen, sowie ein Q1-Scan von möglichen endogenen Triphosphaten mit einer ähnlichen Masse, wie die des FLT-TP, durchgeführt. Dafür wurden die mobilen Phasen zu gleichen Anteilen über ein T-Stück mit der jeweils zu scannenden Triphosphatlösung, oder der Zelllösung mit Hilfe einer Infusionsspritzenpumpe direkt in die Quelle des Massenspektrometers injiziert. Als Ursache möglicher endogener Störsignale wurden Cytidin-, Thymidin- und das Uridin-Triphosphat gescannt. Mit Hilfe des Q1-Scans konnte Uridin-Triphosphat mit einer Masse von 484,141 g/mol als endogener Störpeak identifiziert werden. Dieser UTP-Peak wurde in der nachfolgenden Methodenentwicklung verwendet, um den FLT-TP-Peak besser differenzieren zu können.

Tab. 3.12: Versuchsaufbau für die Identifizierung des endogenen Störsignals

Lösungen	Zusammensetzung
Mobile Phase A	3 mM Ammoniumformiat 10 mM 1,5-Dimethylhexylamin H ₂ O pH 9,0
Mobile Phase B	6 mM Ammoniumformiat 20 mM 1,5-Dimethylhexylamin H ₂ O/ACN 50/50 (v/v) pH 9,0

Tab. 3.12: Versuchsaufbau für die Identifizierung des endogenen Störsignals (Fortsetzung)

Lösungen	Zusammensetzung
Zell-Lösung	Aliquot, bestehend aus 10 aufbereiteten Zellpellets zu jeweils 6 Millionen Zellen
Cytidintriphosphat (CTP); Molekulargewicht: 483,156 g/mol	10000 ng/ml gelöst in 100 % H ₂ O, versetzt mit 10 µl HCOOH (10 %)
Thymidintriphosphat (TTP); Molekulargewicht: 482,168 g/mol	10000 ng/ml gelöst in 100 % H ₂ O, versetzt mit 10 µl HCOOH (10 %)
Uridintriphosphat (UTP); Molekulargewicht: 484,141 g/mol	10000 ng/ml gelöst in 100 % H ₂ O, versetzt mit 10 µl HCOOH (10 %)

3.2.7 Optimierung der MS- und HPLC-Bedingungen bei Auftreten der endogenen Interferenz

In diesem Abschnitt werden die optimierten MS- und HPLC-Bedingungen unter der Verwendung von UTP als endogene Interferenz beschrieben.

Bei der ersten Methode wurde neben dem optimierten FLT-TP (482,80/384,20) der UTP-spezifische Massenübergang (482,7/273,0) mit aufgenommen und mit der HPLC-Optimierung eine chromatographische Trennung der beiden Peaks erzielt. Bei der Messung von klinischen Proben, ist es unverzichtbar eine sehr geringe Nachweisgrenze für FLT-TP zu erreichen, weil der durchschnittliche Triphosphat Spiegel der anderen Thymidin-Analoga zwischen 30 und 100 fmol/Mio Zellen lag. Der endogene UTP-Peak erreicht aber bei der Messung eine so hohe Signalintensität, dass eine fortbestehende Interferenz bei der intrazellulären Analytik von FLT-TP in biologischen Proben nicht auszuschließen ist. Deshalb wurde zusätzlich zu dieser Methode ein zweites Verfahren entwickelt, das auf ein sehr kleines Signal optimiert wurde. Dieses Signal hatte einen FLT-TP signalärmeren Massenübergang (482,80/259,0), der beim UTP-Scan nicht nachgewiesen wurde. Für beide Methoden wurde eine Supelcogel ODP-50 5 µm (150 x 2,1 mm) RP-Säule für die Chromatographie benutzt.

3.2.7.1 Methode A: zur chromatographischen Trennung von FLT-TP und UTP

Für die erste Methode sind die einzelnen optimierten stoffspezifischen Parameter für die jeweiligen Substanzen in den Tab. 3.13 – 3.16 dargestellt.

Dabei ist zu beachten, dass die Transitionen 483,00 → 159,00 und 482,80 → 384,20 sowohl von FLT-TP als auch von UTP stammen.

Tab. 3.13: Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für FLT-TP (Methode A)

Substanz	Q1 Masse	Q3 Masse	Dwell(msec)	Parameter	Volt (V)
FLT-TP (UTP)	482,80	384,20	150,00	DP	-56,00
				FP	-230,00
				EP	-9,50
				CE	-28,00
				CXP	-18,00
FLT-TP (UTP)	483,00	159,00	150,00	DP	-75,00
				FP	-285,00
				EP	-10,00
				CE	-35,00
				CXP	-7,00

Tab. 3.14: UTP spezifischer Massenübergang m/z und stoffspezifische Parameter (Methode A)

Substanz	Q1 Masse	Q3 Masse	Dwell (msec)	Parameter	Volt (V)
UTP	482,70	273,00	150,00	DP	-100,00
				FP	-350,00
				EP	-13,00
				CE	-40,00
				CXP	-12,00

Tab. 3.15: Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für ddC-TP (Methode A)

Substanz	Q1 Masse	Q3 Masse	Dwell (msec)	Parameter	Volt (V)
ddC-TP	450,20	352,10	150,00	DP	-64,00
				FP	-225,00
				EP	-9,00
				CE	-25,00
				CXP	-30,00
ddC-TP	450,20	159,00	150,00	DP	-64,00
				FP	-225,00
				EP	-9,00
				CE	-25,00
				CXP	-10,00

Tab. 3.16: Massenübergänge m/z und stoffspezifische Parameter für 2Cl-ATP (Methode A)

Substanz	Q1 Masse	Q3 Masse	Dwell (msec)	Parameter	Volt (V)
2Cl-ATP	539,90	442,20	150,00	DP	-65,00
				FP	-230,00
				EP	-10,00
				CE	-30,00
				CXP	-25,00
2Cl-ATP	539,90	159,00	150,00	DP	-65,00
				FP	-230,00
				EP	-10,00
				CE	-40,00
				CXP	-17,00

Die gruppenspezifischen Parameter, die für alle vier verwendeten Substanzen in der ersten Methode eingestellt wurden, sind in Tab. 3.17 aufgeführt.

Tab. 3.17: Gruppenspezifische Einstellungen des MS (Methode A)

Parameter	optimierter Wert
Nebulizer Gas	11,00
Curtain Gas	8,00
Ionen Spray	-4100,00 V
Cad Gas	11,00
Period time	13 min
Scan Type	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Polarity	Negative
Resolution Q1	Unit
Resolution Q3	Low
Quellentemperatur	450°C
Software	Analyst 1.2

Nach Überarbeitung der MS-Bedingungen folgte die Optimierung der Methode A für die chromatographische Trennung von FLT-TP und UTP. Die Zusammensetzung der neuen mobilen Phasen und der neue Gradient für das erste Verfahren sind in den Tab. 3.18 und 3.19 dargestellt.

Tab. 3.18: Zusammensetzung der mobilen Phasen A und B für Methode A

Mobile Phase	Zusammensetzung
mobile Phase A	2,25 mM 1,5-Dimethylhexylamin 4,5 mM Ammoniumformiat H ₂ O pH 9

Tab. 3.18: Zusammensetzung der mobilen Phasen A und B (Fortsetzung)

Mobile Phase	Zusammensetzung
mobile Phase B	4,5 mM 1,5-Dimethylhexylamin 9 mM Ammoniumformiat H ₂ O/ACN 50/50 (v/v) pH 9

Tab. 3.19: Gradient der mobilen Phasen für die FLT-TP Analytik (Methode A)

Zeit (min)	A (%)	B (%)	Flussrate (µl/min)
0,00	95	5	250
0,30	95	5	250
0,60	75	25	250
5,80	75	25	250
7,90	60	40	250
9,10	60	40	250
9,20	95	5	250
15,00	95	5	250

3.2.7.2 Methode B: für den FLT-TP spezifischen Massenübergang 482,7/259,2

Neben dem ersten Verfahren, das sich auf eine signalintensive FLT-TP Fragmentation bezieht, wurde eine zweite Methode entwickelt, die ein weniger sensibles, aber FLT-TP spezifisches Fragment (482,7 → 259,2) beinhaltet. Mit diesem zweiten Verfahren sollte sichergestellt werden, dass FLT-TP in sehr kleinen Konzentrationen nachweisbar ist. Weil verstärkt anhand der unterschiedlichen substanzspezifischen Massen separiert wurde, musste eine Chromatographie entwickelt werden, die ein möglichst hohes FLT-TP Signal begünstigt. Dabei wurde die chromatographische Trennung vom UTP-Peak vernachlässigt. Die für den spezifischen Massenübergang von FLT-TP gefundenen Parameter und der Gradient der Fließmittel sind in den Tabellen 3.20. und 3.21 beschrieben. Die stoffspezifischen und gruppenspezifischen Faktoren für ddC-TP, 2Cl-ATP, UTP und FLT-TP/UTP (483,00 → 159,00) wurden unverändert übernommen. Die Zusammensetzung der mobilen Phasen erwies sich als optimal und konnte ebenfalls weiter verwendet werden.

Tab. 3.20: Massenübergang m/z und stoffspezifische Parameter für FLT-TP (Methode B)

Substanz	Q1 Masse	Q3 Masse	Dwell(msec)	Parameter	Volt (V)
FLT-TP	482,70	259,20	150,00	DP	-76,00
				FP	-310,00
				EP	-10,00
				CE	-50,00
				CXP	-11,00

Tab. 3.21: Gradient der mobilen Phasen für die Methode B

Zeit (min)	A (%)	B (%)	Flussrate (µl/min)
0,00	95	5	250
0,30	95	5	250
0,60	65	35	250
2,80	65	35	250
2,90	40	60	250
7,00	40	60	250
7,20	95	5	250
10,00	95	5	250

3.3 Validierung der beiden Methoden zur intrazellulären Analytik von FLT-TP

3.3.1 Parameter der Validierung

Nach einer Methodenentwicklung folgt die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Analytik. Die hier beschriebenen Methoden wurden nach den Richtlinien der FDA validiert [94]. Hierzu gehört die Untersuchung der Selektivität, der Richtigkeit und Präzision, der Wiederfindung, der Kalibrationskurven, der Re-Injektion einer Probenmessung, sowie der Temperaturstabilität. Die Bedeutung und Überprüfung dieser Parameter wird nachstehend näher erläutert.

3.3.1.1 Selektivität

Anhand der Selektivität wird untersucht, wie gut der Analyt, mit der entwickelten Methode von anderen Komponenten der Probe differenziert und quantifiziert werden kann. Zu diesen Komponenten zählen zum Beispiel endogene Substanzen der biologischen Matrix, deren Metabolite oder auch Arzneimittel.

Für die Bestimmung der Selektivität wurden Leerproben von sechs freiwilligen Spendern mit einer bekannten Konzentration (E2) der Eichlösung versetzt und zusammen mit einer Kalibrationskurven vermessen.

Anschließend wurden die Ergebnisse als Peakfläche des Analyte und des Standards und in der kalkulierten Konzentration dargestellt. Zusätzlich wurden der relative Fehler (R.E.), der Variationskoeffizient (C.V.) und die Standardabweichung (SD) aller Messwerte angegeben. Die mittlere Abweichung der berechneten Daten sollte im Bereich von +/- 20% liegen.

3.3.1.2 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit einer Methode ist gekennzeichnet durch die Nähe des gemessenen Wertes zur wahren Konzentration des Analyten. Dagegen beschreibt die Präzision einer Methode die Nähe der einzelnen Messwerte zueinander, wenn das Messverfahren wiederholt angewendet wird.

Dafür wurden Proben in drei verschiedenen Konzentrationen (QC 1, QC 3, QC 5) in einer Probenmessung willkürlich verteilt und anhand einer ebenfalls gemessenen Kalibrationskurven quantifiziert. Eine der gewählten Konzentrationen sollte an der unteren Nachweisgrenze (LLOQ, QC 6) liegen. In jedem Konzentrationsbereich wurden dafür jeweils fünf Proben je einmal vermessen. Dabei war zu beachten, dass der Mittelwert nicht mehr als 15%, oder 20% am LLOQ, vom Soll abweichen darf. Die Ergebnisse wurden mit der kalkulierten Konzentration, dem R.E. und dem C.V. aller Messwerte dargestellt. Bei der Auswertung gibt der relative Fehler die Richtigkeit und der Variationskoeffizient die Präzision der Methode an.

3.3.1.3 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate einer Methode ist charakterisiert durch das Detektionssignal des Analyten im Vergleich zum Signal des reinen Standards. Dazu wurde die Peakfläche des Analyten in der extrahierten Probe mit der Peakfläche des Analyten des reinen Standards in derselben Konzentration des Extrakts verglichen. Die Extraktion muss nicht 100% betragen, sollte aber für je 5 Proben in drei verschiedenen Konzentrationen (QC 1, QC 3, QC 5) konstant, präzise und reproduzierbar sein.

3.3.1.4 Kalibrationskurven

Die Kalibrationskurve beschreibt das Verhältnis zwischen dem Gerätesignal und der bekannten Konzentration des Analyten. Dafür wurden Lymphozyten zu jeweils sechs Millionen Zellen mit sechs verschiedenen Standardkonzentrationen (E1-E6) versetzt.

Neben den Standards sollten die Kalibrationskurven auch noch Null-Proben und Leerwerte enthalten. Dabei bedeutet „Null“ eine Matrixprobe mit internem Standard (iS), und Leerwert bedeutet iS ohne Matrixprobe. Die einzelnen Bedingungen für eine Kalibrationskurve wurden wie im folgenden Teil beschrieben definiert.

Das LLOQ (E6) ist der niedrigste Wert in der Standard Kurve. Dieser Wert sollte mindestens fünfmal größer sein als das Grundrauschen der Matrix. Die Werte der Präzision sollten bei +/- 20% liegen und die der Richtigkeit bei 80%-120%. Die übrigen Kalibrationswerte sollten eine Richtigkeit von 85%-115% aufweisen. Bei der Auswertung der Kurve müssen vier von sechs Standards diese Kriterien erfüllen (inklusive des kleinsten und größten Standards).

3.3.1.5 Re-Injektion einer Probenmessung und Temperaturstabilität

Eine komplette Probenmessung sollte nach einer ersten Injektion erneut injiziert werden, um zu überprüfen, ob eine Re-Injektion im Falle eines Geräteversagens die gleichen Ergebnisse liefert. Bei der entwickelten Methode war es nicht möglich, eine Probe oder eine gesamte Probenmessung mehrfach zu injizieren. Deshalb wurde ein Aliquot von 6 aufbereiteten Zellproben hergestellt, die mit einer bekannten Konzentration (E2) versetzt waren. Aus diesem Pool wurden zu Beginn der Messung drei Proben injiziert und am Schluss der Messung wurden erneut drei Proben aus diesem Aliquot vermessen. An dieser Stelle wurde auch die Untersuchung der Temperaturstabilität der Proben bis zu ihrer Vermessung einbezogen, weil die erneute Injektion des Aliquots nach 11 h erfolgte.

3.3.2 Herstellung der Kalibrationskurven und Qualitätskontrollen

Die Stammlösung der Kalibrationskurven und Qualitätskontrollen sollten aus unterschiedlichen Einwaagen produziert werden. Dafür wurden zwei Einwaagen der freien FLT-TP Säure in reinem HPLC-Wasser gelöst und auf 1 mg/ml eingestellt.

Diese Stammlösungen (S1, S2) wurden zu jeweils 100 µl aliquotiert und für den weiteren Gebrauch bei -25°C gelagert. Aus der S1-Stammlösung wurden im Verlauf der Methodenentwicklung die Kalibrationskurven hergestellt. Die Qualitätskontrollen wurden unter Verwendung der S2-Stammlösung produziert. Für die Kalibrationskurve stellten 333 ng/ml FLT-TP die Anfangskonzentration dar. Anschließend wurde diese Konzentration (E1) in fünf Schritten jeweils 1 zu 2 weiter verdünnt. Daraus resultierte eine Endkonzentration (E6) von 10,4 ng/ml FLT-TP. Nach Aufbereitung der einzelnen Eichkonzentration mit jeweils sechs Millionen Lymphozyten wurden die Kalibrationskurven als $\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen berechnet. Die entsprechenden Konzentrationen sind in Tab. 3.22 aufgeführt.

Tab. 3.22: Konzentrationen der FLT-TP Kalibrationskurven in ng/ml und in $\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen bei der Methode A

FLT-TP Konzentration	E1	E2	E3	E4	E5	E6
ng/ml	333	167	83,3	41,6	20,8	10,4
$\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen	2870	1440	717	358	179	89

Die Herstellung der Qualitätskontrollen (QC 1-QC 6) erfolgte aus der S2-Stammlösung analog zu den Verdünnungsschritten der Kalibrationskurven. Als Startkonzentration wurden ebenfalls 333 ng/ml FLT-TP gewählt. Q6 wurde für die Bestimmung der Richtigkeit und Präzision am LLOQ bei der Validierungsprozedur verwendet. Als Qualitätskontrollen während der einzelnen Probenmessungen wurden QC 1, QC 3 und QC 5 aufbereitet. Die entsprechenden Konzentrationen sind in Tab. 3.2.3 aufgeführt.

Tab. 3.23: Konzentrationen der FLT-TP Qualitätskontrollen in ng/ml und in $\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen bei der Methode A

FLT-TP Konzentration	QC 1	QC 2	QC 3	QC 4	QC 5	QC 6
ng/ml	333	167	83,3	41,6	20,8	10,4
$\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen	2870	1440	717	358	179	89

Für die zweite Methode B mit dem FLT-TP Fragment (482,7 → 259,2) wurden ebenfalls die oben aufgeführten Eichkonzentrationen verwendet, jedoch mit zwei Millionen Zellen berechnet. Bei den Qualitätskontrollen wurden dagegen die FLT-TP Konzentrationen zusätzlich variiert. Dabei wurde die Startkonzentration (QC 1) in zwei weiteren Schritten jeweils 1 zu 3 verdünnt. Daraus ergab sich für QC 3 eine Konzentration von 111 ng/ml und für QC 5 eine Konzentration von 37 ng/ml FLT-TP.

Für den „ex vivo“ Zellversuch wurde die Aufbereitung der einzelnen Eichkonzentration und Qualitätskontrollen mit jeweils zwei Millionen Lymphozyten durchgeführt, da im Zellversuch jeweils zwei Millionen Zellen ausgesät wurden. Die entsprechenden FLT-TP Konzentrationen und $\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen sind in Tab. 3.14 aufgeführt.

Tab. 3.24: Konzentrationen der FLT-TP Kalibrationskurven und Qualitätskontrollen in ng/ml und in $\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen bei der Methode B

FLT-TP Konzentration	E1	E2	E3	E4	E5	E6
ng/ml	333	167	83,3	41,6	20,8	10,4
$\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen	8600	4300	2150	1080	537	269
	QC 1		QC 3		QC 5	
ng/ml	333		111		37	
$\text{fmol} \cdot 10^6$ Zellen	8600		2870		956	

3.4 „Ex Vivo“ Zellversuch

Um die Funktionsfähigkeit der beiden Methoden A und B zu überprüfen, wurden humane Lymphozyten isoliert und „ex vivo“ in der Zellkultur mit Fosalvudin inkubiert. Bei diesem Versuch sollten die Zellen den Wirkstoff aufnehmen und in den aktiven Metaboliten FLT-TP umwandeln. Der Versuch bestand aus drei Teilen und wurde jeweils repliziert: Nach Isolation von Lymphozyten aus humanem Vollblut wurden diese anschließend in einer Suspensionskultur bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂-Begasung für 48 h kultiviert. Da Lymphozyten in der Regel nicht proliferieren, erfolgte während der Kultivierung eine Stimulation des Lymphozyten-Wachstums mit einem pflanzlichen Lectin, dem Phytohämagglutinin-M (PHA-M).

Der dritte Teil beinhaltete die Inkubation der stimulierten Lymphozyten mit Fosalvudin. Die Inkubation erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz (0,1 μM , 0,5 μM , 1,0 μM und 2,0 μM) über 24 h (30 min-1h-3h-6-8h-24h). Im Anschluss an die einzelnen Schritte erfolgte jeweils eine Zellzählung mit einem Zellcounter (CASY 1 Model TT). Des Weiteren wurde mit Hilfe eines MTT-Tests die Zellvitalität während der Stimulation kontrolliert.

In den nachfolgenden Tabellen sind die drei Etappen und die jeweiligen Medien näher beschrieben.

