

DIE KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION ALS SCREENINGTECHNIK ZUR BESTIMMUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG VON ARZNEISTOFFEN

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

vorgelegt von
Christoph Albert
aus Schweinfurt

Würzburg 2009

DIE KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION ALS SCREENINGTECHNIK ZUR BESTIMMUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG VON ARZNEISTOFFEN

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

vorgelegt von
Christoph Albert
aus Schweinfurt

Würzburg 2009

Eingereicht am
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter
2. Gutachter
der Dissertation

1. Prüfer
2. Prüfer
3. Prüfer
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....

Für meine Eltern

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

Ich möchte ihr hiermit für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis, das in mich gesetzte Vertrauen und Ihre Unterstützung und Hilfe in jeder Phase der Erstellung dieser Dissertationsarbeit danken.

Herrn Dr. Andreas Heinze möchte ich für die Einführung in die Welt der kontinuierlichen Ultrafiltration und für die ersten Tipps im Umgang mit der Anlage danken. Ach ja, der Hinweis, dass man viele Eigenheiten der Anlage schwer beschreiben sondern „erleben“ muss, hat sich bewahrheitet!

Herrn Prof. Dr. Bringmann und Frau Dr. Tanja Gulder möchte ich für die Bereitstellung der Naphthylisochinoline danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Sonderforschungsbereich 630 der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Sachmitteln.

Herrn Dr. Bernd Reyer möchte für die Entwicklung und Programmierung des neuen Steuergeräts danken. Ein extra Dankeschön für die Hilfe und Unterstützung bei allen weiteren technischen Problemen und natürlich für die permanente

Diskussionsbereitschaft bezüglich der vielen kleinen Softwareprobleme, die natürlich immer dann auftauchten wenn es gerade am wenigsten gepasst hat!!

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Georg Walter und seiner Mannschaft aussprechen! Nicht nur für den Bau der Ultrafiltrationszelle, Rührer etc, sondern auch für eure Ideen, und die spontane, unkomplizierte Art diverse Problemchen zu lösen!

Frau Ebner und Frau Möhler, den beiden guten Geistern des Instituts möchte ich dafür danken, dass sie sich täglich mit unserem ganzen Papierkram rumschlagen und trotzdem täglich soviel gute Laune verbreiten!

Allen ehemaligen und aktuellen Kollegen im 8.Semester möchte ich für die nette und lockere Zusammenarbeit danken.

In diesem Zusammenhang ein ganz ganz besonderer Dank an meinen Ex-Laborkollegen Herrn Dr. Benjamin Waibel, für unzählige tolle Stunden in unserem Labor, für die vielen Stadion-Besuche, mit dir, Michi und Martin und natürlich für dein immer vorhandenes offenes Ohr, das mir so viele Tage gerettet hat... (ich denke du weißt wovon ich rede!?)... DANKE für eine tolle Freundschaft!!

Herrn Andreas Hartung für die vielen kleinen Tipps im Umgang mit Word, und dafür, dass er die Zeit des Schreibens so gut aufgelockert hat!!

Señor Guillermo Montoya, für eine tolle Zeit, die netten Balkonabende und die Erkenntnis, das Wodka-Orange nicht unbedingt farbig sein muss!!

Eva Kugelmann möchte ich für die netten und unterhaltsamen Spieleabende danken, und einer höheren Macht dafür, dass ich kein böser Bube bin!! ;-)

Tim Göbel danke ich für die vielen Diskussionen zum Thema Fußball, die Motivation zur Teilnahme am Residenzlauf und natürlich für diverse witzige Abende.

Jessica Klöckner möchte ich für eine tolle Zeit insbesondere unserem tollen Kurzurlaub in Berlin danken. Auch wenn du dir manchmal schwer tust an dich zu glauben, ich tu´s!!

Meinen Eltern und meinen Schwestern möchte ich für alles danken, was sie für mich in den letzten Jahren (und auch davor) getan haben. Ohne euch hätte ich das alles sicher nie geschafft!!

Der gleiche Dank gebührt allen meinen Freunden! Besonders dir Niko, ich hoffe, das „Alifi“ tatsächlich wahr wird!!