3.4.1 Lymphozyten-Isolation für die Zellkultur

Tab. 3.25: Lymphozyten-Isolation für den „ex vivo“ Zellversuch
Arbeitsschritte

1. Blutabnahme mit 11 Heparinmonovetten (je 9 ml)
 2. in 4 x 50 ml Zentrifugenröhrchen jeweils 15 ml Biocoll vorlegen und mit je 30 ml unverdünntem Vollblut überschichten
 3. Zentrifugation bei 2050 rpm für 18 min bei 20°C (ohne Bremse)
 4. Zellschicht absaugen und jeweils in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
 5. für Waschschritt (1) mit PBS auffüllen und anschließende Zentrifugation bei 1470 rpm für 10 min bei 6°C (mit Bremse)
 6. Überstand verwerfen und Zellpellet durch leichtes Klopfen auflockern
 7. für Wasch-Schritt (2) und (3) mit PBS auffüllen und anschließende Zentrifugation bei 1190 rpm für 10 min bei 6°C (mit Bremse), danach jeweils 6. Schritt wiederholen
 8. Zellpellets poolen und am Zellcounter zählen
 9. Zellsuspension für die Kultivierung auf $5-7 \times 10^6/\text{ml}$ Zellen mit PBS einstellen (in 30 ml Suspension \Rightarrow Gesamtzellzahl $150-210 \times 10^6$), restliche Suspension für die Kontrolle der Zellvitalität aufbewahren
-

3.4.2 Kultivierung der Lymphozyten

Tab. 3.26: Medien für die Kultivierung der Lymphozyten

Medium	Zusammensetzung/Funktion
RPMI-Medium	<ul style="list-style-type: none"> • 500 ml RPMI-1640 ohne L-Glutamin/mit 2,0 g/l NaHCO₃; allg. Zuchtmedium für Lymphozyten mit Puffersubstanz • 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/10 mg/ml); Antibiotika, um Verunreinigungen zu verhindern • 5 ml L-Glutamin (200 mM); Aminosäure als Nährstoffzusatz
RPMI-10 % FCS-Medium	<ul style="list-style-type: none"> • 500 ml RPMI-1640 ohne L-Glutamin/mit 2,0 g/l NaHCO₃; allg. Zuchtmedium für Lymphozyten mit Puffersubstanz • 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/10 mg/ml); Antibiotika, um Verunreinigungen zu verhindern • 5 ml L-Glutamin (200 mM); Aminosäure als Nährstoffzusatz • 50 ml FCS; fetales Kälberserum als Nährstofflieferant für z.B. anorganische Salze, Spurenelemente, Aminosäuren, Hormone, Bindungsproteine, oder Anheftungsfaktoren
PHA-M Stammlösung (6 mg/ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 20 mg PHA-M in 3,3 ml reinem H₂O lösen; pflanzliches Lectin der roten Kidneybohne, wirkt als Mitogen bei der Lymphozyten-Proliferation

Tab. 3.27: Protokoll der Lymphozyten-Kultivierung

Zeitintervall	Arbeitsschritte
1.Tag: Anlegen der Zellkultur (2 x 10 ⁶ /ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 50 ml des RPMI-Medium in je zwei großen Kulturflaschen (550 ml) vorlegen • Zusatz von 50 µl der PHA-M-Stammlösung • Zugabe von je 15 ml der isolierten Lymphozyten-Suspension (ca. 100 x 10⁶ Zellen) • 24h Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % rH
2.Tag: Aussaat der Zellen in 24-Well-Platten	<ul style="list-style-type: none"> • Abnahme von 100 µl der Zellsuspension für die Zählung • gezählte Zellsuspension auf 4 x 10⁶/ml einstellen • Zugabe von jeweils 1 µl PHA-M-Stammlösung pro 1 ml Zellsuspension • je 500 µl des RPMI-10 % FCS-Mediums in jedes Well einer 24-Well-Platte vorlegen (2 Platten) • je 500 µl der aufbereiteten Zellsuspension dazufügen, das ergibt eine Gesamtzellzahl von 2 x 10⁶ pro Well • 24h Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % rH • restliche Zellsuspension für die Kontrolle der Zellvitalität aufbewahren

3.4.3 Inkubation der Zellkultur mit Fosalvudin

Für die Behandlung der Zellen mit Fosalvudin wurden vier verschiedene Konzentrationen des Medikaments verwendet. Dafür wurde zunächst eine Stammlösung mit 1000 μM Fosalvudin in DMSO/RPMI-Medium (20/80) hergestellt. Anschließend wurde diese Stammkonzentration in zwei Schritten jeweils 1:10 mit RPMI-Medium auf eine Endkonzentration von 10 μM Fosalvudin verdünnt. Die Herstellung der Inkubationslösungen für die Zellkultur erfolgte aus dieser 10 μM Lösung: eine 0,1 μM -, 0,5 μM -, 1,0 μM - und eine 2,0 μM -Lösung in RPMI-Medium. Die Lösungen wurden mit je 1 μl PHA-M-Stammlösung/ml Lösung für die Lymphozyten-Stimulation versetzt. 500 μl der jeweiligen Konzentration wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten auf die Lymphozyten in den entsprechenden Wells gegeben. Nach Inkubation bei 37°C (5 % CO₂ und 95 % rH) wurden von jedem Well 100 μl für die Bestimmung der Zellzahl abgenommen. Die restliche Zellsuspension wurde sofort in 1,5 ml „Micro Tubes“ überführt und bei 2900 rpm bei 4°C über 5 min zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen. Die Lagerung der erhaltenen Zellpellets erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -25°C.

Tab. 3.28: Well-Belegung einer 24-Well-Platte für die Inkubation mit Fosalvudin

Konzentration	jeweiliges Zeitintervall pro Well					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
0,1 μM	24h Wert	8h Wert	6h Wert	3h Wert	1h Wert	30min Wert
0,5 μM	24h Wert	8h Wert	6h Wert	3h Wert	1h Wert	30min Wert
1,0 μM	24h Wert	8h Wert	6h Wert	3h Wert	1h Wert	30min Wert
2,0 μM	24h Wert	8h Wert	6h Wert	3h Wert	1h Wert	30min Wert

3.4.4 Kontrolle der Zellvitalität

Die Untersuchung der Zellvitalität erfolgte mit Hilfe eines MTT-Tests. Der MTT-Test basiert auf der Reduktion von Tetrazoliumsalzen, hier 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT), zu gefärbten Formazanen durch die lebenden Zellen.

Nach Inkubation der Zellen mit MTT wird die Verfärbung als Absorption bei 570 nm bestimmt. In der Regel wird dieser Test parallel zum eigentlichen Zellversuch mit der gleichen Zellanzahl durchgeführt, um eine quantitative Aussage über die Zelltoxizitäten verschiedener Substanzen zu treffen. Weil nur eine limitierte Anzahl an Lymphozyten zur Verfügung stand, wurde der Test nur qualitativ durchgeführt. Damit sollte untersucht werden, ob lebende Zellen für die Umwandlung des Foslovudin Tidoxil zum aktiven Metaboliten FLT-TP zur Verfügung standen.

Der MTT-Test wurde mit dem „Cell Proliferation Kit I“ von Roche nach folgendem Protokoll ausgeführt.

Tab. 3.29: Protokoll für den MTT-Test

Arbeitsschritte

1. Aussaat der restlichen Zellsuspension (ca. 1×10^4 Zellen/ml) in jeweils zwei Reihen (12 Wells) auf einer 96-Well-Platte, eine Reihe wurde nur mit je 10 μ l MTT als Kontrolle befüllt
 2. Zugabe von 10 μ l MTT-Reagenz
 3. Inkubation der 96-Well-Platte für 4 h bei 37°C mit 5% CO₂
 4. Hinzufügen von 100 μ l Pufferlösung in jedes Well
 5. Inkubation der 96-Well-Platte über Nacht bei 37°C mit 5% CO₂
 6. Schütteln der Platte für 20 min (Stufe 6-7)
 7. Vermessen der Absorption bei 570 nm
-

3.5 Die klinische Phase-II Studie

Nach Testung der Methoden A und B mit dem „ex vivo“ Zellversuch, wurden beide Methoden im Rahmen einer klinischen Phase-II Studie (HDP 302) bei therapie-naiven HIV-Patienten eingesetzt. Studienziel war die Dosisfindung von Foslovudin Tidoxil.

Darüber hinaus sollten Erkenntnisse über die FLT-TP Konzentrationen in Lymphozyten gewonnen werden. Die Studie wurde im ersten Quartal 2007 beendet und die Ergebnisse wurden bisher auf der vierten IAS Konferenz als Poster publiziert [66].

Die von der Firma Heidelberg Pharma initiierte Studie wurde doppelt verblindet, placebokontrolliert und randomisiert in zwei Zentren durchgeführt. Insgesamt wurden 43 therapienaive HIV-Patienten in die Studie eingeschlossen, in Deutschland 34 und in Argentinien 9.

Demographische Daten: 41 Patienten waren männlich, 33 kaukasischer Abstammung. 42 Patienten wurden in CDC Klasse A eingestuft. Zu Beginn der Studie lag die mediane CD4-Anzahl bei 376 Zellen/mm³, die Viruslast bei 35000 HIV-RNA Kopien/ml.

Therapieregime: Die Patienten erhielten über 14 Tage einmal täglich (qd) unterschiedliche Foslovudin Tidoxil Dosierungen (5 mg qd, 10 mg qd, 20 mg qd und 40 mg qd) [66].

Die Blutproben für die intrazelluläre FLT-TP Messung wurden am ersten Tag (1h-3h-6h-8h-12h) und am 14. Tag (1h-6h) in CPT-Röhrchen abgenommen. Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte nach dem in 3.5.1 beschriebenen Protokoll. Das Lymphozyten-Isolations-Protokoll wurde in unserem Labor entwickelt und mehrmals bei verschiedenen Triphosphat-Analysen angewendet.

3.5.1 Lymphozyten-Isolations-Protokoll für die klinische Studie

Tab. 3.30: Protokoll zur Zellpräparation bei NRTI-TP Bestimmungen

Arbeitsschritte

1. Prinzipielles:

Alle Verarbeitungsschritte müssen schnell ablaufen, weil die Zellen sehr rasch ihre Triphosphate abbauen oder verlieren.

Alle Medien müssen während des gesamten Aufbereitungsvorganges auf 4°C temperiert sein. Ebenso muss eine Kühlzentrifuge zur Verfügung stehen.

Tab. 3.30: Protokoll zur Zellpräparation bei NRTI-TP Bestimmungen (Fortsetzung)

Arbeitsschritte

2. Blutentnahme:

Die Blutentnahme erfolgt aus einer Venenverweilkanüle oder durch direkte Punktion einer Vene in ein (bei Patienten mit Leukopenie ggf. in zwei) 8,0 ml Vacutainer CPT Natriumcitrat Röhrchen (Becton Dickinson; Bestell Nr. 362753). Wenn die Blutentnahme aus einem Venenzugang erfolgt, sollten 5 ml Blut mit einer Spritze abgezogen und verworfen werden, bevor der Vacutainer befüllt wird. Die Venenverweilkanüle sollte zuvor nur mit Kochsalzlösung, ohne Antikoagulans gespült worden sein. Nach der Blutentnahme werden die Tubes in aufrechter Position bei Raumtemperatur bis zur Zentrifugation gelagert. Zwischen Abnahme und Zentrifugation sollten maximal 15 min liegen.

3. Separation und Ernte der Lymphozyten:

Zentrifugieren Sie den Vacutainer in einem horizontal auslenkbaren Rotor mit 1500 g bis 1800 g bei +18-25°C für 20 min. Die Bremse kann aktiviert sein. Unmittelbar nach der Zentrifugation erfolgt die Ernte der Zellen. (Mononukleäre Zellen und Thrombozyten bilden die weiße Schicht unter dem Plasma) Dazu wird mindestens die Hälfte der Plasmaschicht mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt, ohne die Schicht mit den mononukleären Zellen aufzuwirbeln. Bitte frieren Sie von der Plasmafraktion ein Aliquot von 1 ml bei -20°C ein. Die Ernte der weißen Zellschicht erfolgt mit einer frischen Pasteurpipette. Das gewonnene Material wird in ein oder 15 ml Spitzröhrchen (Zentrifugenröhrchen) überführt.

4. Waschen der Mononukleären Zellen:

Dieser Schritt ist von großer Bedeutung, weil die im Plasma vorhandenen Medikamente, die noch an den Zellen haften, entfernt werden sollen, ohne dass sich die Konzentration der intrazellulären Substanzen verändert. Bei der Aufbereitung von mehreren Proben sollten diese während der nicht zu vermeidenden Wartezeiten auf Eis gelagert werden. Füllen Sie die Spitzröhrchen mit 4°C kalter 0,9% NaCl Lösung bis zu einem Gesamtvolumen von 10 ml auf. Nach fünfmaligem Drehen des Röhrchens, um 180° ohne es zu schütteln, erfolgt eine Zentrifugation mit 600g bei 4°C für 8 min. Nach der Zentrifugation wird soviel wie möglich des Überstandes abgesaugt, ohne das Zellsediment aufzuwirbeln. Danach wird dreimal mit der Fingerkuppe des Zeigefingers seitlich gegen das untere Ende des Röhrchens geschlagen um das Zellsediment aufzulockern. Ohne diesen Schritt gehen die Zellen nicht mehr in Suspension. Der Waschschrift wird identisch einmal wiederholt.

5. Quantifizierung:

Nach dem Zentrifugieren saugen Sie erneut den Überstand bis auf ein Restvolumen von ca. 200-300 µl ab und lockern das Zellsediment durch dreimaliges Schlagen mit der Fingerkuppe auf (Bitte vergewissern Sie sich, dass das gesamte Sediment aufgelockert ist: Es darf keine weiße Schicht am Boden des Röhrchens haften bleiben). Pipettieren Sie dann 1000 µl eiskaltes Medium zu den Zellen, resuspendieren Sie und entnehmen Sie ein Aliquot von 50 µl. Aus diesem Aliquot wird mittels Neubauer Zählkammer (Trypanblau Färbung) oder einem Zellcounter die Zellkonzentration (Zellen/ml) bestimmt. Bitte bestimmen Sie auch den Anteil der toten Zellen. Diese Zellzahl ist entscheidend für die spätere Berechnung der Konzentration der Analyte. Bitte notieren Sie die Zellzahl. Und legen den Befund der Probe bei.

6. Kryokonservieren:

Überführen Sie nun 1000 µl der Zellsuspension in ein Eppendorf Mikroreaktionsgefäß und zentrifugieren Sie bei 600 g, 4°C für 3 min. Saugen Sie dann so viel wie möglich vom Überstand ab, ohne das Zellsediment aufzuwirbeln und frieren Sie die Probe sofort bei -80°C ein.

3.6 Statistik

Für die Auswertung der Daten wurden Parameter aus der beschreibenden Statistik verwendet. Dazu gehört der Mittelwert (MW) als Lageparameter. Dieser Parameter gibt den durchschnittlichen Messwert einer kompletten Messreihe an und berechnet sich aus der Summe der einzelnen Messwerte dividiert durch die Gesamtanzahl der Messungen. Des Weiteren wurden die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (C.V.) als Maße für die Streuung der einzelnen Messwerte verwendet.

Die Standardabweichung gibt an, wie weit die Messwerte um ihren Mittelwert streuen. Sie ist definiert als Quadratwurzel der Varianz der einzelnen Messwerte.

Die Varianz der Messwerte gibt an, wie weit der gemessene Wert vom erwarteten Wert abweicht.

Der Variationskoeffizient (C.V.) wird berechnet, indem die Standardabweichung der Messwerte durch den Mittelwert der Messwerte dividiert wird. Die Angabe erfolgt in der Regel als prozentualer Wert (%).

Der relative Fehler (R.E.) ermöglicht eine Aussage über die Messungenauigkeit der Methode. Der R.E. beschreibt wie ungenau die gewonnen Messwerte in Bezug auf den wahren Wert sind und kann einen positiven oder negativen Wert annehmen.

4. Ergebnisse

4.1 Methodenentwicklung für die intrazelluläre Analytik von FLT-TP

4.1.1 Optimierung der MS-Bedingungen für FLT-TP und internen Standard

Unter den optimierten MS-Bedingungen wurde FLT-TP im Q1-Scan mit einer Masse von 483,1 gefunden, nachdem es im negativen Modus ein Wasserstoffatom abgegeben hatte. FLT-TP fragmentiert beim Produkt-Ion-Scan in das signalstarke Ion, mit der Masse 159 (483,1→159,0) und in das signalärmere Ion, mit der Masse 385,1 (483,1→385,1). Die Transition 159,0 m/z resultiert bei allen verwendeten Triphosphaten aus der Abspaltung der Pyrophosphatgruppe. In Abb. 4.1 ist der Produkt-Ion-Scan von FLT-TP dargestellt. Die signalstärksten FLT-TP Massenübergänge sind in Abb. 4.2 dargestellt.

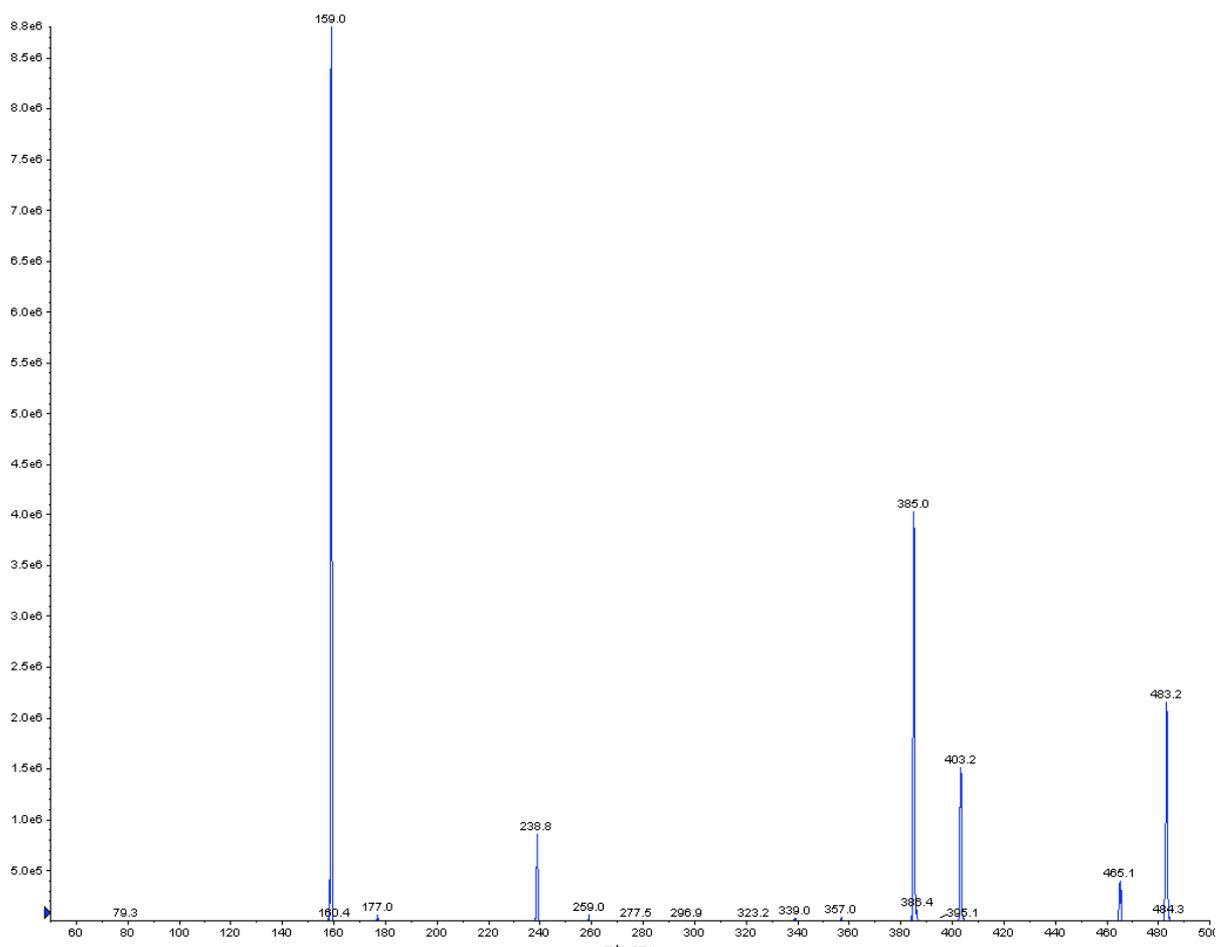


Abb. 4.1: Produkt-Ion-Scan von FLT-TP

Darstellung aller Tochterionen von FLT-TP: z.B. 159,0 mit der höchsten Intensität; 259,0 mit einer geringeren Intensität als 385,0

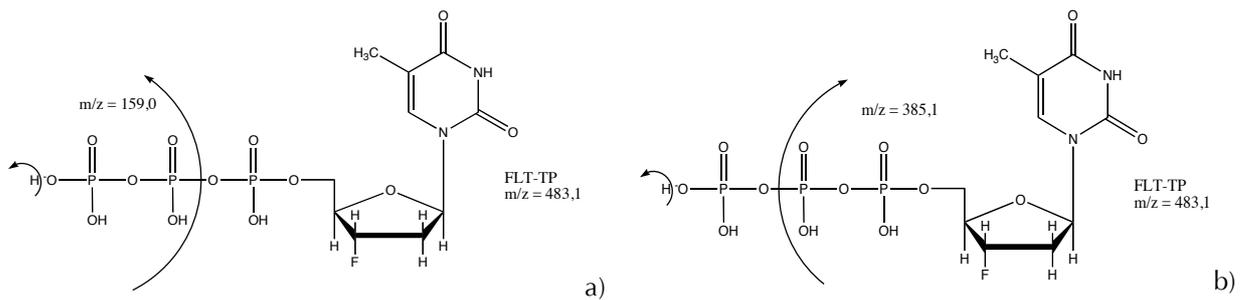


Abb. 4.2: m/z den Transitionen von FLT-TP

Darstellung der beiden signalstärksten Massenübergänge von FLT-TP:
a) $483,1 \rightarrow 159$ und b) $483,1 \rightarrow 385,1$

Neben FLT-TP fragmentieren auch die beiden internen Standards unter den optimierten Bedingungen zu dem jeweils signalstärksten Ion mit einer Masse von 159,0.

Bei Chloradenosin-Triphosphat hat das zweitintensivste Ion eine Masse von 442,2 (Abb. 4.3). Zalcitabin-Triphosphat weist dagegen eine intensive Transition bei $450,2 \rightarrow 352,1$ auf (Abb. 4.4).

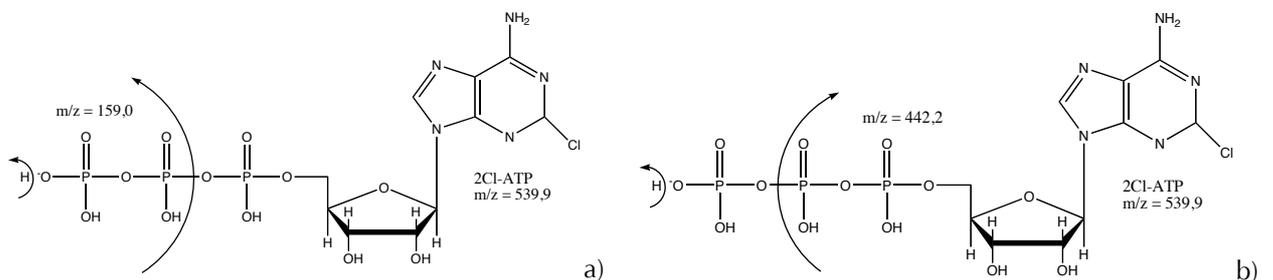


Abb. 4.3: Transitionen von Chloradenosin-Triphosphat (2Cl-ATP)

Darstellung der beiden signalintensivsten Massenübergänge von 2Cl-ATP:
a) $539,9 \rightarrow 159$ und b) $539,9 \rightarrow 442,2$

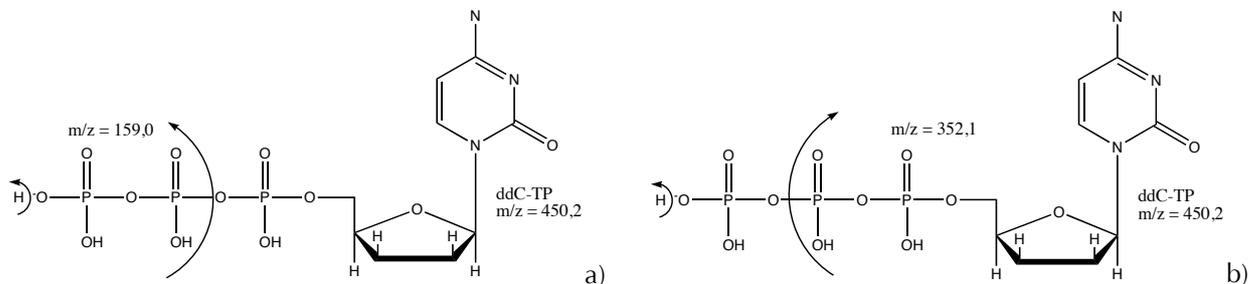


Abb. 4.4: Transitionen von Zalcitabin-Triphosphat (ddC-TP)

Darstellung der beiden intensivsten Transitionen von ddC-TP:
a) $450,2 \rightarrow 159$ und b) $450,2 \rightarrow 352,1$

4.1.2 Optimierung der HPLC-Methode

Nachdem die MS-Bedingungen für FLT-TP und die beiden internen Standards ddC-TP und 2Cl-ATP eingestellt waren, wurde die HPLC-Methode optimiert. Als Grundlage für die Entwicklung dienten die von Pruvost et al. und Becher et al. beschriebenen Methoden zur intrazellulären Messung von Stavudin-Triphosphat [82, 83]. Wegen der stark polaren Eigenschaften der drei Analyten und dem hohen pH-Bereich, in dem gemessen werden sollte, wurden drei verschiedene Umkehrphase-Säulen der Firma Varian getestet.

Tab. 4.1: Getestete HPLC-Säulen

Hersteller	Material	Säulengröße
Varian	Polaris C8-A	150 x 2.0 mm; 3u
	Pursuit XRs 3-C8	150 x 2.0 mm; 3u
	Pursuit XRs 5-C18	150 x 2.0 mm; 5u

Die in Tab. 4.1 aufgeführten Säulen wurden für die chromatographische Trennung von sehr polaren Analyten entwickelt. Ihre Oberflächen bestehen aus einer ultra reinen Silika-Matrix, an die verschieden lange und polar modifizierte Alkylketten (C8 und C18) gebunden sind. Alle getesteten Säulen waren für bis zu 100 % Wasseranteil in der mobilen Phase geeignet. Des Weiteren können die Säulen in einem pH-Bereich von 1,5 bis 10,0 eingesetzt werden. Die Pursuit XRs-Säulen sind laut Angaben des Herstellers speziell für die Verwendung von Ionenpaarreagenzien geeignet, ohne die Lebensdauer der Säule zu verkürzen.

Die PursuitXRs 5-C18 Säule erwies sich gegenüber den anderen beiden Säulen als am besten geeignet. Mit ihr wurde eine adäquate chromatographische Trennung bei jeweils guter Peakform der drei Analyten erzielt. Unter den gewählten chromatographischen Bedingungen hatten alle drei Substanzen eine Retentionszeit zwischen vier und sechs min.

Bei den C8-Säulen war die Retentionszeit der Analyten zu kurz. Die Analyten konnten auch nicht durch Veränderungen des Gradienten länger auf der Säule zurück gehalten werden, ohne dabei gleichzeitig einen Intensitätsverlust und eine Verschlechterung der Peakform vorzufinden.

Als Ionenpaarreagenz wurde N'N-DMHA in verschiedenen Konzentrationen getestet und in Bezug auf den Ionisierungsgrad von FLT-TP ausgewertet. Der Ionisierungsgrad spiegelte sich in der Intensität von FLT-TP wider und wurde als „counts per second“ (cps) angegeben. Das Optimum lag bei 15 mM und zwischen 25 und 30 mM N'N-DMHA (Abb. 4.5).

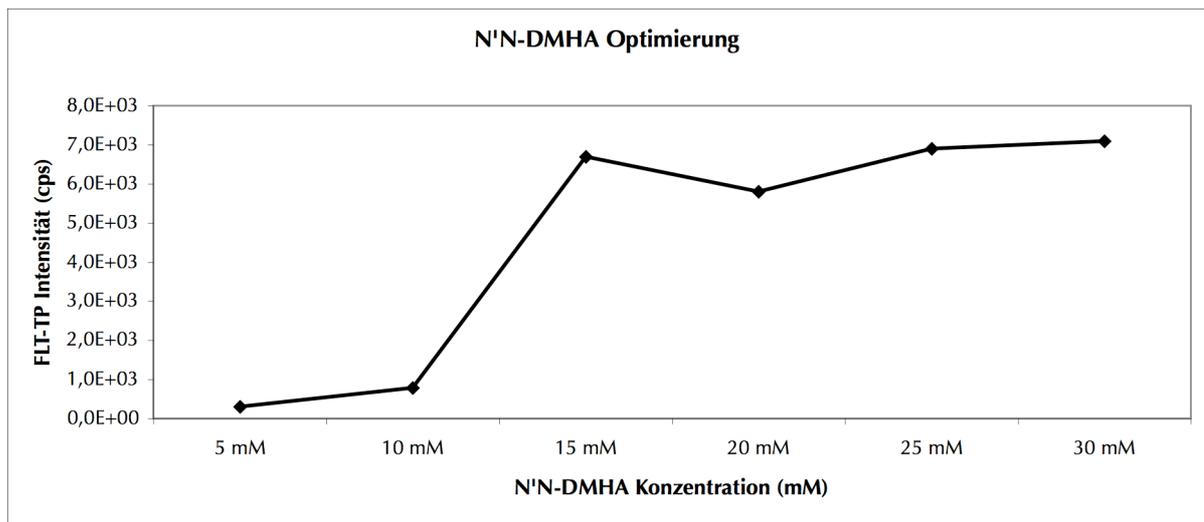


Abb. 4.5: N'N-DMHA Konzentration in Bezug auf den Ionisierungsgrad von FLT-TP

Diese drei Konzentrationen von N'N-DMHA wurden anschließend verwendet, um den pH-Wert der mobilen Phasen A und B einzustellen. Obwohl die verschiedenen DMHA Konzentrationen separat betrachtet eine gute Ionisierung des FLT-TP begünstigten, zeigte sich wiederum in Abhängigkeit vom pH-Wert ein anderes Bild. Hier war die Kombination von 30 mM DMHA bei einem pH-Wert von 9,0 am günstigsten für die Ionisierung von FLT-TP.

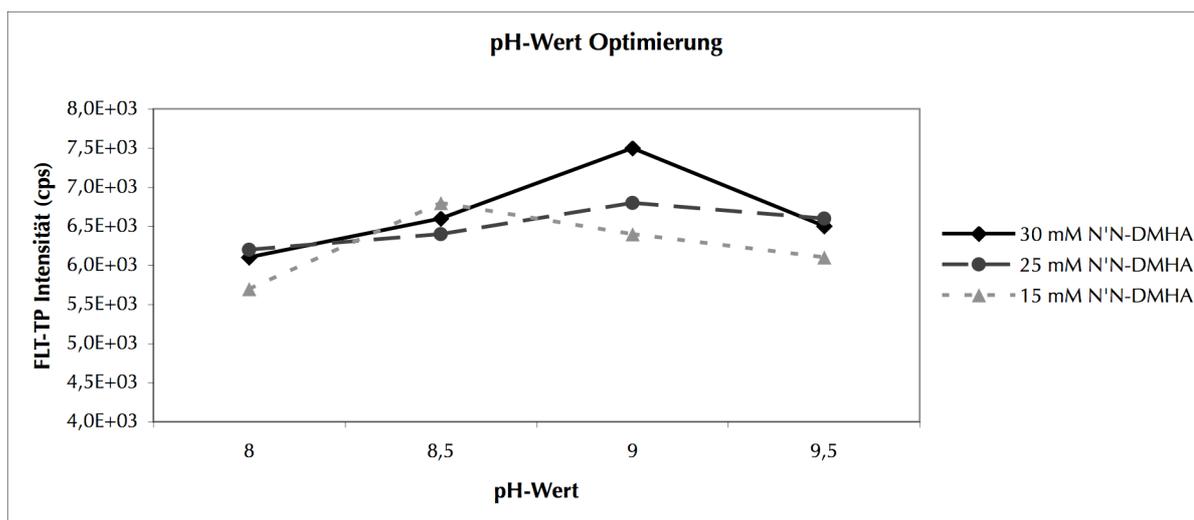


Abb. 4.6: Optimum des pH-Wertes bei unterschiedlichen DMHA Konzentrationen

Nachdem die Zusammensetzung der mobilen Phasen A und B eingestellt war, musste die Retentionszeit und die Peakform mit Hilfe eines Gradienten optimiert werden. Dabei wurde der Anteil der organischen Phase B am Gesamtfluss von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die Laufzeit verändert. Um ein Tailing der Peaks zu vermeiden, wurde ein relativ steiler Gradient verwendet.

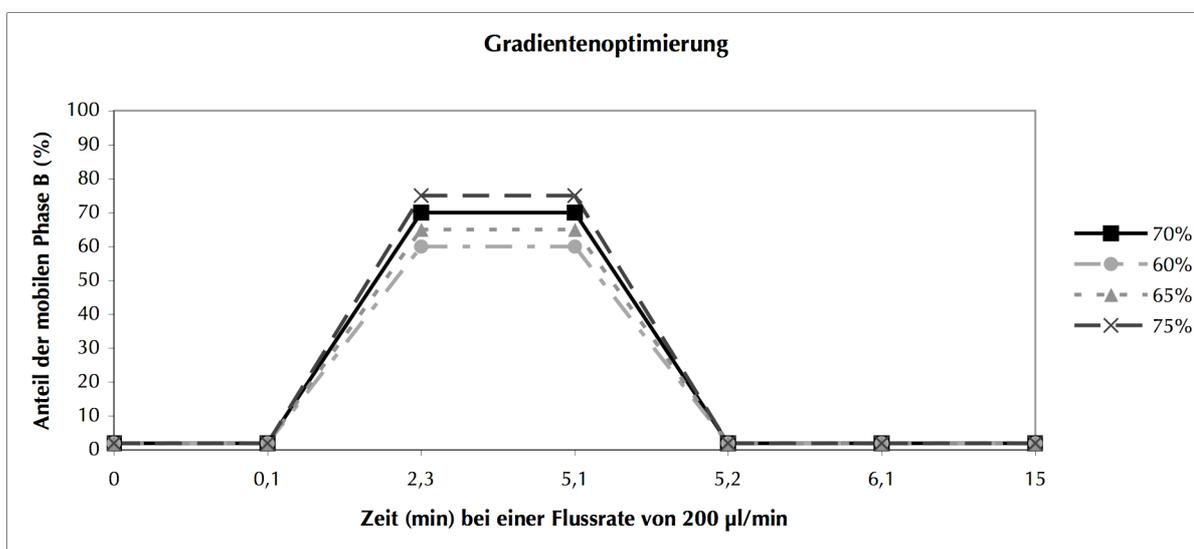


Abb. 4.7: Gradientenoptimierung

Diese Abb. zeigt die untersuchten Anteile der mobilen Phase B im Verlauf des Gradienten bei einer Flussrate von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Bei einem Anteil von 60 bis 65 % B waren die Peaks der drei Analyten breit und flach. Dagegen wurden die Substanzen bei einem Anteil von 75 % B zu schnell von der Säule gewaschen und liefen kurz hinter der Lösungsmittelfront. Ein Optimum der Peakform, Peakintensität und Retentionszeit wurde bei einem Anteil von 70 % B gefunden. Zuerst

wurde ddC-TP unter den optimierten Bedingungen mit einer RT von 4,8 min von der Säule eluiert. Im Anschluss folgten FLT-TP bei 5,29 min und 2Cl-ATP bei 5,7 min. Abb. 4.8 zeigt ein Chromatogramm von FLT-TP und den beiden internen Standards unter den optimierten Parametern.

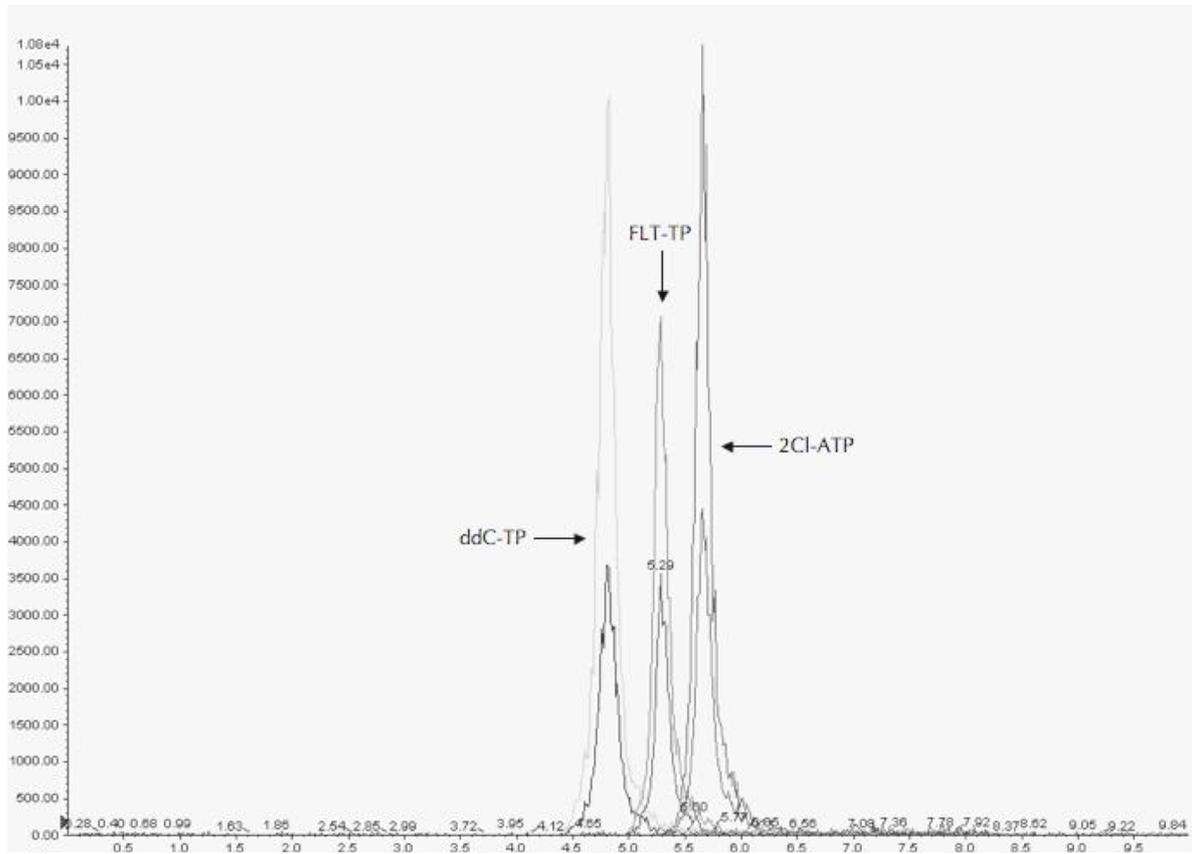


Abb. 4.8: Chromatogramm von FLT-TP, ddC-TP und 2Cl-ATP unter optimierten Bedingungen

Darstellung der beiden Massenübergänge der drei Analyten zusehen. Der jeweils höhere Peak resultiert aus der Abspaltung des Pyrophosphatrestes. Zuerst eluiert ddC-TP (450,2 → 159,0 und 450,2 → 352,1), dann FLT-TP (483,1 → 159,0 und 483,1 → 385,1) und anschließend 2Cl-ATP (539,9 → 159,0 und 539,9 → 442,2).

4.1.3 Überprüfung der Methode an der biologischen Matrix

Bei der Isolation der humanen Lymphozyten wurde die Buffy-Coat Methode angewendet. Nach Auszählung der Zellen wurden je sechs Millionen Lymphozyten aliquotiert und anschließend bei -25 °C gelagert bzw. für die Messung am Massenspektrometer aufbereitet.

In den ersten Messungen wurden Leerzellen mit den internen Standards und mit 200 ng/ml FLT-TP versetzt, wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Diese mit FLT-TP versetzten Zellen wurden mit reinen Lymphozyten verglichen, um sicher zu stellen, dass das gemessene Signal von der Substanz und nicht von den Zellen ausgelöst wurde. Bei diesem Vergleich wurde jedoch ein identisches Signal für die Masse des FLT-TP in den reinen Lymphozyten gefunden.

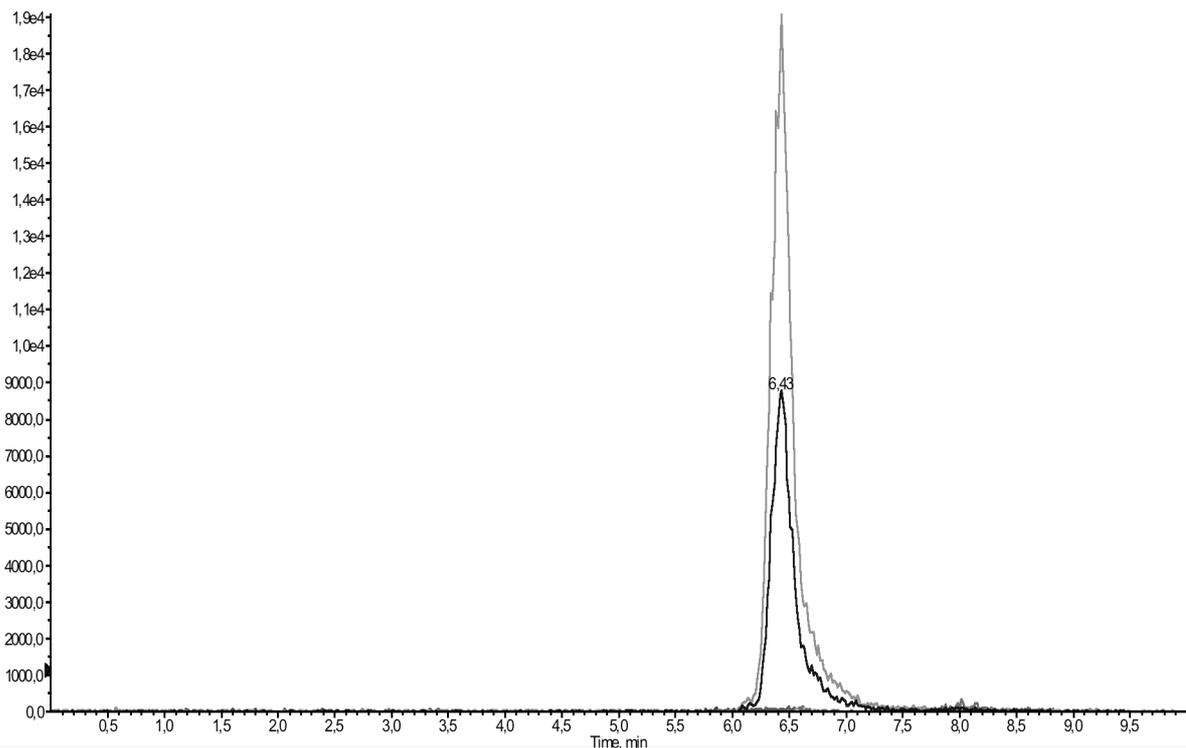


Abb. 4.9: Chromatogramm der endogenen Interferenz

Darstellung des endogenen Zellpeaks mit den gleichen Massenübergängen 483,1 → 159,0 (hoher Peak) und 483,1 → 385,1 (niedrigerer Peak) wie FLT-TP zu sehen. Die reinen Leerzellen wurden ohne jeglichen Zusatz von internem Standard und FLT-TP vermessen.

4.1.4 Identifizierung der endogenen Interferenz

Aufgrund des natürlichen Zellstoffwechsels liegen in humanen Lymphozyten verschiedene endogene Triphosphate vor, die zu Interferenzen bei einer Analyse führen können. Um eine eindeutiges FLT-TP Signal zu erhalten, musste daher das endogene Zellsignal identifiziert werden. Hierfür wurden alle endogenen Triphosphate untersucht, die aufgrund ihrer Masse in Betracht gezogen werden mussten: CTP mit einer Masse von 483,156, TTP (482,168) und UTP (484,141).