Und zu guter letzt einen herzlichen Dank an meinen Schatz, nicht nur fürs Korrekturlesen der Arbeit, sondern dafür, dass du immer für mich da bist!! Ich freu mich jetzt schon auf alles was noch auf uns beide zukommt!! Du bist mein persönlicher 6er im Lotto!!

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Plasmaproteine | 2 |
| 1.1.1 | Albumin | 3 |
| 1.1.2 | Saures α_1 -Glycoprotein | 7 |
| 1.2 | Pharmakokinetische Grundlage der Proteinbindung | 9 |
| 1.2.1 | Verteilungsvolumen | 9 |
| 1.2.2 | Metabolisierung und Clearance | 11 |
| 1.2.3 | Quantitative Beschreibung der Proteinbindung | 14 |
| 1.3 | Methoden zur Bestimmung der Proteinbindung von Arzneistoffen | 16 |
| 1.3.1 | Mikrodialyse | 16 |
| 1.3.2 | Gleichgewichtsdialyse | 17 |
| 1.3.3 | Ultrafiltration | 18 |
| 1.3.4 | Ultrazentrifugation | 19 |
| 1.3.5 | HPLC | 20 |
| 1.3.6 | Festphasenmikroextraktion (SPME) | 23 |
| 1.3.7 | Kapillarelektrophorese (CE) | 23 |
| 1.3.8 | Fluoreszenzspektroskopie | 25 |
| 1.3.9 | NMR-Spektroskopie | 27 |
| 1.3.10 | Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (SPR) | 27 |
| 1.3.11 | Theoretische Methoden | 27 |
| 2 | ZIEL DER ARBEIT | 29 |
| 3 | KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION | 31 |
| 3.1 | Aufbau der Messanlage | 32 |
| 3.1.1 | Vorratsgefäße | 33 |
| 3.1.2 | 6-Wege-Ventil | 33 |

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.3 | Pumpe..... | 34 |
| 3.1.4 | Injektionsventil | 34 |
| 3.1.5 | Ultrafiltrationszelle..... | 35 |
| 3.1.5.1 | Magnetrührscheibe | 36 |
| 3.1.5.2 | Filterunterstützung | 36 |
| 3.1.5.3 | Ultrafiltrationsmembran | 37 |
| 3.1.6 | UV-Detektor | 37 |
| 3.1.7 | Gegendruckventil | 38 |
| 3.1.8 | Sonstiges | 38 |
| 3.1.8.1 | Magnetrührer | 38 |
| 3.1.8.2 | Verbrauchsmaterialien / Ersatzteile | 38 |
| 3.2 | Steuerung des Messsystems | 40 |
| 3.2.1 | Hardware | 40 |
| 3.2.2 | Software..... | 41 |
| 3.3 | Fehlervermeidung - Wartung und Pflege der Messanlage | 46 |
| 3.3.1 | 6-Wege-Ventil | 46 |
| 3.3.2 | Injektionsventil | 47 |
| 3.3.3 | Ultrafiltrationsmembran | 47 |
| 3.4 | Durchführung der Versuche | 49 |
| 3.4.1 | Verwendete Substanzen und Geräte | 49 |
| 3.4.1.1 | Wirkstoffe | 49 |
| 3.4.1.2 | Albumine | 50 |
| 3.4.1.3 | Geräte | 50 |
| 3.4.2 | Verwendete Lösungen | 51 |
| 3.4.2.1 | Pufferlösung | 51 |
| 3.4.2.2 | Substanzlösungen | 51 |
| 3.4.2.3 | Proteinlösung | 52 |
| 3.4.3 | Versuchsablauf | 52 |