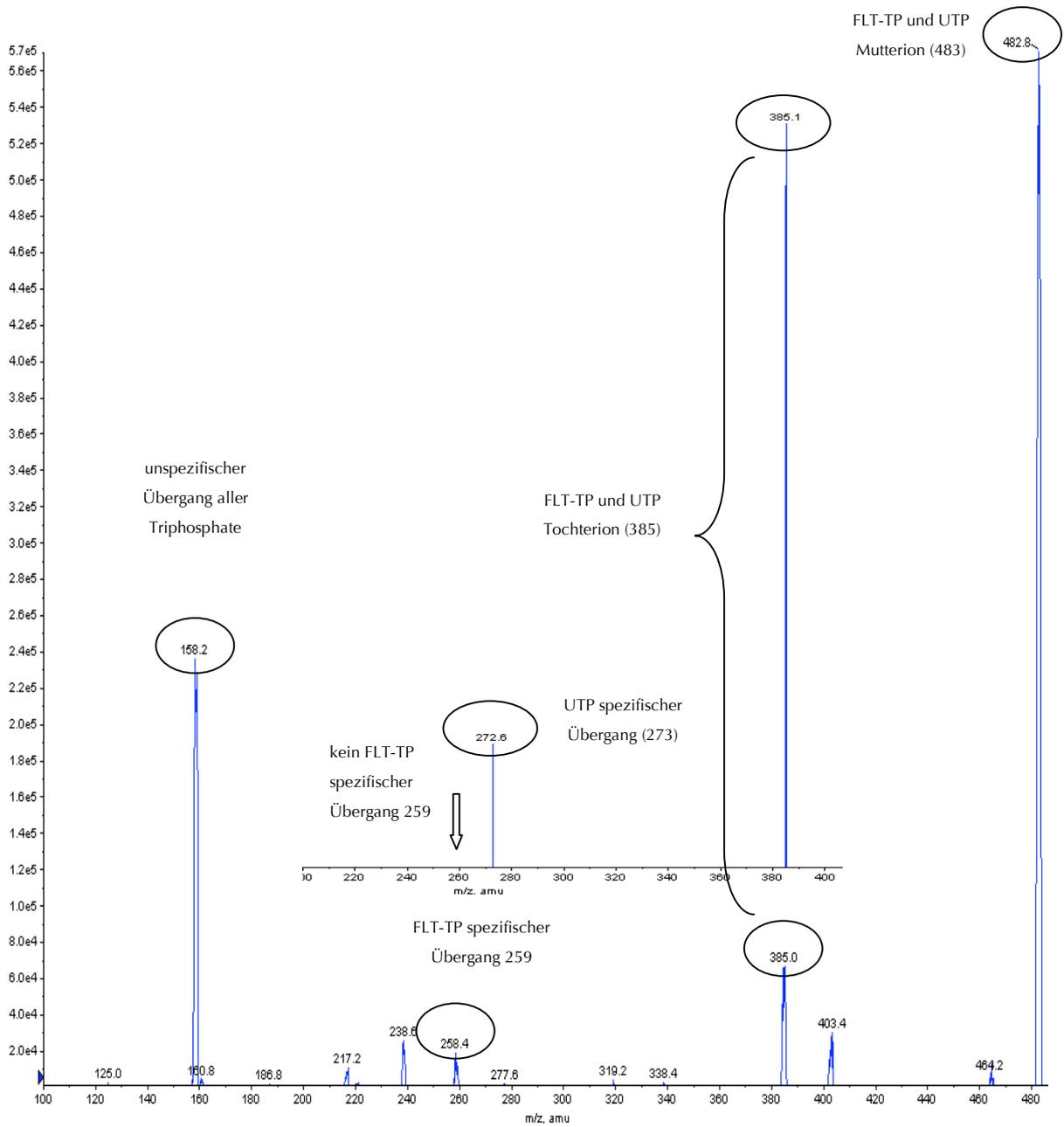


Abb. 4.12: Fragmentation von FLT-TP und UTP im Massenspektrum

Darstellung der Fragmentationen von FLT-TP und UTP: auf der linken Seite der unspezifische Übergang aller Triphosphate; in der Mitte die spezifischen Transitionen der beiden Substanzen und auf der rechten Seite die unspezifischen gemeinsamen Transitionen.

4.1.5 Optimierung der MS- und HPLC-Bedingungen für die endogene Interferenz

4.1.5.1 Optimierung der Methode A

Nach Identifizierung des endogenen Störsignals wurde die 273-Fragmentation von UTP in die chromatographische Methode integriert. Dadurch wurde eine eindeutige Trennung von FLT-TP und Zellsignal sichergestellt.

Mit den in Abschnitt 4.1.2 aufgeführten Säulen konnte die gewünschte Trennung von UTP und FLT-TP nicht erreicht werden. Deshalb wurde eine weitere RP-Säule auf ihre Eignung hinsichtlich der Trennleistung überprüft.

Diese Supelcogel ODP-50 5 μm (150 x 2,1 mm) RP-Säule erwies sich als geeignet und wurde zusammen mit den in Abschnitt 3.2.7.1 beschriebenen Bedingungen eingesetzt, um die beiden Analyten zu trennen. Zusätzlich zu diesen Bedingungen wurde ein anderes Ionenpaarreagenz verwendet, das 1,5-Dimethylhexylamin (1,5-DMHA).

Durch die Anwendung von 1,5-DMHA wurden die beiden mobilen Phasen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und ihres Zusammenflusses im Gradienten neu optimiert. Dabei wurde wie im Abschnitt 4.1.2 vorgegangen und der pH-Wert von 9,0 unverändert übernommen. Bei der Einstellung der 1,5-DMHA Konzentration zeigte sich schon bei einer Ausgangskonzentration von 5 mM eine sehr gute Intensität beim FLT-TP Peak. Deshalb wurde die Konzentration herabgesetzt, um zu ermitteln, mit welcher Konzentration ein vergleichbarer Peak erzielt werden konnte. Das Optimum lag bei 2,25 mM 1,5-DMHA.

Im Anschluss wurde der Gradientenzusammenfluss für eine optimale chromatographische Trennung von FLT-TP und UTP eingestellt. Hierfür wurde zuerst der Anteil der mobilen Phase in zehner Schritten von 70% auf 30% herabgesetzt. Dabei zeigte sich ein Optimum für die FLT-TP Intensität. Anschließend wurde der Gradient abgeflacht, indem ein leichtes Zwischenplateau über ca. fünf min getestet wurde. Die optimale Trennung der beiden Peaks wurde bei einer Plateauphase von 25% B erreicht, die nach 5,8 min über eine Laufzeit von zwei min auf 40% angeglichen wurde.

Um die Peakform zu verbessern, wurde zusätzlich die Flussrate von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ gesteigert. In Abb. 4.13 sind die getesteten prozentualen Anteile der mobilen Phase B dargestellt.

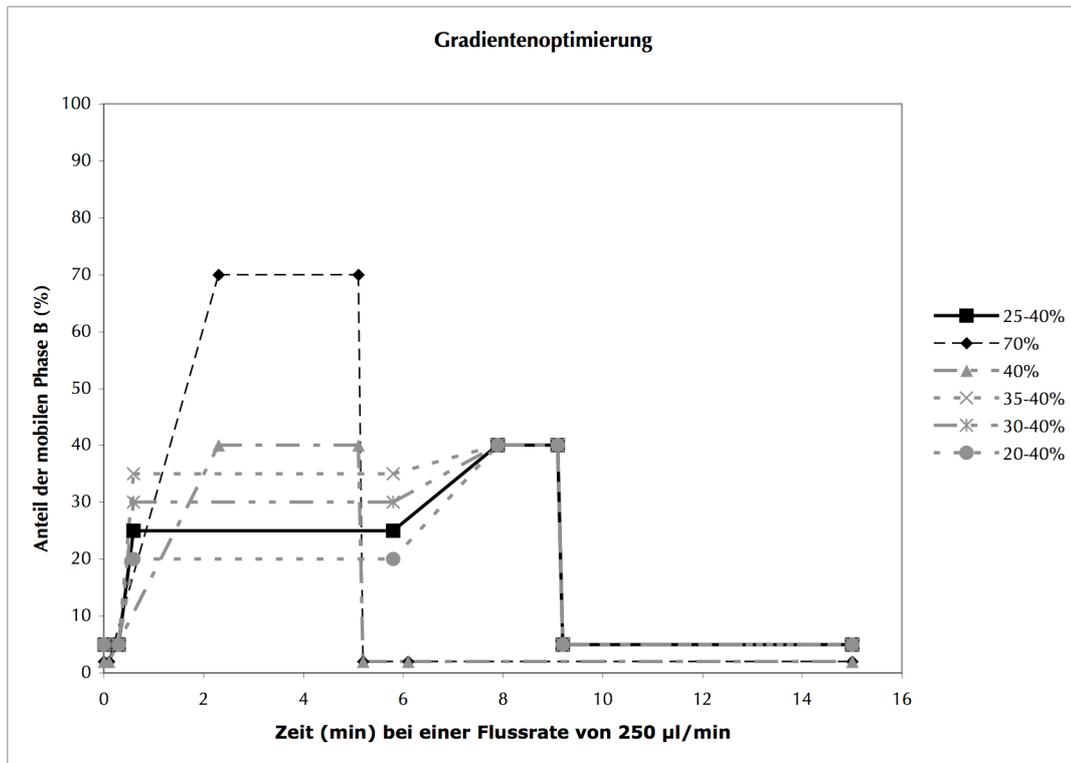


Abb. 4.13: Gradientenoptimierung für die Methode A

Der Gradient mit dem Anteil von 70 % stellt den Ausgangspunkt für die Optimierung dar. Das Resultat für eine optimale Trennung von FLT-TP und UTP wird durch den Gradienten mit einem Anteil von 25-40 % abgebildet.

Als Ergebnis dieser Methodenoptimierung wurde der erste interne Standard, das ddC-TP, bei 7,28 min nachgewiesen und UTP bei 8,11 min. Anschließend wurde FLT-TP bei 9,41 min von der Säule eluiert, gefolgt vom zweiten internen Standard, Cl-ATP, bei 10,43 min.

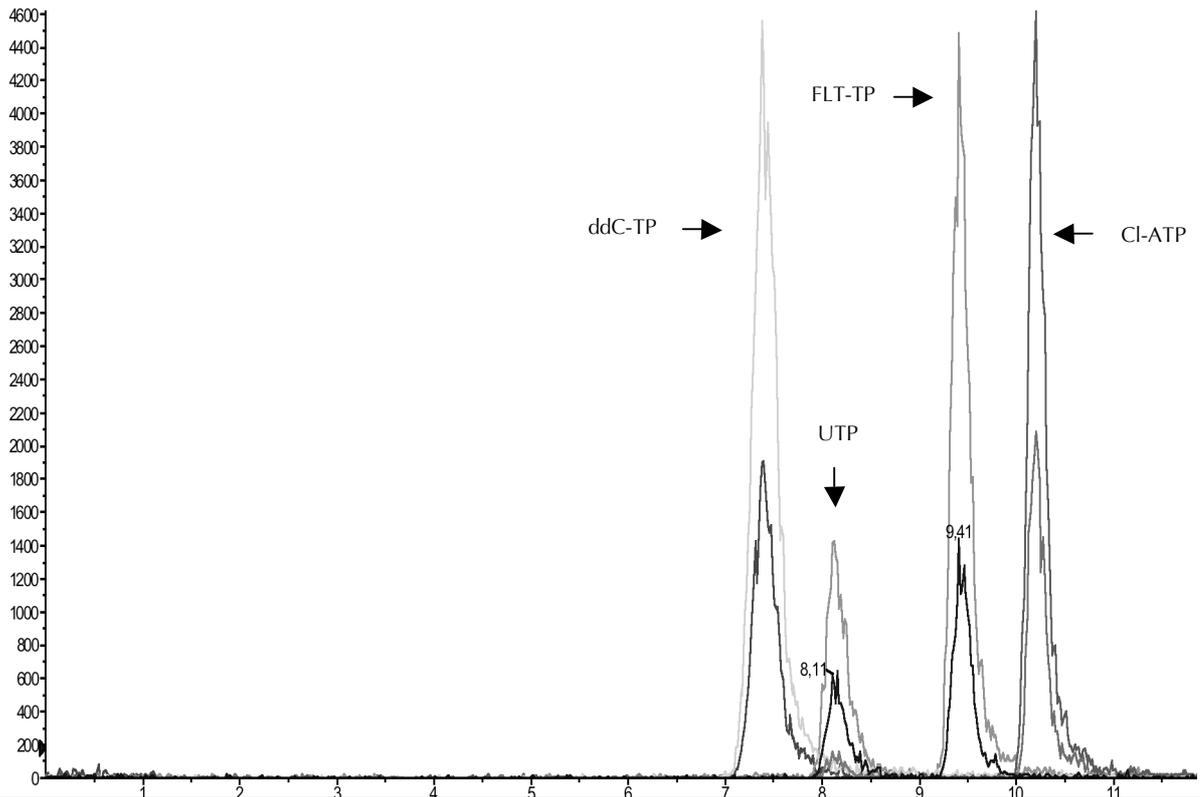


Abb. 4.14: Chromatogramm von allen vier Analyten als Reinsubstanzen bei der Methode A
Der FLT-TP Peak entspricht 200 ng/ml und stellt 1588 fmol/Mio Zellen dar.

4.1.5.2 Optimierung der Methode B

Neben der Methode A wurde wie oben beschrieben eine zweite Methode B entwickelt. Diese Analytik basiert auf dem signalschwächeren FLT-TP Massenübergang von 482,7→259,2 unter den gewählten Bedingungen (Abb. 4.15).

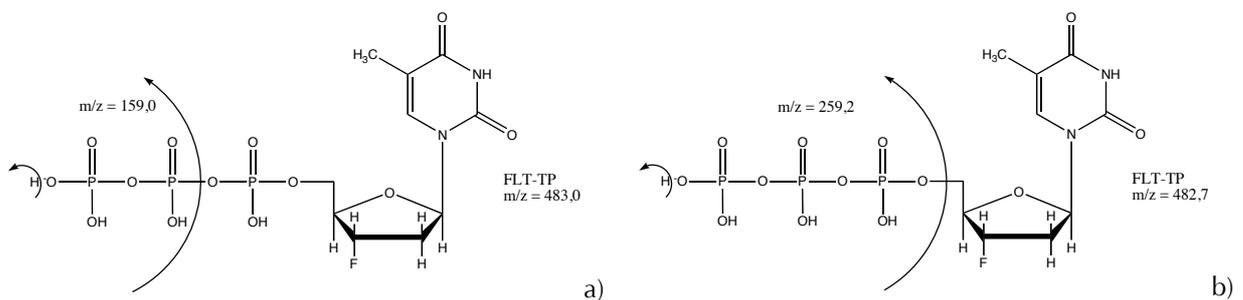


Abb. 4.15: m/z der Transitionen von FLT-TP (Methode B)

Darstellung der beiden Massenübergänge von FLT-TP dargestellt:

a) signalstarker Übergang mit m/z 483,0→159 und b) signalschwächere Transition mit m/z 482,7→259,2

Bei dieser Methode sollte eine möglichst hohe Intensität für den signalärmeren Massenübergang erzielt werden.

Die in Abschnitt 4.1.5.1 aufgeführte Zusammensetzung der mobilen Phasen A und B wurde unverändert übernommen. Um die Intensität des FLT-TP Peaks zu erhöhen, wurde ein neuer Gradient für den Zusammenfluss der mobilen Phase eingestellt. Als Resultat der Optimierung wurde ein Gradient mit einem Anstieg der mobilen Phase B von 35 auf 65 % nach 2,8 min gefunden. Im Vergleich zum Gradienten der Methode A wurde hier ein steilerer Gradient in einer wesentlich kürzeren Laufzeit verwendet.

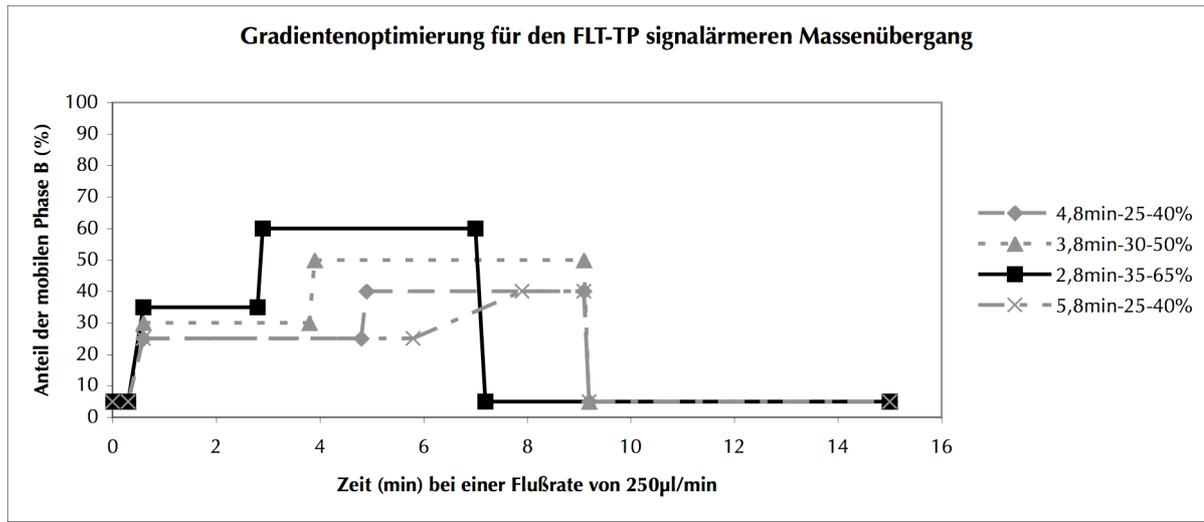


Abb. 4.16: Gradientenoptimierung für die Methode B mit FLT-TP 482,7/259,2

Der Gradient mit 5,8 min – 25-40 % zeigt den Ausgangspunkt für die Optimierung. Das Ergebnis für die bestmögliche Intensität des FLT-TP signalschwächeren Massenübergang ist mit dem Gradienten 2,8 min – 35-65 % dargestellt.

4.2 Validierung der Methoden

4.2.1 Validierung der Methode A

Im folgenden Abschnitt wird die Reproduzierbarkeit der Methode A zur chromatographischen Trennung von FLT-TP und UTP beschrieben. In Form von Tabellen oder Abbildungen sind jeweils die untersuchten Parameter der Validierung dargestellt.

4.2.1.1 Selektivität der Methode A

Um die Selektivität dieser Methode zu überprüfen, wurden isolierte Zellproben von sechs freiwilligen Probanden mit $1440 \text{ fmol} \cdot 10^6$ FLT-TP versetzt. Diese Proben wurden dann mit äquivalenten Zellproben der Spender ohne Zusatz von FLT-TP verglichen. Die durchschnittliche Zellzahl der Probanden-Proben lag bei vier Millionen Lymphozyten.

Tab. 4.2: Selektivität der Methode A

Pat ID	Peak Fläche Leer	Peak Fläche FLT-TP (cps)	Berechnete Konzentration ($\text{fmol} \cdot 10^6$)	R.E. %
Pat1	0	54700	1460	2
Pat2	0	26400	1600	11
Pat3	0	42000	1440	0
Pat4	0	51900	1320	-8
Pat5	0	43900	1390	-3
Pat6	0	34600	1510	5
MW	0	42250	1452	1
SD		9667	89	6
C.V. %		23	6	

Die berechneten Werte lagen in einem Bereich von -8 bis +11 %. Somit wurde die geforderte Grenze von +/- 20 % mit dieser Methode nicht überschritten.

4.2.1.2 Richtigkeit und Präzision bei der Methode A

Richtigkeit und Präzision dieser Methode wurde wie in Abschnitt 3.3.1.2 beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.3 dargestellt.

Tab. 4.3: Richtigkeit und Präzision der Methode A

FLT-TP QC ($\text{fmol} \cdot 10^6$)	89 LLOQ	R.E. %	179 QC 5	R.E. %	717 QC 3	R.E. %	2870 QC 1	R.E. %
1	108	20	164	-9	684	-5	2440	-15
2	107	19	166	-7	732	2	2250	-22
3	96	8	154	-14	795	11	2770	-3
4	96	8	176	-1	627	-13	2930	2
5	91	2	153	-14	843	18	2120	-26
MW	100	11	163	-9	736	3	2500	-13
SD	6	7	9	5	77	11	309	11
C.V. %	6		5		10		12	

Der R.E. der Methode lag für die untere Nachweisgrenze (LLOQ) bei 11 % mit einem Variationskoeffizienten von 6 %. Für die niedrige (QC 5), die mittlere (QC 3) und die hohe (QC 1) FLT-TP Konzentration betrug der relative Fehler (C.V. %) -9 (5), 3 (10) und -13 % (12).

4.2.1.3 Wiederfindung bei der Methode A

Die Wiederfindungsrate von FLT-TP lag bei den gewählten Bedingungen für diese Methode bei 61 % und ist in Abb. 4.17 dargestellt.

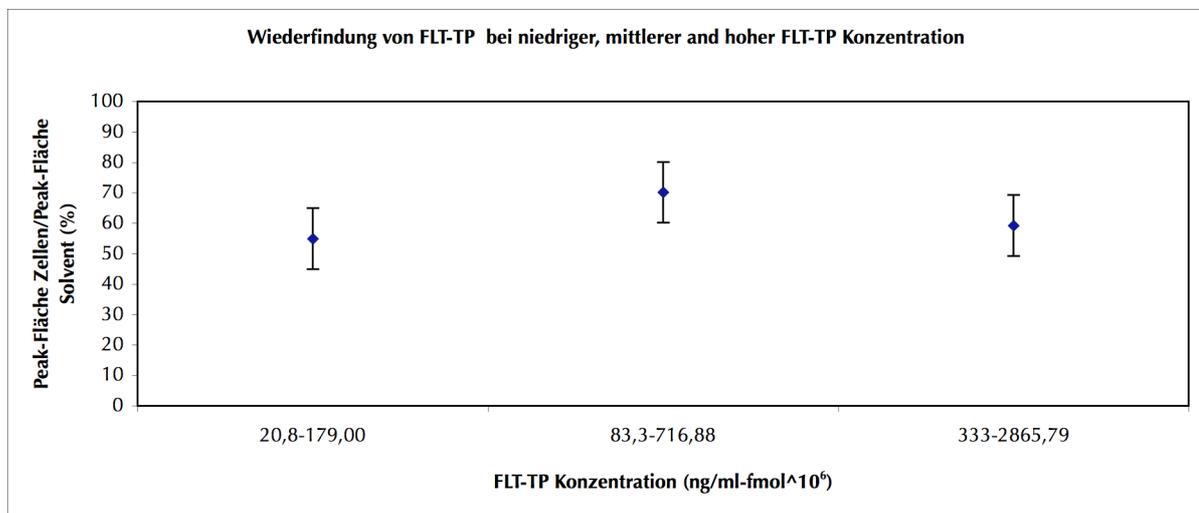


Abb. 4.17: Wiederfindung von FLT-TP mit der Methode A

Der Mittelwert der verschiedenen Extraktionen beträgt 61 % mit einem Variationskoeffizienten von 11 % und einer Standardabweichung von 7.

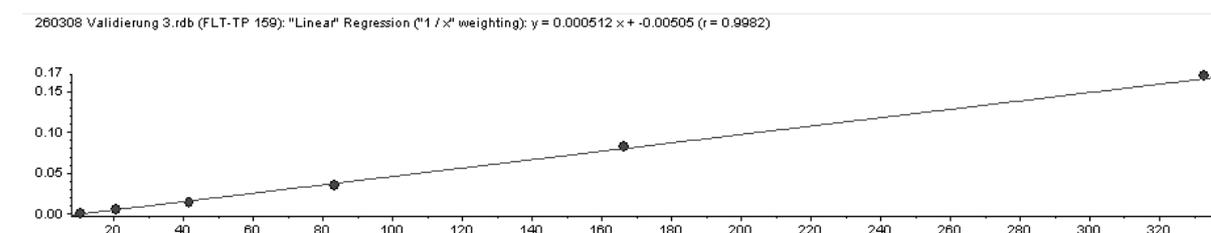
4.2.1.4 Kalibrationskurven bei der Methode A

Der relative Fehler bei den einzelnen Kalibrationspunkten lag im Bereich von -16 und 13 %. Der Variationskoeffizient für beide Messungen betrug 10 %. Bis auf einen Kalibrationswert (717 fmol¹⁰⁶ FLT-TP) der ersten Kalibrationskurve erfüllten alle Werte die erforderlichen Kriterien von +/- 15 % Abweichung. Der abweichende Kalibrationswert konnte jedoch vernachlässigt werden, weil vier von sechs Kalibrationswerten die geforderten Kriterien erfüllten.

Tab. 4.4: Werte von zwei Kalibrationskurven von FLT-TP mit der Methode A bei einer Auswertung mit linear 1/x

FLT-TP Konzentration (fmol ¹⁰)	Datum	Berechnete Konzentration (fmol ¹⁰)	R.E. %
89	220308	102	13
179		198	11
358		326	-9
717		602	-16
1440		1340	-7
2870		3070	7
MW			
SD			11
C.V.%			11
89	260308	101	13
179		187	4
358		307	-14
717		664	-7
1440		1460	2
2870		2920	2
MW			
SD			9
C.V.%			9

In Abb. 4.18 ist zusätzlich zu den einzelnen Werten in Tab. 4.4. eine Kalibrationskurve abgebildet.

**Abb. 4.18: Kalibrationskurve von FLT-TP mit der Methode A**

4.2.1.5 Re-Injektion einer Probenmessung und Temperaturstabilität

Da es bei der entwickelten Methode aufgrund der Probenaufbereitung nicht möglich war eine komplette Probenmessung erneut zu injizieren, wurde ein Aliquot mit einer FLT-TP Konzentration von 1440 fmol¹⁰ hergestellt. Dieses Aliquot wurde zu Beginn und am Ende der Probenmessung nach 11 h wiederholt vermessen.

Das Aliquot wurde für 6 h bei 4°C und für 5 h bei Raumtemperatur bis zur erneuten Messung gelagert. Der relative Fehler der Reproduzierbarkeit dieser Methode lag bei -10 % (C.V. 2 %).

Tab. 4.5: Re-Injektion und Temperaturstabilität von FLT-TP

Probe	Peak Fläche FLT-TP (cps)	Berechnete Konzentration (fmol ^{10⁶})	R.E.%
Re-Injektion 0h	33200	1270	-11
Re-Injektion 0h	30800	1260	-13
Re-Injektion 0h	35700	1320	-8
Re-Injektion 11h	29800	1280	-11
Re-Injektion 11h	31800	1320	-8
Re-Injektion 11h	13500	1300	-10
MW	29133	1290	-10
SD	7239	22	2
C.V.%		2	

Abb. 4.19 zeigt die Mittelwerte der beiden Messungen zum Zeitpunkt Null und nach 11 h Lagerung.

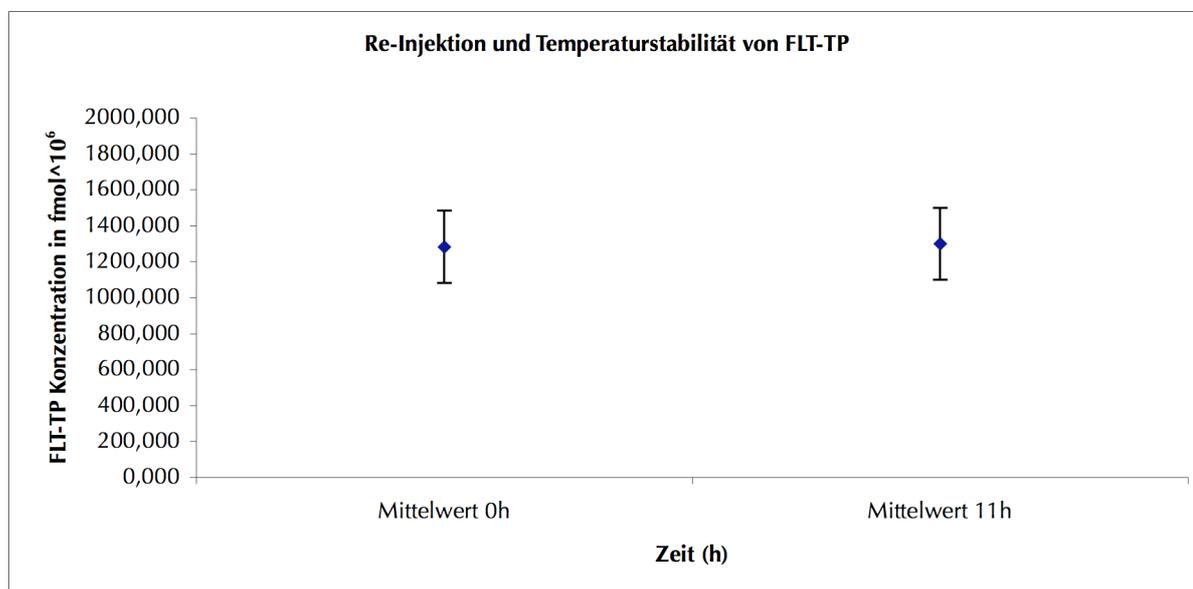


Abb. 4.19: Re-Injektion und Temperaturstabilität von FLT-TP

4.2.2 Validierung der Methode B mit dem FLT-TP signalärmeren Massenübergang

Neben Methode A zur chromatographischen Trennung von UTP und FLT-TP wurde eine zweite Methode B entwickelt. Diese Methode beinhaltet einen signalärmeren FLT-TP Massenübergang (482,7 → 259,2). Die überprüften Validierungsparameter sind im folgenden Teil tabellarisch oder graphisch dargestellt.

4.2.2.1 Selektivität der Methode B

Wie bei der ersten Methode A wurde auch bei der Methode B die Selektivität bestimmt. Dafür wurden die Zellproben von freiwilligen Spendern mit QC 3 (956 fmol¹⁰⁶ FLT-TP) versetzt. Diese Zellproben wurden mit den entsprechenden Leerproben der Probanden verglichen. Die durchschnittliche Zellzahl der Probanden-Proben lag bei sechs Millionen Lymphozyten. Der relative Fehler der Methode B betrug 10 % mit einem Variationskoeffizienten von 4 %. Somit wurde auch bei dieser Methode die Grenze von +/- 20 % eingehalten.

Tab. 4.6: Selektivität der Methode B

Pat ID	Peak Fläche Leer	Peak Fläche FLT-TP (cps)	Berechnete Konzentration (fmol ¹⁰ ⁶)	R.E.%
Pat1	0	15900	1100	15
Pat2	0	20400	1090	14
Pat3	0	16400	1080	14
Pat4	0	18400	1020	7
Pat5	0	11700	996	5
Pat6	0	15700	1010	5
MW	0	16417	1050	10
SD		2672	128	4
C.V.%			4	

4.2.2.2 Richtigkeit und Präzision der Methode B

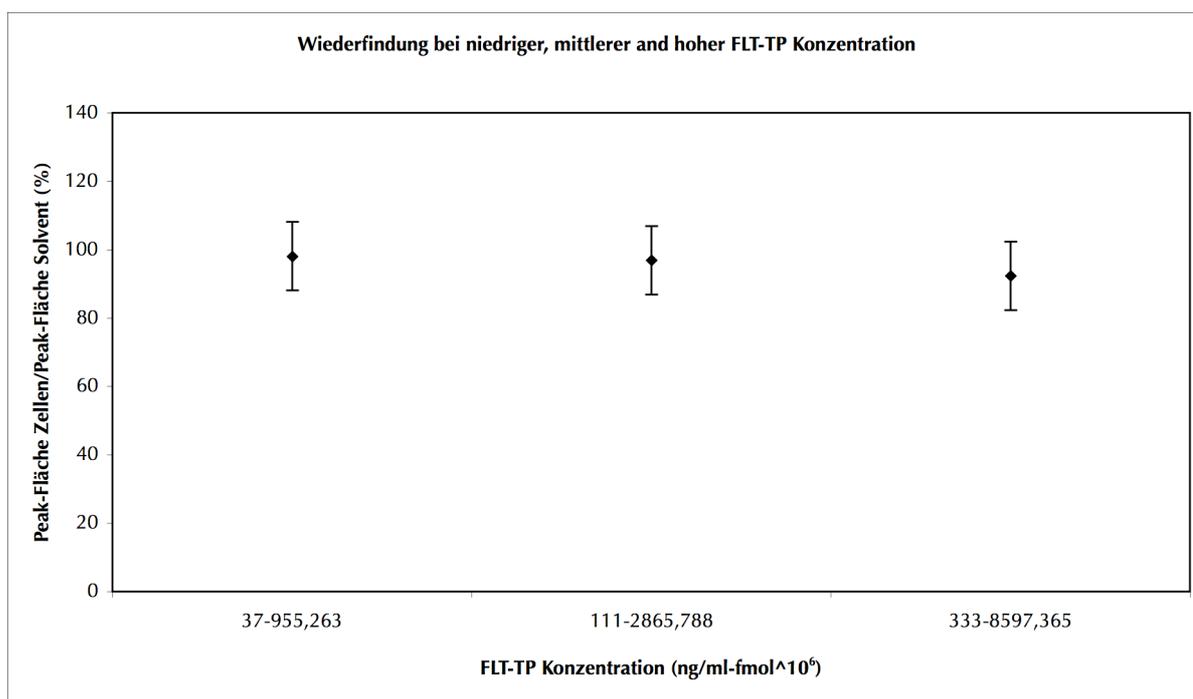
In Tab. 4.7 sind die Richtigkeit und Präzision dieser Methode bei einer durchschnittlichen Zellzahl von zwei Millionen Lymphozyten pro Probe aufgeführt. Für die niedrige (QC 5), die mittlere (QC 3) und die hohe (QC 1) FLT-TP Konzentration betrug der relative Fehler (C.V.%) 4 (2), 13 (4) und 11 % (4).

Tab. 4.7: Richtigkeit und Präzision der Methode B

QC Konzentration	956		2870		8600	
FLT-TP fmol ⁶	QC 5	R.E.%	QC 3	R.E.%	QC 1	R.E.%
	1010	6	3300	15	9780	14
	973	2	3280	14	8860	3
	958	0	2990	5	9170	7
	1020	7	3330	16	9910	15
	984	3	3250	14	9810	14
MW	990	4	3230	13	9510	11
SD	24	3	122	4	419	5
C.V.%	2		4		4	

4.2.2.3 Wiederfindung mit der Methode B

Unter den gewählten Bedingungen lag die Wiederfindungsrate von FLT-TP bei dieser Methode bei 96 %. Abb. 4.20 zeigt, dass die einzelnen Werte für die niedrige, mittlere und hohe FLT-TP Konzentration vergleichbar sind.

**Abb. 4.20: Wiederfindung von FLT-TP bei der Methode B**

Der Mittelwert der verschiedenen Extraktionen beträgt 96 % mit einem Variationskoeffizienten von 3 % und einer Standardabweichung von 2.

4.2.2.4 Kalibrationskurven der Methode B

Tab. 4.8 zeigt exemplarisch die Mittelwerte der Kalibrationskurven, die mit Methode B gemessen wurden. Der relative Fehler der einzelnen Kalibrationswerte liegt im Bereich von -7 und 8 %. Alle gemessenen Kalibrationswerte erfüllten die geforderten Kriterien von +/- 15 % Abweichung.

Tab. 4.8: Mittelwerte der Kalibrationskurven von FLT-TP bei der Auswertung linear 1/x (Methode B)

FLT-TP Konzentration (fmol ¹⁰ ⁶)	MW berechnete Konzentration (fmol ¹⁰ ⁶)	R.E.%
269	269	0
537	578	8
1070	1030	-4
2150	2000	-7
4310	4410	2
8600	8650	1
MW		0
SD		5

4.3 „Ex vivo“ Zellversuch

Um die beiden entwickelten und validierten Methoden auf ihre Funktionsfähigkeit zu überprüfen, wurde ein Zellversuch durchgeführt. Humane Lymphozyten wurden isoliert und „ex vivo“ mit verschiedenen Konzentrationen von Foslovudin über einen Zeitraum von 24 h inkubiert, um die Substanz aufzunehmen und in FLT-TP umzuwandeln. Anschließend wurde das gebildete FLT-TP mit den beiden beschriebenen Methoden bestimmt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind im nachfolgenden Abschnitt beschrieben. Um die Richtigkeit und Präzision der Messung während des einzelnen Experiments zu überprüfen, wurden für beide Methoden Lymphozyten mit jeweils zwei Millionen Zellen für die Aufbereitung von Kalibrationskurven- und Qualitätskontrollproben verwendet.

4.3.1 Messung von FLT-TP mit der Methode A zur Trennung von UTP und FLT-TP

Da mit dieser Methode kein FLT-Triphosphat bestimmt werden konnte, wird in diesem Fall auf die Darstellung der einzelnen Qualitätskontrollen während der Messung verzichtet. Alle Werte lagen jedoch in dem Abweichungsbereich von +/- 15 %, der den FDA-Kriterien entspricht.

4.3.2 Messung mit der Methode B mit dem signalärmeren FLT-TP Massenübergang

Mit Methode B konnte FLT-TP in den Proben des „ex vivo“ Zellversuchs gemessen werden. In Tab. 4.9 sind die Mittelwerte der gemessenen Qualitätskontrollen dargestellt.

Tab. 4.9: Qualitätskontrollen bei der FLT-TP Messung mit der Methode B

FLT-TP	Soll (fmol ¹⁰ ⁶)	Ist/MW (fmol ¹⁰ ⁶)	R.E.%	SD	C.V.%
QC 5	956	989	4	24	2
QC 3	2870	3230	13	122	4
QC 1	8600	9510	11	419	4

Nachfolgend sind die einzelnen Messwerte von FLT-TP aufgeführt, die mit der Methode B bestimmt wurden.

Tab. 4.10: FLT-TP Konzentrationen im "ex vivo" Zellversuch mit der Methode B

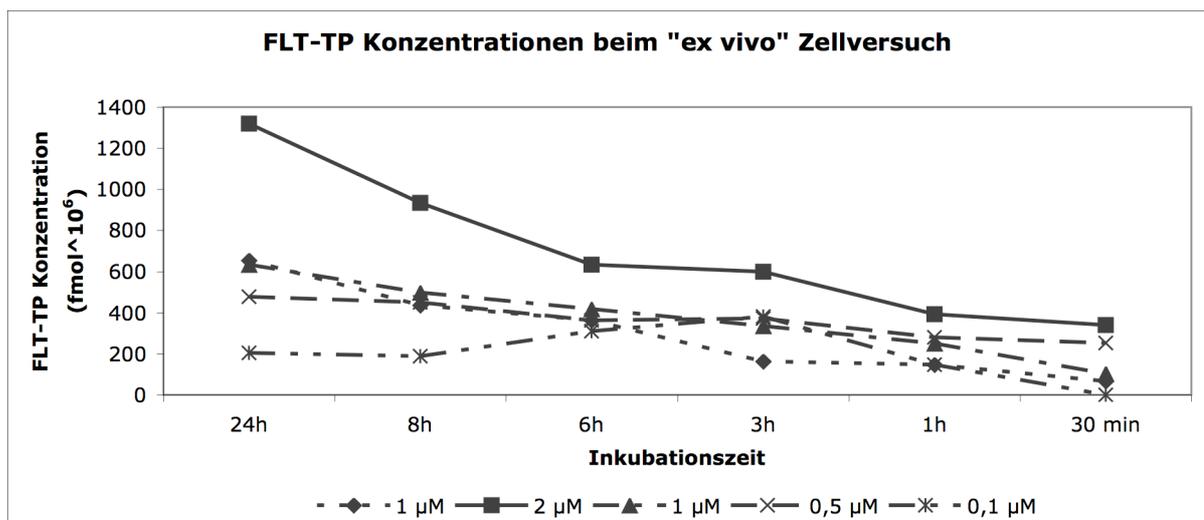
Zeit der Inkubation und Fosalvudin Tidoxil Konzentration	Berechnete FLT-TP Konzentration (ng/ml)	FLT-TP (fmol ¹⁰ ⁶)
24h 2μM	26	1320
8h 2μM	16	934
6h 2μM	13	633
3h 2μM	12	598
1h 2μM	8	392
30min 2μM	7	341
24h 1μM	13	653
8h 1μM	8	437
6h 1μM	7	363
3h 1μM	3	164
1h 1μM	3	148
30min 1μM	1	67

Tab. 4.10: FLT-TP Konzentrationen im "ex vivo" Zellversuch mit der Methode B (Fortsetzung)

Zeit der Inkubation und Fosalvudin Tidoxil Konzentration	Berechnete FLT-TP Konzentration (ng/ml)	FLT-TP (fmol ¹⁰ ⁶)
24h 1 μ M	14	634
8h 1 μ M	10	498
6h 1 μ M	8	418
3h 1 μ M	7	336
1h 1 μ M	5	251
30min 1 μ M	2	104
24h 0,5 μ M	10	478
8h 0,5 μ M	9	450
6h 0,5 μ M	7	363
3h 0,5 μ M	7	371
1h 0,5 μ M	6	281
30min 0,5 μ M	6	251
24h 0,1 μ M	5	205
8h 0,1 μ M	4	188
6h 0,1 μ M	6	309
3h 0,1 μ M	6	382
1h 0,1 μ M	3	147
30min 0,1 μ M	0	0

In Abbildung 4.21 sind die FLT-TP Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit mit dem Anstieg der Triphosphatkonzentration über einen Zeitraum von 24 h dargestellt.

Bei einer Ausgangskonzentration von 2 μ M Fosalvudin zeigt sich der größte Umsatz zum entsprechenden Triphosphat, bei 0,1 μ M der geringste Umsatz.

**Abb. 4.21: FLT-TP Konzentration des Zellversuchs mit der Methode B**

Darstellung des Umsatzes von unterschiedlichen Fosalvudin Konzentrationen zu FLT-TP über 24 h.

4.4 Die klinische Phase-II Studie

Nachdem die beiden Methoden A und B im Zellversuch getestet wurden, folgte die FLT-TP Messung im Rahmen der klinischen Studie HDP 302. Zuerst wurde die Methode A verwendet und anschließend die Methode B. Die durchschnittliche Lymphozyten Zahl der HIV-Patienten lag bei 5,5 Millionen Zellen pro Probe. Um die Richtigkeit und Präzision der Messung während des einzelnen Experimentes zu überprüfen, wurden für beide Methoden leere Lymphozyten mit jeweils sechs Millionen Zellen pro Probe für die Aufbereitung von Kalibrationskurven- und Qualitätskontrollproben verwendet.

4.4.1 FLT-TP Messung mit Methode A zur Trennung von UTP und FLT-TP

Mit Methode A wurden die Kinetikprofile von 6 HIV-Patienten vermessen. Darunter waren drei Studienteilnehmer aus dem deutschen Studienzentrum und drei aus dem argentinischen Studienzentrum. Das Chromatogramm in Abb. 4.22 zeigt den Peak der höchsten Kalibrationskurvenkonzentration, der in diesem Messlauf gefunden wurde.

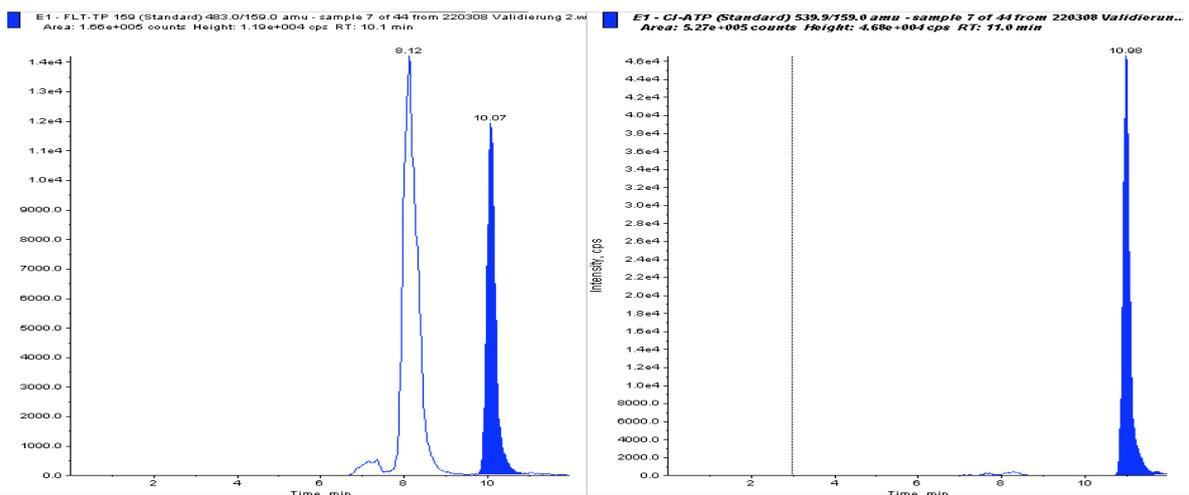


Abb. 4.22: FLT-TP (E1) Chromatogramm mit Methode A

Die Abbildung zeigt ein FLT-TP Chromatogramm, das während der Messung der klinischen Studie mit der Methode A nachgewiesen wurde. Auf der linken Seite ist bei acht min der endogene UTP-Peak dargestellt, bei zehn min der FLT-TP Peak. Die rechte Seite der Abbildung zeigt den Peak des internen Standards (CI-ATP).