| | | |
|------------|--------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.3.1 | Versuchsteil 1: „Ohne Reaktionskammer“ | 53 |
| 3.4.3.2 | Versuchsteil 2: „Mit Kammer, ohne Membran“ | 54 |
| 3.4.3.3 | Versuchsteil 3: „Mit Kammer, mit Membran“ | 54 |
| 3.4.3.4 | Versuchsteil 4: Proteininjektion | 56 |
| 3.4.3.5 | Versuchsteil 5: „Mit Kammer, mit Protein“ | 58 |
| 3.5 | Auswertung der Versuche | 59 |
| 3.5.1 | Berechnung der Titrationskurven | 59 |
| 3.5.2 | Iterative Berechnung der Bindungskonstanten..... | 60 |
| 3.5.3 | Scatchard-Plot..... | 62 |
| 3.5.4 | Auswertungsprotokoll | 62 |
| 4 | ERGEBNISSE | 63 |
| 4.1 | Proteinbindung der Sartane | 64 |
| 4.1.1 | Allgemeines..... | 64 |
| 4.1.2 | Candesartan..... | 65 |
| 4.1.3 | Eprosartan-Mesyilat | 66 |
| 4.1.4 | Irbesartan | 67 |
| 4.1.5 | Telmisartan..... | 68 |
| 4.1.6 | Valsartan | 69 |
| 4.1.7 | Diskussion | 70 |
| 4.2 | Proteinbindung der Naphthylisochinoline | 73 |
| 4.2.1 | Allgemeines..... | 73 |
| 4.2.2 | Gemessene Substanzen | 75 |
| 4.2.2.1 | GB-AP 89 | 75 |
| 4.2.2.2 | GB-AP 94 | 76 |
| 4.2.2.3 | GB-AP 101 | 77 |
| 4.2.2.4 | GB-AP 104 | 78 |
| 4.2.2.5 | GB-AP 107 | 79 |

| | | |
|------------|-------------------------------------------|------------|
| 4.2.2.6 | GB-AP 110 | 80 |
| 4.2.2.7 | GB-AP 149 | 81 |
| 4.2.2.8 | GB-AP 186 | 82 |
| 4.2.2.9 | GB-AP 187 | 83 |
| 4.2.2.10 | GB-AP 189 | 84 |
| 4.2.2.11 | GB-AP 197 | 85 |
| 4.2.3 | Diskussion..... | 85 |
| 4.3 | Verdrängung aus der Proteinbindung | 91 |
| 4.3.1 | Allgemeines | 91 |
| 4.3.2 | Einzelmessungen..... | 94 |
| 4.3.2.1 | Phenprocoumon | 94 |
| 4.3.2.2 | Phenylbutazon | 95 |
| 4.3.3 | Verdrängungsexperimente..... | 96 |
| 4.3.3.1 | Konkurrenz beider Arzneistoffe (Ansatz 1) | 96 |
| 4.3.3.2 | Verdrängung (Ansatz 2) | 99 |
| 4.3.4 | Diskussion..... | 104 |
| 4.4 | Wasserunlösliche Wirkstoffe | 107 |
| 4.4.1 | Allgemeines | 107 |
| 4.4.2 | Candesartan | 109 |
| 4.4.3 | Ofloxacin | 111 |
| 4.4.4 | Levofloxacin | 113 |
| 4.4.5 | Cinoxacin | 115 |
| 4.4.6 | Ciprofloxacin | 117 |
| 4.4.7 | Aziridine | 119 |
| 4.4.7.1 | 112 C | 119 |
| 4.4.7.2 | 334 C | 120 |
| 4.4.8 | Diskussion..... | 121 |

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.5 | NMR-Diffusions- und Relaxationsexperimente zur Bestimmung der Proteinbindung im Vergleich mit der kontinuierlichen Ultrafiltration | 123 |
| 4.5.1 | Allgemeines | 123 |
| 4.5.2 | Nalidixinsäure | 124 |
| 4.5.3 | Ofloxacin | 125 |
| 4.5.4 | Gatifloxacin..... | 126 |
| 4.5.5 | Diskussion | 127 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 129 |
| 6 | SUMMARY | 133 |
| 7 | ANHANG | 137 |
| 7.1 | Veröffentlichungen | 138 |
| 7.2 | Posterpräsentationen – Abstracta | 138 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 139 |

1 EINLEITUNG

1.1 Plasmaproteine

In den Gefäßen des erwachsenen menschlichen Körpers fließt durchschnittlich 5-6 Liter Blut. Der flüssige, zellfreie Anteil, etwa 55% Prozent der gesamten Blutmenge, wird als Blutplasma bezeichnet. Plasma besteht zu etwa 95% aus Wasser, in dem Plasmaproteine, Salze sowie ungeladene Stoffe wie Glucose, Harnstoff etc. gelöst vorliegen.

Mit 60-80 g/l bilden die Plasmaproteine den mengenmäßig größten Anteil der im Plasma gelösten Substanzen. Sie haben vielfältige Funktionen. Beispielsweise stellen sie ein für den Körper schnell verfügbares Eiweißreservoir dar und sind für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und des Blut-pH-Wertes zuständig. Des Weiteren transportieren Plasmaproteine wasserunlösliche Substanzen, Hormone und Enzyme und sind wichtige Bestandteile des Gerinnungs- bzw. des Immunsystems. Insgesamt kommen im Plasma des Menschen über 100 verschiedene Plasmaproteine vor. Üblicherweise werden diese in Albumine und (α_1 -, α_2 -, β -, γ -) Globuline unterteilt. Eine kurze Übersicht der wichtigsten Vertreter und ihrer Funktionen ist in Tabelle 1 zu sehen.

Kommen Arzneistoffe nach ihrer Resorption in Kontakt mit Plasmaproteinen, können diese den Arzneistoff binden. Da aber nur der im Plasma ungebunden vorliegende Anteil eine Wirkung an Enzymen oder Rezeptoren hervorrufen kann, ist es wichtig zu wissen, wie hoch das Ausmaß der Proteinbindung eines Arzneistoffs ist. Der wichtigste Bindungspartner für Arzneistoffe ist hierbei Serumalbumin, das vorwiegend saure und neutrale Stoffe bindet. In geringerem Maße trägt auch das saure α_1 -Glycoprotein, das primär basische Wirkstoffe bindet, zur Proteinbindung von Arzneistoffen bei.

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter Plasmaproteine und ihrer Funktionen nach^[1]

| Fraktion | Protein | Funktion | Molare Masse [kDa] | Mittlere Konzentration [g/l] |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|
| Albumine | Albumin | Osmotischer Druck, Transport | 67 | 40 |
| | Präalbumin (Transthyretin) | Transport von Thyroxin | 55 | 0.3 |
| α_1 -Globuline | Saures α -Glycoprotein | Transport | 40 | 0.8 |
| | Lipoprotein (HDL) | Transport von Lipiden | 200-400 | 3.5 |
| | Prothrombin | Gerinnungsfaktor | 72 | 0.06-0.1 |
| α_2 -Globuline | Antithrombin III | Hemmung der Blutgerinnung | 58 | 0.3 |
| | Haptoglobin | Bindung von Hämoglobin | 100 | 1 |
| β -Globuline | Lipoprotein (LDL) | Transport von Lipiden | 2000-4500 | 5.5 |
| | Fibrinogen | Gerinnungsfaktor | 340 | 3 |
| | Transferrin | Transport von Eisenionen | 80 | 2-3 |
| γ -Globuline (Immunglobuline) | IgG / IgM | Antikörper | 150 / 935 | 13.5 / 1.5 |
| | IgA | Antikörper | 360-720 | 3 |
| | IgE | Antikörper, Allergie | 196 | 0.00005 |

1.1.1 Albumin

Serumalbumin stellt mit 40 g/l etwa 60% der gesamten Plasmaproteinmenge. Täglich werden 10-15 g Serumalbumin in der menschlichen Leber produziert. Die durchschnittliche Halbwertszeit liegt bei ca. 19 Tagen. Die Aminosäuresequenz von humanem Serumalbumin wurde 1975 erstmals von *Meloun* publiziert.^[2] Durch die Dekodierung der zugrunde liegenden mRNA wurde diese Veröffentlichung 1982 von *Dugaiczky* korrigiert.^[3] Demnach hat humanes Serumalbumin eine molare Masse von 67 kDa und besteht aus 585 Aminosäuren. Über insgesamt 17 Disulfidbrücken bilden sich so drei homologe Domänen (I-III), die ihrerseits jeweils in zwei Subdomänen (A/B) unterteilt werden (s. Abbildung 1)