Es konnte kein FLT-TP in den Lymphozyten der Probanden mit der Methode A nachgewiesen werden (Abb. 4.23).

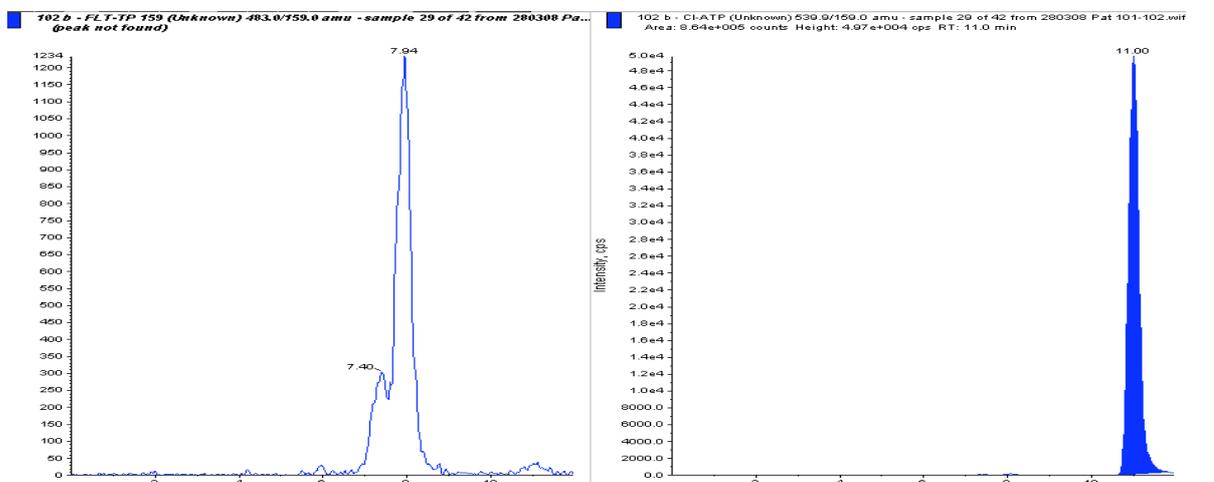


Abb. 4.23: Chromatogramm eines 3h-Wertes mit der Methode A

Auf der linken Seite ist nur der endogene UTP-Peak zu sehen. Der FLT-TP Peak bei zehn min ist nicht zu erkennen. Auf der rechten Seite ist wie in Abb. 4.22 der Peak des internen Standards (CI-ATP) zu sehen.

Obwohl FLT-TP mit dieser Methode in den Lymphozyten nicht nachgewiesen werden konnte, soll die Darstellung der QCs zeigen, dass alle Abweichungen innerhalb des von der FDA geforderten Rahmen von +/- 15 % lagen. Damit wurde die Richtigkeit und Präzision der Methode akzeptiert.

Tab. 4.11: Qualitätskontrollen bei der klinischen Studie mit Methode A

FLT-TP	Soll (fmol ^{10⁶})	Ist/MW (fmol ^{10⁶})	R.E.%	SD	C.V.%
QC 5	179	174	-3	19	11
QC 3	717	725	1	68	9
QC 1	2870	2810	-2	551	20

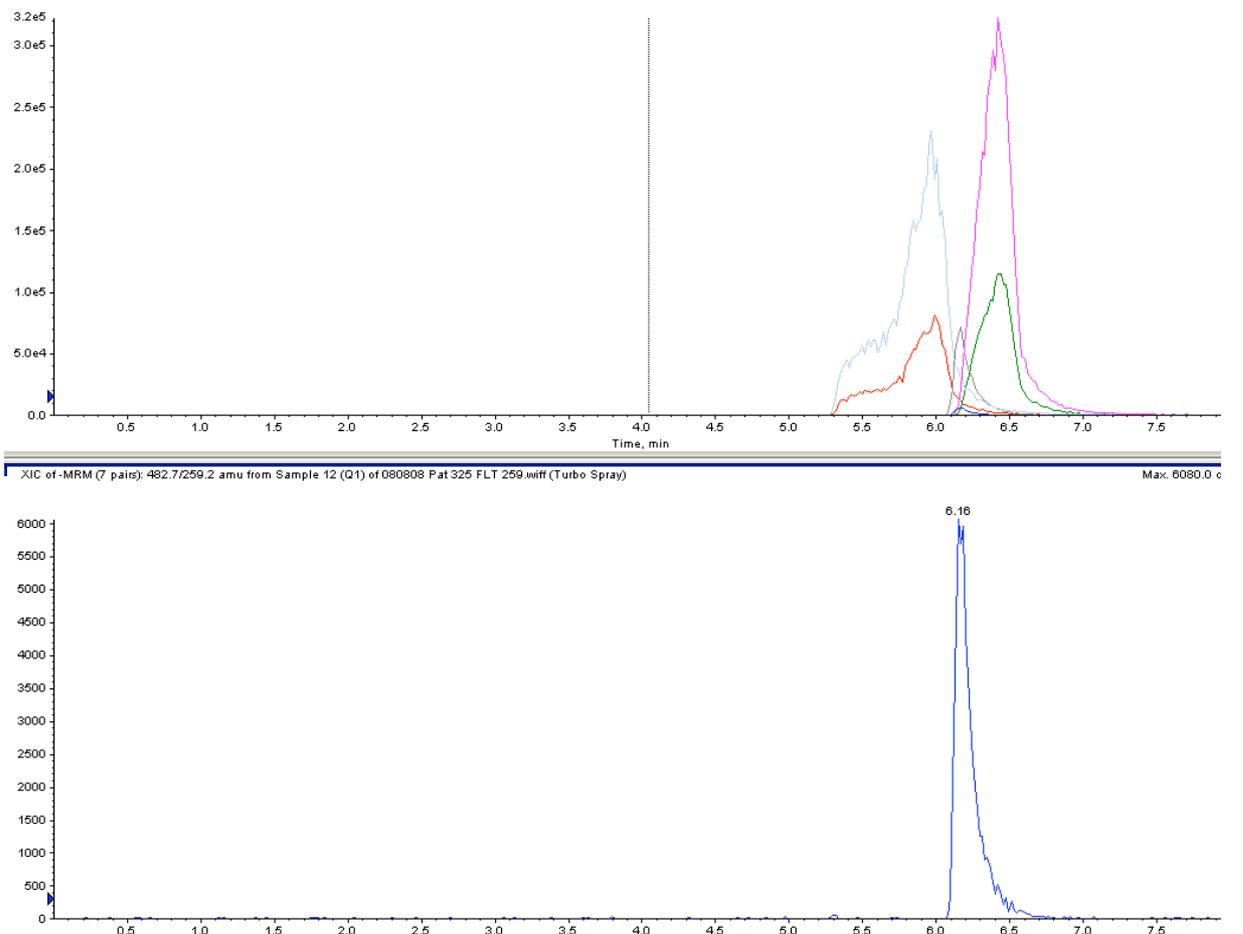
4.4.2 FLT-TP Messung mit der Methode B

Diese Methode wurde verwendet, um die FLT-TP Kinetikprofile im Rahmen der klinischen Studie zu analysieren. FLT-TP konnte in den Lymphozyten der Studie mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Die ebenfalls vermessenen Qualitätskontrollen lagen jedoch alle im Bereich von +/- 15 %, so dass die Richtigkeit und Präzision der Methode akzeptiert wurde.

Tab. 4.12: Qualitätskontrollen bei der klinischen Studie mit der Methode B

FLT-TP	Soll (fmol ^{10⁶})	Ist/MW (fmol ^{10⁶})	R.E.%	SD	C.V.%
QC 5	318	329	4	8	2
QC 3	955	1080	13	41	4
QC 1	2870	3170	11	140	4

In Abb. 4.24 ist ein Chromatogramm der Q1 Qualitätskontrolle exemplarisch dargestellt.

**Abb. 4.24: Chromatogramm von Q1 mit der Methode B**

In der oberen Hälfte der Abbildung sind die Peaks der beiden internen Standards ddC-TP und CI-ATP deutlich zu sehen. Dazwischen liegen der endogene UTP-Peak (159) und der signalarme FLT-TP Peak (482,7 → 259), der mit dieser Darstellungsmöglichkeit nicht mehr zu sehen ist. In der unteren Hälfte der Abb. ist der signalarme Peak des FLT-TP noch einmal isoliert von den anderen Peaks zu sehen.

5. Diskussion

Der antiretrovirale Wirkstoff Fosalvudin Tidoxil ist ein Thymidin-Analogon aus der Substanzklasse der nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI). NRTI werden durch Diffusion von humanen Lymphozyten aufgenommen. Dort werden sie zum aktiven Metaboliten, dem jeweiligen Triphosphat, durch zelluläre Kinasen umgewandelt (siehe 2.4.2). Um eine Aussage über die Wirkspiegel von NRTI-TP treffen zu können, muss die Konzentration der aktiven Form in den Lymphozyten gemessen werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es für FLT-TP, den aktiven Metaboliten von Fosalvudin Tidoxil, eine Messmethode auf Grundlage der direkten Quantifizierung von intrazellulären NRTI-Triphosphaten zu entwickeln. Der Wirkstoff ist zurzeit in Phase-II der klinischen Entwicklung. Die neue Methode zur intrazellulären Messung von FLT-TP sollte eine einfache Probenaufbereitung und eine schnelle zuverlässige Analytik mittels Ionenpaarchromatographie beinhalten. Der Nachweis von FLT-TP erfolgte unter Einsatz eines Tandem-Massenspektrometers. Nach der Validierung sollte die neue Methode in „ex vivo“ Zellversuchen an stimulierten humanen Lymphozyten überprüft und im Rahmen einer klinischen Phase-II Studie von Fosalvudin eingesetzt werden, um die intrazelluläre Pharmakokinetik von FLT-TP zu untersuchen.

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Entwicklung der Methode, deren Validierung und deren Anwendung in der klinischen Phase-II Studie diskutiert.

5.1 Entwicklung und Validierung der intrazellulären Analytik von FLT-TP

Als erstes wurde im Vorfeld der analytischen Methodenentwicklung die Lymphozyten-Isolation optimiert, um eine Veränderung der FLT-TP Konzentration in den Lymphozyten zu vermeiden. Als Grundlage für die Isolation der Zellen diente die Buffy-Coat Methode. Alle Arbeitsschritte erfolgten während der Lymphozyten-Isolation mit gekühlten Medien und einer Kühlzentrifuge.

Für die Blutabnahme verwendete ich handelsübliche Heparin-Monovetten, um Leerzellen für die Herstellung von Qualitätskontrollen und Eichproben zu gewinnen. Dadurch konnte ein Pool an Lymphozyten erzeugt werden, der in einzelne Aliquots aufgeteilt wurde. Jedes Aliquot enthielt eine durchschnittliche Zellzahl von sechs Millionen Zellen pro Probe.

Während der klinische Phase-II Studie empfahlen wir dagegen den Gebrauch von CPT-Röhrchen, mit denen eine definierte Blutmenge von jedem Probanden entnehmbar ist. Damit sollten die Arbeitsschritte der Probenvorbereitung in den Studienzentren vereinfacht und die Vergleichbarkeit und Qualität der Aufbereitung der Patienten-Proben erhöht werden.

Im Anschluss an die Optimierung der Lymphozyten-Isolation entwickelte ich für FLT-TP eine Ionenpaarchromatographie Methode mit MS/MS Detektion - in Anlehnung an publizierte Methoden für die beiden Thymidin-Analoga Zidovudin und Stavudin [81-83]. Bevor FLT-TP im Massenspektrometer analysiert werden kann, muss es aus den isolierten Lymphozyten extrahiert werden. Die Proteinfällung erfolgte mittels gekühlter Methanol-Wasser-Lösung. Zusätzlich wird die Fällung der Proteine durch ein anschließendes Ultraschallbad unterstützt. Im Gegensatz zu den von Becher und Pruvost et al. beschriebenen Methoden wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Tris-HCl benutzt, da dies zu Ablagerungen in der Elektrosprayquelle führte [81-83]. Im weiteren Verlauf der Messung spülte ich die Elektrosprayquelle mit Wasser/Methanol mit Hilfe einer zusätzlichen Pumpe, um Rückstände der Fließmittel in der Quelle zu verringern.

Nachdem FLT-TP aus den Lymphozyten extrahiert war, dampfte ich den gewonnenen Überstand bis zur Trockene ein und rekonstituierte diesen in 65 µl mobiler Phase A. Mit diesem Schritt wird im Unterschied zu dem von Pruvost und Becher et al. beschriebenen Vorgehen ein ungleichmäßiges Probenvolumen vermieden. Pruvost und Becher et al. evaporierten lediglich Methanol bis auf ein Flüssigkeitsvolumen von 120 – 150 µl [81-83].

Für FLT-TP konnten drei relevante Massenübergänge nachgewiesen werden, darunter die Abspaltung der Pyrophosphatgruppe bei $483,0 \rightarrow 159,0$, die allerdings bei allen Triphosphaten messbar war.

Des Weiteren optimierte ich die Methoden A und B für den Massenübergang $482,8 \rightarrow 384,2$ (Methode A) und die Transition $482,8 \rightarrow 259,0$ (Methode B).

Jedes Molekül weist bei Kollision im Massenspektrometer unter geeigneten Bedingungen ein spezifisches Fragmentationsmuster auf. Die natürlich vorkommenden endogenen Triphosphate in biologischem Probenmaterial, wie zum Beispiel ATP oder UTP, fragmentieren unter der signalintensiven Abspaltung der Pyrophosphatgruppe. FLT-TP fragmentierte unter den gewählten Bedingungen ebenfalls durch die signalintensive Abspaltung der Pyrophosphatgruppe. Damit konnte das FLT-TP Signal nicht von den endogenen Signalen unterschieden werden. Um eine eindeutige Identifizierung des FLT-TP Signals unter den endogenen Triphosphaten zu gewährleisten, optimierte ich die beiden signalschwächeren FLT-TP Massenübergänge für die Methoden.

Zusätzlich zu FLT-TP beinhalteten die beiden Methoden A und B zwei interne Standards, ddC-TP mit $450,2 \rightarrow 352,1$ (159,0) und 2Cl-ATP mit der Transition $539,9 \rightarrow 442,2$ (159,0). Die internen Standards sind dem FLT-TP chemisch ähnlich und verhalten sich bei der Probenaufbereitung und der Analyse analog dem FLT-TP. Die beiden internen Standards ddC-TP und 2Cl-ATP dienen als relative Bezugsgröße und werden zu Beginn der Probenaufbereitung gleichzeitig mit dem FLT-TP zu den Zellproben gegeben. Dadurch können Verdünnungs- oder Konzentrationsfehler während der Probenaufbereitung kompensiert werden. Die quantitative Bestimmung des FLT-TP am Ende der Messung erfolgte durch das Verhältnis von Analytenfläche zur internen Standardfläche. Zusätzlich dienen ddC-TP und 2Cl-ATP als Bezugspunkt auf der Zeitachse des Chromatogramms.

Bei Methode A und B setzte ich in der vorliegenden Arbeit 1,5-DMHA als Ionenpaarreagenz und Ammoniumformiat als Gegenion. Die chromatographische Trennung von FLT-TP erfolgte bei den Methoden A und B wie bei den publizierten Methoden mit einer Supelcogel ODP-50 Säule und im negativen Modus mit Hilfe des multiplen Reaktionsmonitoring (MRM) [81-83]. Im Unterschied zu den von Pruvost und Becher et al. beschriebenen Methoden zur Messung von d4T-Triphosphaten, betrug die Gradientenlaufzeit der beiden im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden nur 10 (Methode B) bzw. 15 min (Methode A), statt 26 min [82, 83].

Zwei Ursachen können den zeitlichen Vorteil der entwickelten Methoden erklären: erstens die im Vergleich zu den publizierten Methoden niedrigeren Konzentrationen des Ionenpaarreagenzes 1,5-DMHA und zweitens der geringere pH-Wert.

Im Unterschied zu der von Pruvost und Becher et al. beschriebenen 10 mM DMHA Konzentration, lag das Optimum für DMHA bei den Methoden A und B bei 2,25 mM. Der optimale pH-Wert betrug 9, während Becher und Pruvost et al. ein pH-Wert von 11,5 angaben [82, 83].

Die Verwendung von Ionenpaarreagenzien in hohen Konzentrationen und hohen pH-Werten zu Beginn der Methodenentwicklung stellten eine große Belastung für die HPLC-Pumpe, die Regenerationszeit und die Lebensdauer der Säule sowie für das Massenspektrometer dar. Die Interaktion des Ionenpaarreagenzes mit dem Trägermaterial der Säule führte dazu, dass sich im Laufe der Zeit immer mehr DMHA-Moleküle am Trägermaterial der Säule absetzten. Während der Regenerationsphase werden die DMHA-Moleküle wieder von der Säule gewaschen und der Ausgangszustand hergestellt. Je mehr die Säule mit DMHA belegt wird, desto länger muss die Säule gespült werden, um den Ausgangszustand wieder herzustellen. Im Vergleich zu den von Becher und Pruvost et al. publizierten Methoden kam bei den Methoden A und B nur ein Fünftel des Ionenpaarreagenzes zum Einsatz. Dadurch benötigte die Säule in diesem Fall eine kürzere Equilibrationszeit.

Der pH-Wert hat ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität und die Lebensdauer der Säule. Liegt der pH-Wert niedriger als der empfohlene pH-Bereich, werden die funktionellen Gruppen durch Hydrolyse abgespalten. Wählt man dagegen einen höheren pH-Wert als den empfohlenen, kann sich das Trägermaterial auflösen.

5.1.1 Validierung

Die Validierung der beiden Methoden A und B erfolgte nach den Richtlinien der FDA [94].

Selektivität: Bei Überprüfung der Selektivität der Methoden A und B lag der relative Fehler bei 1 bzw. 10 % und der Variationskoeffizient bei 6 bzw. 4 %. Somit konnten die geforderten Kriterien der FDA eingehalten werden.

Richtigkeit und Präzision: Der relative Fehler der Methode A lag durchschnittlich bei -2 % und der Variationskoeffizient bei 8 %. Die Methode B wies einen relativen Fehler von 9 % und einen Variationskoeffizient von 3 % auf. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den von Pruvost und Becher et al. beschriebenen Daten [80, 83].

Die Werte der Kalibrationskurven der Methode A und B lagen zwischen 89 und 2870 fmol/10⁶ Zellen (ausgehend von sechs Millionen Zellen pro Probe).

Ebenso wie bei den publizierten Methoden für d4T-TP und AZT-TP wurden für die Methoden A und B lineare Eichkurven ($y=Ax+B$) erstellt. Die kleineren Kalibrationswerte erhielten mit dem Faktor $1/x$ eine stärkere Gewichtung [80-83]. X entspricht der Menge an zugesetztem FLT-TP und Y beschreibt das Verhältnis der FLT-TP Peak-Fläche zur Peak-Fläche des internen Standards.

Neben der Richtigkeit und Präzision der Methode überprüfte ich auch die Temperaturstabilität und Re-Injektion von FLT-TP während der Messung. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass FLT-TP im Rahmen der Probenaufbereitung, bei einer Lagerung bei 4°C und bei Raumtemperatur über 12h keine Degradation aufwies und stabil war.

Sensitivität - untere Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate: Im Gegensatz zu den publizierten Methoden zur Messung von d4T-TP und AZT-TP (ca. 10 fmol/10⁶ Zellen) lag die untere Nachweisgrenze (LLOQ) bei den beiden für FLT-TP entwickelten Methoden A und B bei 89 fmol/10⁶ Zellen [81-83]. Obwohl noch kein Anhaltspunkt für die tatsächliche Konzentration von FLT-TP in menschlichen Lymphozyten vorliegt, sind die entwickelten Methoden A und B um den Faktor neun weniger sensitiv als die von Becher und Pruvost et al. publizierten Methoden [81-83].

Dieser Verlust an Sensitivität könnte durch die Interferenz mit UTP verursacht sein, weil UTP mit FLT-TP um die Ionisation in der Elektrosprayquelle konkurrierte. Ähnliche Probleme beschrieb Becher et al. bei der direkten Messung von AZT-TP, wo Interferenzen zwischen endogenem dGTP und ATP auftraten [81]. Die Arbeitsgruppe von Becher et al. entwickelte deshalb einen enzymatischen Immunoassay mit einem polyklonalen Antikörper zur spezifischen Extraktion von AZT-TP aus den Lymphozyten. AZT-TP sollte über eine Kopplung an den Antikörper von den endogenen Nukleosiden getrennt werden.

Bei dieser Methode konkurrierte jedoch AZT-MP um den polyklonalen Antikörper und führte zu einer falschen Interpretation der AZT-TP Konzentration in humanen Lymphozyten [81]. Neben diesem Ansatz setzte die Arbeitsgruppe um Becher et al. eine „off-line“ Kombination aus Immunoaffinitäts-Extraktion und LC-MS/MS ein, um den aktiven Metaboliten von Zidovudin zu quantifizieren. Die Wiederfindungsrate für AZT-TP betrug jedoch nur 50 %. 25 % von AZT-TP konnten nicht von der Extraktionssäule eluiert werden. Die restlichen 25 % wurden vermutlich bei der Evaporation thermisch zersetzt [81].

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode A zeigte dagegen eine Wiederfindungsrate von 61 %. Der Verlust von FLT-TP lag bei dieser Methode vermutlich nicht im Bereich der Probenaufbereitung, sondern erst bei der Ionisierung in der Elektrosprayquelle. Dort führte wahrscheinlich die Überlappung mit dem starken endogenen UTP Signal zu einer verminderten Wiederfindungsrate von FLT-TP.