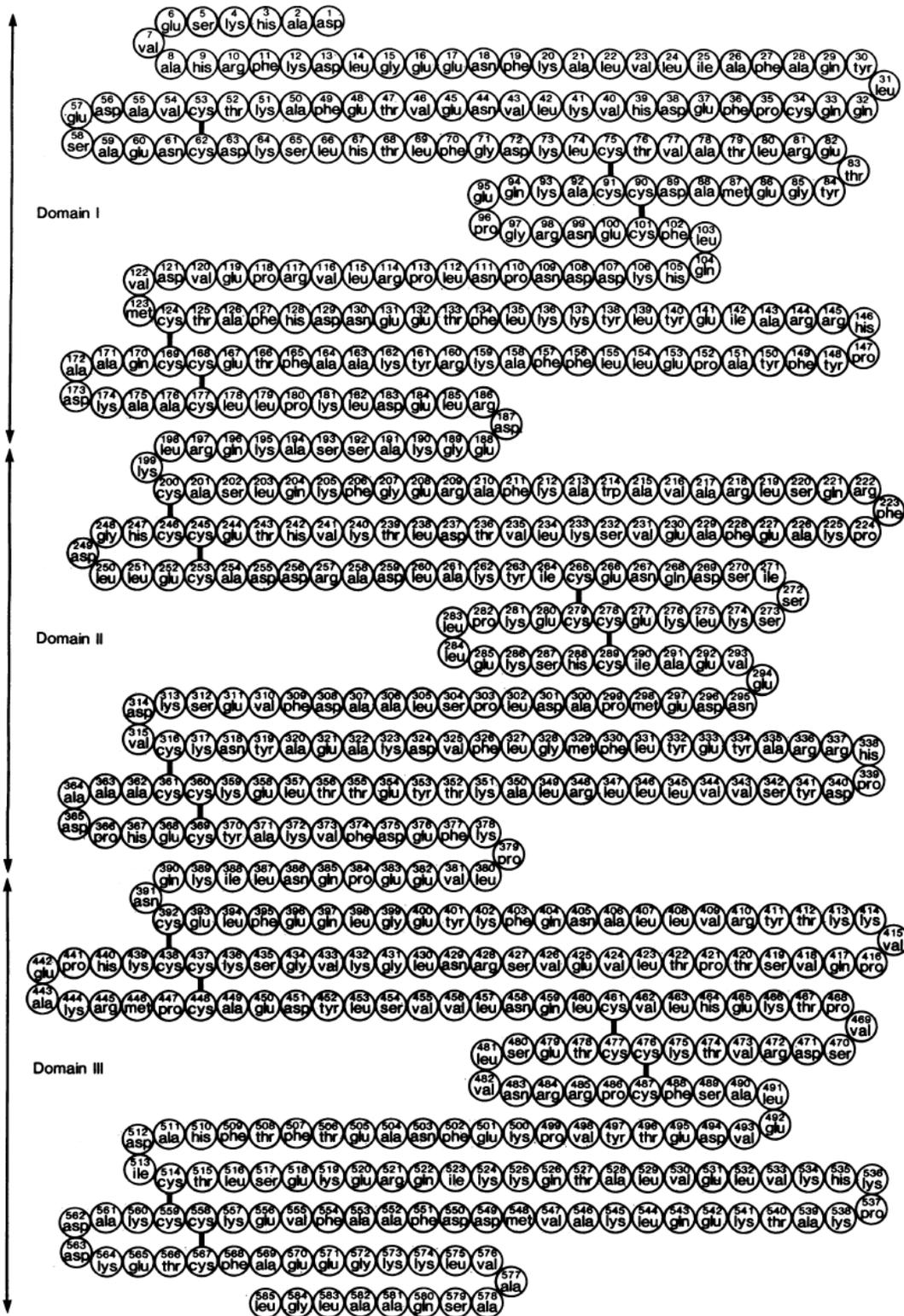


Abbildung 1: Aminosäuresequenz von humanem Serumalbumin, bestehend aus drei homologen Domänen; Wiedergabe nach^[3] mit Genehmigung der PNAS

Der helikale Anteil des Proteins liegt bei etwa 65%. Die annähernd herzförmige Tertiärstruktur wurde 1992 mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt.^[4] Weitere Arbeiten zur dreidimensionalen Struktur des humanen Serumalbumins wurden im Laufe der folgenden Jahre veröffentlicht.^[5,6,7]

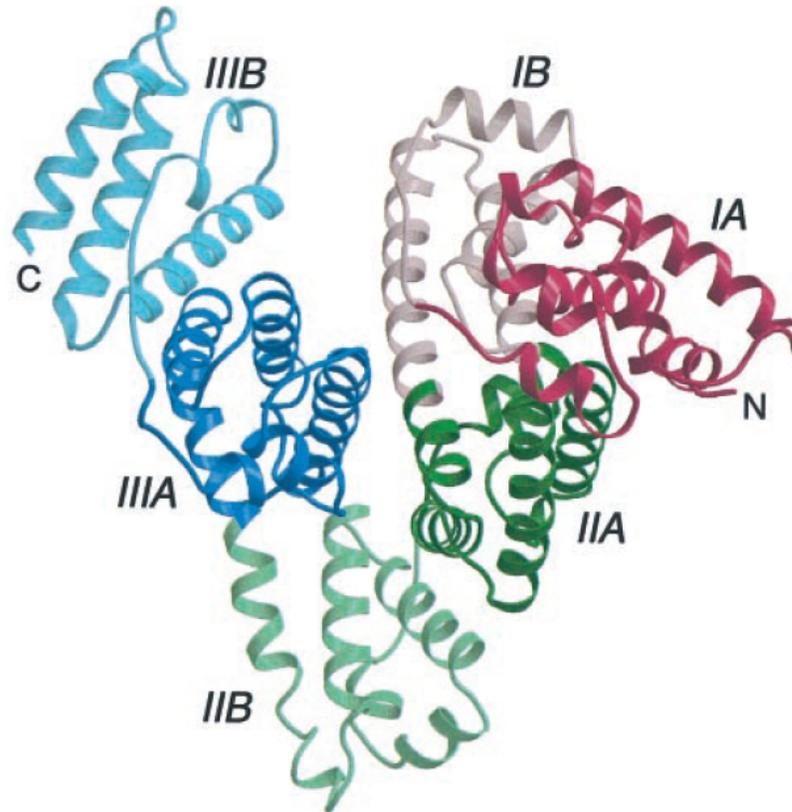


Abbildung 2: Tertiärstruktur von humanem Serumalbumin; I-III = homologe Domänen des Albumins; Wiedergabe nach ^[7] mit Genehmigung der ASBMB Journals

Wie schon erwähnt, sorgt Serumalbumin, neben der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks, für die Bindung und den Transport von unterschiedlichen Liganden. Beispielsweise werden unter physiologischen Bedingungen körpereigene Fettsäuren,^[8,9] Bilirubin^[8,10] und andere endogene Stoffe an Albumin gebunden. Daneben ist die Bindung von Arzneistoffen von hoher Bedeutung. Erste Informationen über die potentiellen Bindungsstellen solcher Liganden lieferten die Arbeiten von *Sudlow*.^[11,12] Die nach ihm benannten Bindungsstellen I und II finden sich in den Subdomänen IIA bzw. IIIA. Wirkstoffe, die spezifisch an diesen Bindungsstellen binden, sind Warfarin, Phenprocoumon

und Phenylbutazon für Bindungsstelle I bzw. Ibuprofen für Bindungsstelle II. Eine dritte Bindungsstelle, für die Digitoxin einen charakteristischen Liganden darstellt, wurde 1979 von *Sjöholm* identifiziert.^[13] In späteren Arbeiten wurde festgestellt, dass sich Bindungsstelle I aus mindestens drei teilweise überlappenden Bindungsregionen zusammensetzt, für die Liganden wie Warfarin, Phenylbutazon, Iodipamid, Warfarin, Phenylbutazon, Azapropazon