Deshalb entwickelte ich die zweite Methode B mit dem signalschwächeren FLT-TP Massenübergang. Bei dieser Methode lag die Wiederfindungsrate bei 96 %, da in diesem Massenbereich keine Überlappung mit dem endogenen UTP zu finden war. Damit war die Wiederfindungsrate vergleichbar mit der von anderen publizierten Methoden zur direkten quantitativen Bestimmung von aktiven Metaboliten der anderen Thymidin-Analoga [78, 80].

Obwohl bei Methode B die Wiederfindungsrate von FLT-TP gesteigert werden konnte, lag die untere Nachweisgrenze (LLOQ) wie bei Methode A bei $89 \text{ fmol}/10^6$ Zellen. Fosalvudin wird in einer wesentlich geringeren Dosierung als Zidovudin oder Stavudin eingesetzt (siehe 2.5.2). Demzufolge werden die intrazellulären FLT-TP Konzentrationen unter den bekannten AZT-TP (durchschnittlich $110 \text{ fmol}/10^6$ Zellen) oder d4T-TP (durchschnittlich $31 \text{ fmol}/10^6$ Zellen) Konzentrationen liegen [78-83]. Dies lässt vermuten, dass FLT-TP bei einer unteren Nachweisgrenze von $89 \text{ fmol}/10^6$ Zellen in den klinischen Proben nicht nachweisbar sein wird. Dennoch war die Methode B mit diesem LLOQ sensitiver als die von Compain et al. beschriebene Methode zur intrazellulären Messung von AZT-TP, welche die Nachweisgrenze für AZT-TP mit $150 \text{ fmol}/10^6$ Zellen angab [78]. Compain et al. verwendeten einen signalschwächeren, aber hoch spezifischen Massenübergang von AZT-TP. Zusätzlich versetzte die Arbeitsgruppe um Compain et al. die Proben mit bekannten Mengen an AZT-TP, die bei der späteren Berechnung der Konzentration berücksichtigt wurden.

Die neue Methode B verzichtet auf diese Prozedur, da dieses Verfahren im Falle von AZT-TP keine Steigerung der Sensitivität liefern konnte. Durch die Art und Weise der von Compain et al. beschriebenen Probenaufbereitung wird zudem ein möglicher Fehler in die intrazelluläre Messung von Triphosphaten eingebracht, weil eine falsche Probenhandhabung zu positiven Werten führen könnte.

Der limitierende Faktor für die Sensitivität bei der intrazellulären Quantifizierung von NRTI-TP ist das Blutvolumen, aus der die humanen Lymphozyten isoliert werden. In der Literatur sind Blutabnahmen von 10 bis 50 ml Blut beschrieben, um eine untere Nachweisgrenze von 50 fmol/10⁶ Zellen AZT-TP zu erreichen [95-98].

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden A und B verwendeten 7 ml Blut, wie es auch von der französischen Arbeitsgruppe beschrieben wurde [78, 80-83].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei validierte Methoden A und B entwickelt, die trotz der relativ hohen FLT-TP Quantifizierungsgrenze von 89 fmol/10⁶ Zellen im „ex vivo“ Zellversuch und an Proben einer klinischen Phase-II Studie auf ihre Funktionalität überprüft wurden.

5.2 „Ex vivo Zellversuch“

Bei diesem „ex vivo“ Zellversuch sollte untersucht werden, ob FLT-TP mit den entwickelten Methoden A und B in humanen Lymphozyten quantifizierbar ist. Der Zellversuch orientierte sich an den von Kong et al. beschriebenen Bedingungen zur Bestimmung der intrazellulären Pharmakokinetik von Alovudin und Zidovudin [58].

Für den „ex vivo“ Zellversuch stimulierte ich zuerst humane Lymphozyten mit PHA-M und inkubierte diese anschließend mit der Substanz Fosalvudin Tidoxil. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte nach der in Abschnitt 3.2.5.2 beschriebenen Methode, um FLT-TP später zu messen.

Im Gegensatz zu der von Kong et al. beschriebenen Konzentration von 1,8 µM radioaktiv markiertem FLT, wurden die Lymphozyten in dem Zellversuch der vorliegenden Arbeit mit 0,1; 0,5; 1,0 und 2,0 µM Fosalvudin Tidoxil inkubiert. Darüber hinaus behandelte ich die PMBC für 24 h bei 37°C und nicht nur für 12 h wie bei Kong et al. beschrieben.

Obwohl ich anhand des MTT-Tests nachweisen konnte, dass die Lymphozyten während der Inkubation vital waren, konnte ich mit der validierten Methode A kein FLT-TP messen. Dies steht möglicherweise mit der niedrigen Wiederfindungsrate von 61 % der Methode A im Zusammenhang. Wahrscheinlich war Methode A nicht sensitiv genug, um FLT-TP bei einer Lymphozytenzahl von einer Million pro Probe zu messen.

Dagegen konnte ich mit Methode B die Anabolisierung zum aktiven Metaboliten FLT-TP bei den Konzentrationen von 0,5; 1,0 und 2,0 μM Fosalvudin nachweisen.

Bei der Konzentration von 0,1 μM war FLT-TP mit der Methode B nach einer Inkubationszeit von 30 min nicht messbar. Im zeitlichen Verlauf der 24-stündigen Inkubation während des „ex vivo“ Zellversuchs war eine sehr starke Schwankung innerhalb der FLT-TP Werte zu beobachten. Das könnte einerseits durch die unterschiedlichen Zellzahlen bei diesem Versuch begründet sein. Andererseits war die Methode B wahrscheinlich nicht sensitiv genug.

Die untere Grenze der Quantifizierung lag bei diesem „ex vivo“ Zellversuch bei 269 fmol/ 10^6 Zellen bezogen auf zwei Millionen Zellen pro Probe, die für die Kalibrationskurven und Qualitätskontrollen eingesetzt wurden. Nach den vorher festgelegten Validierungskriterien, wären bei diesem „ex vivo“ Zellversuch nur die gemessenen Werte für die Ausgangskonzentration von 2,0 μM Fosalvudin Tidoxil akzeptierbar. Diese Konzentration entspricht auch annähernd den 1,8 μM , die von Kong et al. eingesetzt wurden.

Bei einer Ausgangskonzentration von 2,0 μM wurde nach 30 minütiger Inkubation ein FLT-TP Umsatz von 341 fmol/ 10^6 Zellen nachgewiesen. Dieser Umsatz stieg im Verlauf der Inkubation bis zu 1320 fmol/ 10^6 Zellen FLT-TP bei 24 h an. Kong et al. beschreiben nach 12 h Inkubation mit Alovudin eine Plateauphase bei der FLT-TP Bildung. Diese Plateauphase war in der vorliegenden Arbeit nicht zu sehen, weil während des Versuchs kein 12 h Wert aufbereitet wurde.

Möglicherweise stieg die FLT-TP Konzentration auch in der vorliegenden Arbeit innerhalb von 12 h auf ein Maximum an und fiel anschließend auf 1320 fmol/ 10^6 Zellen FLT-TP bei einer Inkubationszeit von 24 h ab. Bei Kong et al. lagen die gemessenen Konzentrationen von FLT-TP zwischen 10 fmol/ 10^6 Zellen und 1400 fmol/ 10^6 Zellen FLT-TP. Im Anschluss an die Plateauphase folgte nach 12 h ein Abfall der FLT-TP Konzentration auf ca. 500 fmol/ 10^6 Zellen innerhalb von 13h [58].

Man kann vermuten, dass die gemessenen FLT-TP Konzentrationen dieser Arbeit mit den von Kong et al. beschriebenen Werten vergleichbar sind, weil bei der vorliegenden Arbeit 2,0 μM Fosalvudin Tidoxil als Ausgangskonzentration eingesetzt wurden.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte „ex vivo“ Zellversuch wies im Unterschied zu dem von Kong et al. publizierten Zellversuch folgende Unterschiede auf:

Erstens wurde nicht wie von Kong et al. beschrieben der differenzierte Umsatz von Fosalvudin zu FLT-MP und FLT-DP gemessen, weil im Rahmen dieser Arbeit lediglich untersucht werden sollte, ob FLT-TP mit den entwickelten Methoden A und B quantifizierbar ist. Darüber hinaus standen im Rahmen der Methodenentwicklung die Reinsubstanzen von FLT-MP und FLT-DP nicht zur Verfügung.

Zweitens konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein radioaktiv markiertes Fosalvudin eingesetzt werden. Dadurch konnte bei diesem „ex vivo“ Zellversuch nicht analysiert werden, in welchem Umfang die Substanz Fosalvudin von den Zellen aufgenommen und über die einzelnen Phosphorylierungsstufen zum aktiven Metaboliten anabolisiert wird.

5.3 Die klinische Phase-II Studie

Die validierten Methoden A und B wurden im Rahmen einer klinischen Phase-II Studie von Fosalvudin eingesetzt, um die intrazelluläre Pharmakokinetik von FLT-TP zu untersuchen (s. Abschnitt 3.5).

FLT-TP konnte weder mit Methode A noch mit Methode B in den humanen Lymphozyten des Probenmaterials analysiert werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben.

Fosalvudin wurde in der klinischen Phase-II Studie in sehr niedrigen Dosierungen von 5 bis 40 mg einmal täglich gegeben. AZT wird momentan in zweimal täglichen Dosierungen von 250 mg oder 300 mg verabreicht. Damit ist die Dosis von Fosalvudin um das 12-fache geringer als die von AZT. D4T wird derzeit mit zweimal täglich 40 mg eingesetzt. Dementsprechend beträgt die Dosierung von Fosalvudin nur die Hälfte von d4T. Aufgrund der niedrigen Dosierung von Fosalvudin können geringere Plasmaspiegel im Vergleich zu AZT und d4T erwartet werden.

Demzufolge wären in humanen Lymphozyten noch niedrigere FLT-TP Spiegel im Vergleich zu AZT-TP und d4T-TP messbar.

Der entscheidende Faktor, ob FLT-TP in humanen Lymphozyten quantifiziert werden kann, ist vermutlich in der Sensitivität der Messmethode begründet. Die untere Nachweisgrenze mit $89 \text{ fmol}/10^6$ Zellen der Methoden A und B, die ich im Rahmen dieser Arbeit entwickelt habe, war wahrscheinlich für den intrazellulären Nachweis von FLT-TP zu hoch.

Neben der Sensitivität der entwickelten Methoden A und B haben die Durchführung der Lymphozyten-Isolation in den Studienzentren, die Lagerung und der Transport der isolierten Lymphozyten einen bedeutenden Einfluss auf die intrazelluläre Nachweisbarkeit von FLT-TP.

Die akkurate Probenhandhabung ist sehr wichtig bei der Lymphozyten-Isolation, weil während der Isolation verschiedene Aufnahme- oder Exportfunktionen der Zellen aktiv bleiben.

Dadurch kann ein Austausch zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Medium entstehen, der zu falschen Ergebnissen führt. Neben dem Austausch zwischen den Medien läuft die intrazelluläre Synthese, oder der Nukleotidabbau während der Zellseparation bei Raumtemperatur weiter. Bei 4°C dagegen, wird zum Beispiel der Abbau von d4T-TP über 6 h blockiert. Daher sollte die Lymphozyten-Isolation bei 4°C innerhalb von 2 h durchgeführt werden [80]. Lange Wege zwischen der Blutabnahme und der Lymphozyten-Isolation können zu einer erheblichen zeitlichen Verzögerung führen. Somit könnte ein möglicher FLT-TP Abbau während der Zellisolation erfolgt sein.

Neben der raschen Zellisolation ist die richtige Lagerung der Zellen ebenfalls von Bedeutung. So ist bekannt, dass intrazelluläre Enzyme die Stabilität der Analyten beeinflussen, weil ihre Aktivität bestehen bleibt [80]. Deshalb sollte die Lagerung der Zellen bei -80°C erfolgen. Die intrazellulären Phosphate von Zidovudin sind bei einer Temperatur von -20°C nur über einen Zeitraum von einem Monat stabil. Bei einer Lagerung bei -70°C bleibt AZT-TP sechs Monate stabil [99]. D4T-TP ist ebenfalls über einen Zeitraum von sechs Monaten bei -80°C stabil. Dagegen weist das Triphosphat von Didanosin nur eine Stabilität von drei Monaten auf und wird anschließend innerhalb von weiteren drei Monaten um bis zu 43 % abgebaut [80].

Der FLT-TP Abbau war auch parallel am endogenen UTP-Peak erkennbar. Der UTP-Peak in frischen Zellen, die nicht mehr als sechs Monate gelagert wurden, zeigte eine Intensität von $1,4 \times 10^4$ cps, wie in Abb. 4.22 zu sehen ist. Dagegen weist der UTP-Peak, der aus den Zellen der klinischen Studie stammt, nur noch eine Intensität von ca. 1300 cps auf, wie in Abb. 4.23 dargestellt. Im Laufe der Probenbearbeitung und während der Lagerung von 15 Monaten erfolgte ein Abbau um den Faktor 10.

Neben der Dauer der Lagerung sind wechselndes Frieren und Tauen bei den Zellproben für die Stabilität der intrazellulären Analyten ebenfalls von Bedeutung. So wurde für ZDV-TP beschrieben, dass während mehrerer Auftau- und Einfrierzyklen ein Abbau um bis zu 85 % erfolgte [99].

Die Messung von intrazellulären FLT-TP Spiegeln stellt nach wie vor eine große Herausforderung für die Bioanalytik dar. Die Methode muss eine hohe Selektivität besitzen, um Störungen von endogenen Nukleotiden bei der Messung und der Quantifizierung von FLT-TP zu kompensieren. Des Weiteren muss die Methode eine sehr niedrige Nachweisgrenze aufweisen, weil Fosalvudin im Gegensatz zu den anderen Thymidin-Analoga in sehr niedrigen Dosierungen eingesetzt wird. Eine entscheidende Bedeutung bei der Methodenentwicklung haben jedoch auch die Isolation der humanen Lymphozyten, die Probenaufbereitung und die Lagerung der Proben.

5.4 Ausblick

In weiteren Experimenten muss versucht werden die Sensitivität der entwickelten LC-MS/MS Methoden A und B im Rahmen von „ex vivo“ Zellversuchen zu erhöhen. Zusätzlich muss die Stabilität von FLT-TP näher spezifiziert werden. Erst danach kann durch den Einsatz der neuen Methoden in weiteren klinischen Studien eine nähere Aussage zu intrazellulären FLT-TP Konzentrationen getroffen werden. Im Rahmen von weiteren Zulassungsstudien können zukünftig mögliche Interaktionen von Fosalvudin in verschiedenen Therapieregimen untersucht werden. Dadurch können mögliche Kombinationspartner für Fosalvudin im Rahmen der HAART identifiziert werden, um zukünftige einmal tägliche Gaben von Medikamenten zu ermöglichen.

Zusätzlich kann untersucht werden, ob die intrazelluläre Pharmakokinetik von FLT-TP geschlechts- oder altersspezifische Unterschiede aufweist.

Der Einsatz der neuen Methoden im klinischen Alltag zur individuellen Therapieoptimierung wird jedoch spezialisierten Laboren vorbehalten bleiben, die über eine notwendige technische Ausstattung verfügen.

6. Zusammenfassung

Nukleosidische oder nukleotidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) bilden das Rückgrat einer hochaktiven antiretroviralen Kombinationstherapie [100]. Um vereinfachte und effektive Behandlungsregime für die HIV-Therapie mit NRTI zu entwickeln, sind Erkenntnisse über deren intrazelluläre pharmakokinetische Eigenschaften erforderlich. Daher empfiehlt die europäische Medizinagentur EMA Untersuchungen der intrazellulären Pharmakokinetik bei der Zulassung solcher antiretroviralen Arzneimittel.

In der vorliegenden Arbeit wurden für FLT-TP, den aktiven Metaboliten von Foslovudin Tidoxil, das sich in Phase-II der klinischen Entwicklung befindet, zwei Messmethoden (Methode A und B) auf Grundlage der direkten Quantifizierung von intrazellulären NRTI-Triphosphaten entwickelt. Beide Methoden zur intrazellulären Messung von FLT-TP kombinieren das Prinzip der Ionenpaarchromatographie mit einem sensitiven und spezifischen Nachweis mittels Tandem-Massenspektrometrie.

Die neuen Methoden A und B wurden gemäß den weltweiten Kriterien der US-amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA validiert, in „ex vivo“ Zellversuchen an stimulierten humanen Lymphozyten überprüft und im Rahmen einer klinischen Phase-II Studie von Heidelberg Pharma eingesetzt, um die intrazelluläre Pharmakokinetik von FLT-TP zu untersuchen.

Beide Methoden, A und B, erfüllten die von der FDA geforderten Validierungskriterien. Daher können sowohl Methode A und B im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt werden. Es wäre ebenfalls vorstellbar, beide Methoden routinemäßig beim Therapeutischen Drug Monitoring einzusetzen, weil nur eine kurze Messzeit von ca. 15 min pro Probe erforderlich ist. Der Nachteil beider Methoden liegt in der aufwendigen Probenvorbereitung, die hohe apparative, zeitliche und qualitative Anforderungen stellt.

Im „ex vivo“ Zellversuch konnte FLT-TP nur mit Methode B nachgewiesen werden, die eine höhere Spezifität als Methode A aufwies.

In der klinischen Phase-II Studie konnte der Nachweis von FLT-TP in den humanen Lymphozyten weder mit Methode A noch mit Methode B erbracht werden.

Weil Methode B wie im „ex vivo“ Zellversuch demonstriert, über eine ausreichend hohe Sensitivität zum Nachweis von FLT-TP verfügt, ist die Ursache nicht durch die Methode per se, sondern auch laborspezifisch (Blutabnahme, Lymphozyten-Isolation, Probenaufbereitung- und Lagerung) begründet.

In weiteren Experimenten an stimulierten humanen Lymphozyten müssen die neuen Methoden näher spezifiziert werden, um im Rahmen von klinischen Studien an größeren Patientenpopulationen eine Aussage über therapeutische intrazelluläre FLT-TP Konzentrationen treffen zu können.

Literaturverzeichnis

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 1981 Dec 10;305(24):1425-31.
2. Chermann JC, Barre-Sinoussi F, Dauguet C, et al. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiotics and chemotherapy* 1983;32:48-53.
3. UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic. 2008.
4. DAIG D-A-G. Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion. 2007.
5. DHHS. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. 2008.
6. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *The New England journal of medicine* 1998 Mar 26;338(13):853-60.
7. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Annals of internal medicine* 1997 Jun 15;126(12):946-54.
8. Cameron DW, Heath-Chiozzi M, Danner S, et al. Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. *Lancet* 1998 Feb 21;351(9102):543-9.
9. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *The New England journal of medicine* 1997 Sep 11;337(11):725-33.
10. d'Arminio Monforte A, Testa L, Adorni F, et al. Clinical outcome and predictive factors of failure of highly active antiretroviral therapy in antiretroviral-experienced patients in advanced stages of HIV-1 infection. *AIDS (London, England)* 1998 Sep 10;12(13):1631-7.
11. EMEA. Guideline on the Clinical Development of Medicinal Products for the Treatment of HIV Infection. 2007.

12. Holdich T, Shiveley LA, Sawyer J. Effect of Lamivudine on the plasma and intracellular pharmacokinetics of apricitabine, a novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007 Aug;51(8):2943-7.
13. Luciw. Human Immunodeficiency viruses and their replication. *Fields Virology* 1996;2:1881-952.
14. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (New York, NY)* 1986 Jul 18;233(4761):343-6.
15. Kostrikis LG, Cao Y, Ngai H, Moore JP, Ho DD. Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F, and I: lack of direct correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement. *Journal of virology* 1996 Jan;70(1):445-58.
16. Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS (London, England)* 1991 Jun;5(6):617-37.
17. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998 May 29;93(5):681-4.
18. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996 Jun 28;85(7):1149-58.
19. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):767-8.
20. Perez LG, O'Donnell MA, Stephens EB. The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *Journal of virology* 1992 Jul;66(7):4134-43.
21. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970 Jun 27;226(5252):1209-11.
22. Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM. Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 1987 May 8;49(3):347-56.
23. Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science (New York, NY)* 1990 Sep 28;249(4976):1555-8.

24. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992 Dec 18;41(RR-17):1-19.
25. Concorde: MRC/ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. Concorde Coordinating Committee. *Lancet* 1994 Apr 9;343(8902):871-81.
26. Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. Delta Coordinating Committee. *Lancet* 1996 Aug 3;348(9023):283-91.
27. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, et al. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *The New England journal of medicine* 1996 Oct 10;335(15):1081-90.
28. Kirk O, Mocroft A, Katzenstein TL, et al. Changes in use of antiretroviral therapy in regions of Europe over time. EuroSIDA Study Group. *AIDS (London, England)* 1998 Oct 22;12(15):2031-9.
29. Kirk O, Katzenstein TL, Gerstoft J, et al. Combination therapy containing ritonavir plus saquinavir has superior short-term antiretroviral efficacy: a randomized trial. *AIDS (London, England)* 1999 Jan 14;13(1):F9-16.
30. Henry K, Erice A, Tierney C, et al. A randomized, controlled, double-blind study comparing the survival benefit of four different reverse transcriptase inhibitor therapies (three-drug, two-drug, and alternating drug) for the treatment of advanced AIDS. AIDS Clinical Trial Group 193A Study Team. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998 Dec 1;19(4):339-49.
31. Zhu QY, Scarborough A, Polsky B, Chou TC. Drug combinations and effect parameters of zidovudine, stavudine, and nevirapine in standardized drug-sensitive and resistant HIV type 1 strains. *AIDS research and human retroviruses* 1996 Apr 10;12(6):507-17.
32. D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA, et al. Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Annals of internal medicine* 1996 Jun 15;124(12):1019-30.
33. De Clercq E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral research* 1998 Jun;38(3):153-79.