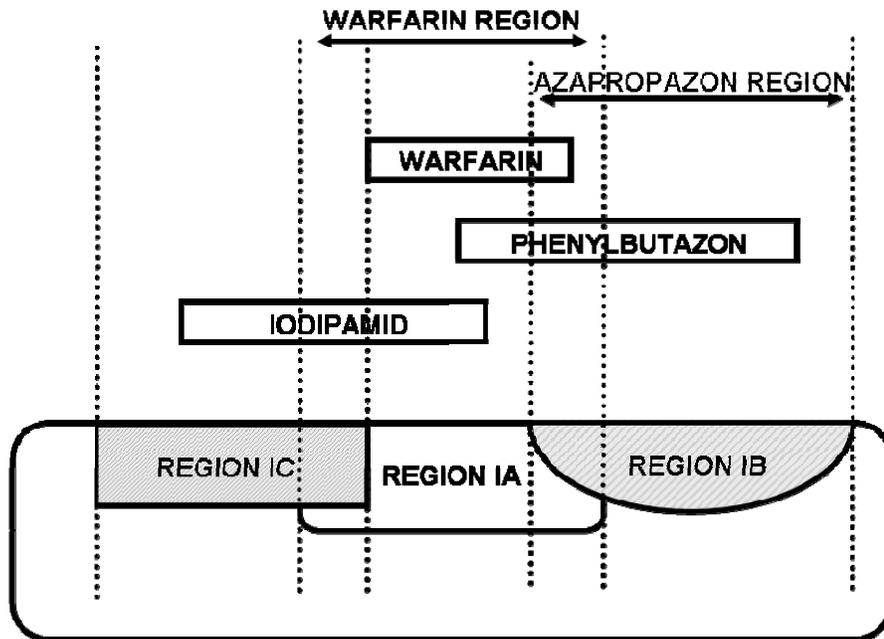


Abbildung 3: unterschiedliche Bindungsbereiche und bekannte Liganden der Bindungsstelle I des humanem Serumalbumin modifiziert nach^[15]

oder Azapropazon unterschiedliche Affinitäten besitzen.^[14,15,16,17] Wie Experimente mit Bilirubin und Diazepam zeigten, kann auch die zweite Bindungsstelle in zwei verschiedene Bindungsbereiche unterteilt werden.^[18] Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass manche Liganden Affinitäten zu mehreren Bindungsstellen aufweisen.^[7,19] Unabhängig davon können auch von der eigentlichen Bindungsstelle entfernte Regionen im Albuminmolekül Einfluss auf das Bindungsverhalten des Stoffes haben.^[20] All diese Arbeiten machen deutlich, wie vielschichtig die Wechselwirkung zwischen Albumin und Arzneistoff sein kann. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsregionen ist es beispielsweise möglich, dass mehrere Arzneistoffe am selben Albuminmolekül binden, ohne sich dabei gegenseitig zu beeinflussen.

Bovines Serumalbumin (BSA) besitzt eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit zu humanem Serumalbumin (HSA). Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, stimmt seine Zusammensetzung zu etwa 80% mit HSA überein und besteht aus 582 Aminosäuren.^[8] Auch die Bindungsstellen für Arzneistoffe befinden sich in den selben Regionen wie beim HSA.^[21] Dies erklärt, warum BSA als kostengünstiger Ersatz zu HSA zur Bestimmung der Proteinbindung von Arzneistoffe verwendet werden kann.

Tabelle 2: Vergleich der Zusammensetzung von bovinem und humanem Serumalbumin nach^[8]

| Aminosäure | Albumin | |
|----------------|---------|-------|
| | bovin | human |
| Asparaginsäure | 41 | 36 |
| Asparagin | 13 | 17 |
| Threonin | 34 | 28 |
| Serin | 28 | 24 |
| Glutaminsäure | 59 | 62 |
| Glutamin | 20 | 20 |
| Prolin | 28 | 24 |
| Glycin | 16 | 12 |
| Alanin | 46 | 62 |
| Valin | 36 | 41 |
| Cystein | 35 | 35 |
| Methionin | 4 | 6 |
| Isoleucin | 14 | 8 |
| Leucin | 61 | 61 |
| Tyrosin | 19 | 18 |
| Phenylalanin | 27 | 31 |
| Lysin | 59 | 59 |
| Histidin | 17 | 16 |
| Tryptophan | 2 | 1 |
| Arginin | 23 | 24 |
| Summe | 582 | 585 |