34. Flexner C. HIV-protease inhibitors. *The New England journal of medicine* 1998 Apr 30;338(18):1281-92.
35. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *The Journal of experimental medicine* 1997 Feb 17;185(4):621-8.
36. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science (New York, NY)* 2000 Jan 28;287(5453):646-50.
37. Acosta EP, Page LM, Fletcher CV. Clinical pharmacokinetics of zidovudine. An update. *Clinical pharmacokinetics* 1996 Apr;30(4):251-62.
38. Wilde MI, Langtry HD. Zidovudine. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 1993 Sep;46(3):515-78.
39. Back DJ, Burger DM, Flexner CW, Gerber JG. The pharmacology of antiretroviral nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors: implications for once-daily dosing. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 2005 Aug 1;39 Suppl 1:S1-23, quiz S4-5.
40. Hurst M, Noble S. Stavudine: an update of its use in the treatment of HIV infection. *Drugs* 1999 Nov;58(5):919-49.
41. Rana KZ, Dudley MN. Clinical pharmacokinetics of stavudine. *Clinical pharmacokinetics* 1997 Oct;33(4):276-84.
42. Lea AP, Faulds D. Stavudine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical potential in HIV infection. *Drugs* 1996 May;51(5):846-64.
43. Anderson PL, Kakuda TN, Lichtenstein KA. The cellular pharmacology of nucleoside- and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *Clin Infect Dis* 2004 Mar 1;38(5):743-53.
44. Brinkman K, ter Hofstede HJ, Burger DM, Smeitink JA, Koopmans PP. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS (London, England)* 1998 Oct 1;12(14):1735-44.
45. Lewis W, Dalakas MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature medicine* 1995 May;1(5):417-22.
46. Lewis W, Copeland WC, Day BJ. Mitochondrial dna depletion, oxidative stress, and mutation: mechanisms of dysfunction from nucleoside reverse transcriptase

inhibitors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2001 Jun;81(6):777-90.

47. Anderson PL, Kakuda TN, Kawle S, Fletcher CV. Antiviral dynamics and sex differences of zidovudine and lamivudine triphosphate concentrations in HIV-infected individuals. *AIDS (London, England)* 2003 Oct 17;17(15):2159-68.

48. Stretcher BN, Pesce AJ, Frame PT, Stein DS. Pharmacokinetics of zidovudine phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells from patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1994 Jul;38(7):1541-7.

49. Hoggard PG, Kewn S, Barry MG, Khoo SH, Back DJ. Effects of drugs on 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine phosphorylation in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1997 Jun;41(6):1231-6.

50. Ho HT, Hitchcock MJ. Cellular pharmacology of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine, a nucleoside analog active against human immunodeficiency virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1989 Jun;33(6):844-9.

51. Hoggard P, Khoo S, Barry M, Back D. Intracellular metabolism of zidovudine and stavudine in combination. *The Journal of infectious diseases* 1996 Sep;174(3):671-2.

52. Sim SM, Hoggard PG, Sales SD, Phiboonbanakit D, Hart CA, Back DJ. Effect of ribavirin on zidovudine efficacy and toxicity in vitro: a concentration-dependent interaction. *AIDS research and human retroviruses* 1998 Dec 20;14(18):1661-7.

53. Rodriguez-Torres M, Torriani FJ, Soriano V, et al. Effect of ribavirin on intracellular and plasma pharmacokinetics of nucleoside reverse transcriptase inhibitors in patients with human immunodeficiency virus-hepatitis C virus coinfection: results of a randomized clinical study. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005 Oct;49(10):3997-4008.

54. Piscitelli SC, Kelly G, Walker RE, et al. A multiple drug interaction study of stavudine with agents for opportunistic infections in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999 Mar;43(3):647-50.

55. Piscitelli SC, Gallicano KD. Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections. *The New England journal of medicine* 2001 Mar 29;344(13):984-96.

56. Hartmann H, Vogt MW, Durno AG, Hirsch MS, Hunsmann G, Eckstein F. Enhanced in vitro inhibition of HIV-1 replication by 3'-fluoro-3'-deoxythymidine compared to several other nucleoside analogs. *AIDS research and human retroviruses* 1988 Dec;4(6):457-66.

57. Balzarini J, Baba M, Pauwels R, Herdewijn P, De Clerq E. Anti-retrovirus activity of 3'-fluoro- and 3'-azido-substituted pyrimidine 2',3'-dideoxynucleoside analogues. *Biochemical pharmacology* 1988 Jul 15;37(14):2847-56.
58. Kong XB, Zhu QY, Vidal PM, et al. Comparisons of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1992 Apr;36(4):808-18.
59. Matthes E, Lehmann C, Scholz D, Rosenthal HA, Langen P. Phosphorylation, anti-HIV activity and cytotoxicity of 3'-fluorothymidine. *Biochemical and biophysical research communications* 1988 Jun 16;153(2):825-31.
60. Mansuri MM, Hitchcock MJ, Buroker RA, et al. Comparison of in vitro biological properties and mouse toxicities of three thymidine analogs active against human immunodeficiency virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1990 Apr;34(4):637-41.
61. Bottiger D, Stahle L, Li SL, Oberg B. Long-term tolerance and efficacy of 3'-azidothymidine and 3'-fluorothymidine treatment of asymptomatic monkeys infected with simian immunodeficiency virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1992 Aug;36(8):1770-2.
62. Katlama C, Ghosn J, Tubiana R, et al. MIV-310 reduces HIV viral load in patients failing multiple antiretroviral therapy: results from a 4-week phase II study. *AIDS (London, England)* 2004 Jun 18;18(9):1299-304.
63. Kim EY, Vrang L, Oberg B, Merigan TC. Anti-HIV type 1 activity of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine for several different multidrug-resistant mutants. *AIDS research and human retroviruses* 2001 Mar 20;17(5):401-7.
64. Sundseth R, Joyner SS, Moore JT, Dornsife RE, Dev IK. The anti-human immunodeficiency virus agent 3'-fluorothymidine induces DNA damage and apoptosis in human lymphoblastoid cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1996 Feb;40(2):331-5.
65. Pharma H. Heidelberg Pharma AG starts second clinical phase II study with Fosalvudine. Press Release 2007 12. November.
66. Cahn P, Schuermann D, Reuss F, Wit F, Boehm E, Lange J. A phase-II study of 14 days monotherapy with the nucleoside-analogue Fosalvudine Tidoxil in treatment-naive HIV-1 infected adults. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention 2007;Abstract no. WEPEB114LB.
67. Reuss F, Kulke M, Braspenning J, Heckel-Östreicher B, Opitz H-G. Fosalvudine tidoxil, a novel alovudine-derived prodrug is activated and inhibits the replication of

HIV-1 in human PBMC. XVI International AIDS Conference 2006;Abstract no. THPE0025.

68. Cahn P, Reuss F, Rolon M. A phase I study to explore the safety, tolerability and pharmacokinetics of Fosavudine tidoxil in patients infected with HIV-1. XVI AIDS Conference 2006;THLB0216.

69. Munch-Petersen B, Cloos L, Tyrsted G, Eriksson S. Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *The Journal of biological chemistry* 1991 May 15;266(14):9032-8.

70. Hoggard PG, Lloyd J, Khoo SH, et al. Zidovudine phosphorylation determined sequentially over 12 months in human immunodeficiency virus-infected patients with or without previous exposure to antiretroviral agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001 Mar;45(3):976-80.

71. Wattanagoon Y, Na Bangchang K, Hoggard PG, et al. Pharmacokinetics of zidovudine phosphorylation in human immunodeficiency virus-positive thai patients and healthy volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2000 Jul;44(7):1986-9.

72. Fletcher CV, Acosta EP, Henry K, et al. Concentration-controlled zidovudine therapy. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1998 Sep;64(3):331-8.

73. Robbins BL, Waibel BH, Fridland A. Quantitation of intracellular zidovudine phosphates by use of combined cartridge-radioimmunoassay methodology. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1996 Nov;40(11):2651-4.

74. Barry MG, Khoo SH, Veal GJ, et al. The effect of zidovudine dose on the formation of intracellular phosphorylated metabolites. *AIDS (London, England)* 1996 Oct;10(12):1361-7.

75. Robbins BL, Poston PA, Neal EF, Slaughter C, Rodman JH. Simultaneous measurement of intracellular triphosphate metabolites of zidovudine, lamivudine and abacavir (carbovir) in human peripheral blood mononuclear cells by combined anion exchange solid phase extraction and LC-MS/MS. *Journal of chromatography* 2007 May 1;850(1-2):310-7.

76. Moore JD, Valette G, Darque A, Zhou XJ, Sommadossi JP. Simultaneous quantitation of the 5'-triphosphate metabolites of zidovudine, lamivudine, and stavudine in peripheral mononuclear blood cells of HIV infected patients by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2000 Dec;11(12):1134-43.

77. Font E, Rosario O, Santana J, Garcia H, Sommadossi JP, Rodriguez JF. Determination of zidovudine triphosphate intracellular concentrations in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus-infected individuals by

tandem mass spectrometry. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999 Dec;43(12):2964-8.

78. Compain S, Durand-Gasselín L, Grassi J, Benech H. Improved method to quantify intracellular zidovudine mono- and triphosphate in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2007 Mar;42(3):389-404.

79. Becher F, Pruvost AG, Schlemmer DD, et al. Significant levels of intracellular stavudine triphosphate are found in HIV-infected zidovudine-treated patients. *AIDS (London, England)* 2003 Mar 7;17(4):555-61.

80. Becher F, Pruvost A, Gale J, et al. A strategy for liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays of intracellular drugs: application to the validation of the triphosphorylated anabolite of antiretrovirals in peripheral blood mononuclear cells. *J Mass Spectrom* 2003 Aug;38(8):879-90.

81. Becher F, Schlemmer D, Pruvost A, et al. Development of a direct assay for measuring intracellular AZT triphosphate in humans peripheral blood mononuclear cells. *Analytical chemistry* 2002 Aug 15;74(16):4220-7.

82. Becher F, Pruvost A, Goujard C, et al. Improved method for the simultaneous determination of d4T, 3TC and ddI intracellular phosphorylated anabolites in human peripheral-blood mononuclear cells using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16(6):555-65.

83. Pruvost A, Becher F, Bardouille P, et al. Direct determination of phosphorylated intracellular anabolites of stavudine (d4T) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001;15(16):1401-8.

84. van Kampen JJ, Fraaij PL, Hira V, et al. A new method for analysis of AZT-triphosphate and nucleotide-triphosphates. *Biochemical and biophysical research communications* 2004 Feb 27;315(1):151-9.

85. Hoggard Pea. Virological failure is associated with decreased 3TCTP and ratio of 3TCTP/endogenous dCTP in HIV+ individuals in clinical setting. 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 2002.

86. Fletcher CV, Kawle SP, Kakuda TN, et al. Zidovudine triphosphate and lamivudine triphosphate concentration-response relationships in HIV-infected persons. *AIDS (London, England)* 2000 Sep 29;14(14):2137-44.

87. Horvath C, Melander W, Molnar I, and Molnar P. Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *Analytical chemistry* 1977;49(14):2295-305.

88. Kraak JC, Jonker KM, Huber JK. Solvent-generated ion-exchange systems with anionic surfactants for rapid separations of amino acids. *J Chromatogr* 1977 Nov 11;142:671-88.
89. Kissinger PT. Reverse-phase ion-pair partition chromatography. *Comments. Analytical chemistry* 1977;49(6):883.
90. Hoffmann NE, Liao JC. Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions. *Analytical chemistry* 1977;49(14):2231-4.
91. Bidlingmeyer BA, Deming SN, Price WPJ, Sachok B, Petrusek M. Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1979;186:419-34.
92. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular beams of macroions. *J Chem Phys* 1968;49:2240-9.
93. Iribarne JV, Thomson BA. On the evaporation of charged ions from small droplets. *J Chem Phys* 1976;64:2287-94.
94. FDA. Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration 2001.
95. Peter K, Lalezari JP, Gambertoglio JG. Quantification of zidovudine and individual zidovudine phosphates in peripheral blood mononuclear cells by a combined isocratic high performance liquid chromatography radioimmunoassay method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 1996 Feb;14(4):491-9.
96. Robbins BL, Rodman J, McDonald C, Srinivas RV, Flynn PM, Fridland A. Enzymatic assay for measurement of zidovudine triphosphate in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1994 Jan;38(1):115-21.
97. Slusher JT, Kuwahara SK, Hamzeh FM, Lewis LD, Kornhauser DM, Lietman PS. Intracellular zidovudine (ZDV) and ZDV phosphates as measured by a validated combined high-pressure liquid chromatography-radioimmunoassay procedure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1992 Nov;36(11):2473-7.
98. Kuster H, Vogt M, Joos B, Nadai V, Luthy R. A method for the quantification of intracellular zidovudine nucleotides. *The Journal of infectious diseases* 1991 Oct;164(4):773-6.
99. Thevanayagam LN, Jayewardene AL, Gambertoglio JG. The stability of intracellular zidovudine and its anabolites in extracts of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2000 Apr;22(3):597-603.

100. Piliero PJ. Pharmacokinetic properties of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (1999) 2004 Sep 1;37 Suppl 1:S2-S12.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Michael Kurowski für die Überlassung des Themas und für die wissenschaftliche Betreuung bedanken. Darüber hinaus danke ich Ihm für seine konspirativen Gespräche, die mich auf den Weg meiner beruflichen Laufbahn gebracht haben. Nicht zu vergessen, seine Ruhe und Gelassenheit in scheinbar ausweglosen Situationen.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Frank Reuss von Heidelberg Pharma für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken, sowie für die freundliche Bereitstellung von Foslovudin Tidoxil und von FLT-TP.

Darüber hinaus bedanke ich mich besonders bei Prof. Dr. Andreas Langner und Angela Munk für die konstruktive Unterstützung während des Zellversuchs, der mir in der Arbeitsgruppe von Prof. Langner ermöglicht wurde. Des Weiteren danke Prof. Dr. Andreas Langner für die Betreuung dieser Arbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Arbeitskolleginnen Steffi Lehmann und Silke Tietz für die allzeit freundliche, seelische und moralische Unterstützung bedanken, die mir in dieser Zeit eine große Hilfe waren.

Mein größter Dank geht dabei an Antonio Checa Gomez für seine hilfreichen Hinweise und Tipps bei der Durchführung der praktischen Tätigkeiten.

Nicht zu letzt möchte ich mich bei meinem langjährigen Partner, all meinen Freunden und meinen Eltern für die vielen Blutspenden bedanken, die diese Arbeit vorangetrieben haben. Nicht zu vergessen ist dabei ihre starke seelische, moralische und aufmunternde Unterstützung in dieser Zeit.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Antje Breske
geboren am 11.11.78 in Greifswald

Schulbildung

September 1985 – August 1991

Erwin-Fischer-Oberschule, Greifswald

September 1991 – August 1997

Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium,
Greifswald
Abschluss: Hochschulreife
Note: 2,2

Studium

Oktober 1997 – April 2003

Ernst-Moritz-Arndt-Universität,
Greifswald
Studium Humanbiologie
Abschluss: Dipl.-Humanbiologin
Note: 1,6

Januar 2004 – Juli 2008

Martin-Luther-Universität, Halle
Promotion bei PD Dr. Dr. M. Kurowski,
Thema: „Zelluläre Pharmakokinetik
von Foslovudin Tidoxil“

Berufserfahrung

seit September 2008

Roche Pharma AG,
Grenzach-Wyhlen
Medical Management
Hepatitis/HIV/CF

August 2003 – August 2008

HIV-LAB PD Dr. Dr. M. Kurowski,
Berlin
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
(Doktorandin)
Arbeitsbereich: Methodenentwicklung
und Validierung für die
High Performance Liquid
Chromatography –
Tandem Mass Spectrometry
(HPLC-MS/MS)
Aufgaben: analytische Messung von
HIV-Medikamentenspiegeln im Serum,
im Rahmen des
Therapeutischen Drug Monitorings,
Drogenscreening, Teilnahme an
internationalen Kongressen,
Erstellen von
Standardarbeitsanweisungen (SOP),
Betreuung von Praktikanten

Publikationsliste

Kurowski M, Walli RK, Breske A, Kruse G, Stocker H, Banik N, Richter H, Mazur D.

Fosamprenavir/ritonavir plus tenofovir does not affect amprenavir pharmacokinetics: no effect of tenofovir

AIDS. 2007 Jun 19;21(10):1368-70.

Stocker H, Herzmann C, Breske A, Kruse G, Berger M, Schulbin H, Hill A, Steinmüller J, Becker M, Arastéh K, Kurowski M.

Saquinavir, nelfinavir and M8 pharmacokinetics following combined saquinavir, ritonavir and nelfinavir administration

J Antimicrob Chemother. 2007 Mar;59(3):560-4. Epub 2007 Jan 25.

Kurowski M, Breske A, Lehmann S, Kruse G, Eskoetter H,

Plasma concentrations of atazanavir in HIV patients treated with regimens including nevirapine

8th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection
November 12-16, Glasgow, UK, 2006

Breske A, Lehmann S, Kruse G, Steinmueller J, Kurowski M

Higher Saquinavir trough levels with Invirase 500 film tablets than with Invirase HGC in patients under therapeutic drug monitoring

7th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy
April 20-22, Lisbon, Portugal, 2006

Stocker H, Kloft C, Plock N, Breske A, Kruse G, Herzmann C, Schulbin H, Kreckel P, Weber C, Goebel F, Roeling J, Staszewski S, Plettenberg A, Moecklinghoff C, Arastéh K, Kurowski M.

Pharmacokinetics of enfuvirtide in patients treated in typical routine clinical settings

Antimicrob Agents Chemother. 2006 Feb;50(2):667-73.

Breske A, Kruse G, Lehmann S, Kurowski M

Nevirapine trough concentrations in HIV-infected patients treated with or without Tenofovir

10th European Aids Conference (EACS)
November 17-20, Dublin, Ireland, 2005

Weber C, Stocker H, Walter H, Sopper S, Breske A, Kruse G, Kurowski M, Arastéh K

VL and CD4+ T-cell count developing during four cycles of continuously alternating therapy in heavily pretreated patients with multidrug resistance

The 3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment

July 24-27, Rio de Janeiro, Brasil, 2005

Stocker H, Breske A, Kruse G, Schulbin H, Kreckel P, Weber C, Goebel F, Roeling J, Staszewski S, Plettenberg A, Moecklinghoff C, Arastéh K, Kurowski M

Concentrations of Enfuvirtide do not Correlate with Concentrations of Concomitant Protease Inhibitors in Human Immunodeficiency Virus Infected Patients

The 3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment

July 24-27, Rio de Janeiro, Brasil, 2005

Stocker H, Kruse G, Weber C, Breske A, Kreckel P, Walter H, Sopper S, Kurowski M, Arastéh K

Intracellular concentrations of 3TC-triphosphate, Carbovir-triphosphate and Tenofovir-diphosphate remain stable throughout 36 weeks of NRTI treatment interrupted by NRTI free treatment periods in patients with multiresistant HIV

The 3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment

July 24-27, Rio de Janeiro, Brasil, 2005

Stocker H, Breske A, Kruse G, Herzmann C, Schulbin H, Kreckel P, Weber C, Goebel F, Roeling J, Staszewski S, Plettenberg A, Moecklinghoff C, Arastéh K, Kurowski M

Validierung einer Methode zur Bestimmung von Serum Enfuvirtide Konzentrationen und Definition von Erwartungswerten im Verlauf des Dosierungsintervalls

10. Deutscher und 16. Österreichischer Aidskongress

June 1-4, Vienna, Austria, 2005

Kurowski M, Molto J, Breske A, Kruse G, Stocker H, Becker M, Hill A, Moecklinghoff C, Clotet B

Atazanavir (ATV) Enhances Trough Concentrations of Nelfinavir (NFV) and its M8 Metabolite in a Treatment Regimen without Ritonavir (RTV)

6th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy

April 28-30, Quebec, Canada, 2005

Kurowski M, Walli R, Breske A, Kruse G, Stocker H, Banik N, Richter H, Mazur D

Coadministration of Tenofovir 300mg QD with Fosamprenavir/Ritonavir 1.400/100mg QD or 1.400/200mg QD Does Not Affect Amprenavir Pharmacokinetics

6th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy

April 28-30, Quebec, Canada, 2005

Kruse G, Königs C, Stumpf S, Stocker H, Breske A, Arastéh K, Kreuz W, Kurowski M

Intracellular NRTI-Triphosphate Levels of 3TC, ddI, d4T, CBV, TDF and FTC in HIV-infected Children

6th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy

April 28-30, Quebec, Canada, 2005

Kruse G, Esser S, Stocker H, Breske A, Koerber A, Kopperman M, Wiehler H, Ross B, Möcklinghoff C, Hill A, Becker M, Kurowski M.

The steady-state pharmacokinetics of nelfinavir in combination with tenofovir in HIV-infected patients

Antivir Ther. 2005;10(2):349-55.

Stocker H, Kruse G, Arastéh K, Breske A, Herzmann C, Izbicki D, Möcklinghoff C, Hill A, Kurowski M

Pharmacokinetic interaction between Saquinavir/r and Nelfinavir in HIV-infected Patients

Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)

October 30-November 2, Washington, DC, USA,2004

Kruse G, Esser S, Stocker H, Breske A, Möcklinghoff C, Hill A, Kurowski M

Tenofovir does not impair the pharmacokinetics of Nelfinavir in HIV-infected patients

Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)

October 30-November 2, Washington, DC, USA,2004

Stocker H, Kruse G, Breske A, Plettenberg A, Möcklinghoff C, Arastéh K, Kurowski M

A new LC-MS/MS method for the quantitative analysis of Enfuvirtide (T-20) in human serum. First PK data from patients treated with T-20 in routine clinical settings

5th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy

April 1-3, Rome, Italy, 2004

Kruse G, Stocker H, Breske A, Arastéh K, Plettenberg A, Staszewski S, Kurowski M

Trough levels of seven different Atazanavir regimens in HIV-infected patients

5th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy

April 1-3, Rome, Italy, 2004

Kruse G, Staszewski S, Cascorbi I, Breske A, Möcklinghoff C, Stocker H, Kurowski M

Mutations in the drug transporter genes MDR1 and MRP2 and pharmacokinetics in patients treated with saquinavir/lopinavir

4th International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy

March 27-29, Cannes, France, 2003

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angaben der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Grenzach-Wyhlen, Februar 2009

Antje Breske