1.1.2 Saures α_1 -Glycoprotein

Neben Serumalbumin spielt das saure α_1 -Glycoprotein (AGP, Orosomuroid) bei der Proteinbindung von Arzneistoffen eine Rolle. 1950 wurde es erstmals von Schmid beschrieben.^[22] Saures α_1 -Glycoprotein besteht aus 183 Aminosäuren und hat eine molare Masse von etwa 40 kDa. Es wird primär in der Leber gebildet, die

mittlere Plasmakonzentration liegt bei 0,8 g/l.^[23] Als Akute-Phase-Protein kann die Plasmakonzentration des sauren α_1 -Glycoprotein aufgrund von sogenannten Akute-Phase-Reaktionen auf das 2-5fache ansteigen.^[24]

Da zwei verschiedene Gene für das saure α_1 -Glycoprotein kodieren, zeigt der Proteinteil des Moleküls Polymorphismus.^[25] Insgesamt unterscheidet man drei Varianten: Gen 1 (AAG-A) kodiert dabei für die Varianten ORM1 F1 und ORM1 S, die sich daher auch nur geringfügig unterscheiden. Die dritte Variante A wird vom zweiten bekannten Gen (AAG-B/B') kodiert.^[26] Unabhängig von den verschiedenen Varianten zeigt auch der Kohlenhydratanteil eine hohe Variabilität, die beispielsweise von den physiologischen Gegebenheiten abhängig ist.^[24] Aus Plasma isoliertes AGP zeigt dementsprechend keine Homogenität.

Saures α_1 -Glycoprotein bindet im Gegensatz zu HSA primär basische Liganden. Typische Bindungspartner sind beispielsweise Methadon, Propranolol und Lidocain. Dennoch können auch saure Substanzen, wie z. B. Phenobarbital, hohe Affinität zu AGP aufweisen. Das Ausmaß der Bindung eines Wirkstoffes zu saurem α_1 -Glycoprotein kann aufgrund der schwankenden Plasmaspiegel bei pathogenen Zuständen unterschiedlich sein.^[27] Des Weiteren zeigen Liganden häufig unterschiedliche Affinitäten zu den genetischen Varianten des sauren α_1 -Glycoprotein, was aufgrund der schon angesprochenen Inhomogenität der Plasmaproben zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Bestimmung der Proteinbindung führen kann.^[28,29,30] Da die dreidimensionale Struktur von saurem α_1 -Glycoprotein bisher noch unbekannt ist, sind auch die Positionen von potentiellen Bindungsstellen für Liganden nicht vollständig geklärt. Da sich eine Probe von saurem α_1 -Glycoprotein aus den verschiedenen genetischen Varianten zusammensetzt, und diese unterschiedliche Affinitäten zu Liganden zeigen, ist aber grundsätzlich von mehreren Bindungsbereichen auszugehen.

1.2 Pharmakokinetische Grundlage der Proteinbindung

Liegt ein Arzneistoff im Plasma frei vor, kann er aus der Blutbahn durch Biomembranen diffundieren und so am Zielorgan seine Wirkung entfalten. Im Gegensatz dazu ist der an Plasmaproteine gebundene Wirkstoffanteil nicht in der Lage biologische Membranen zu überwinden und ist dementsprechend pharmakologisch inaktiv. Dieser Zusammenhang zwischen Proteinbindung und Wirkung eines Arzneistoffs konnte in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen werden. Vor allem der Einfluss der Plasmaproteine auf die minimale Hemmkonzentration antimikrobiell wirksamer Substanzen war Gegenstand häufiger Untersuchungen.^[31,32,33] Die Plasmaproteinbindung eines Arzneistoffes wirkt sich aber nicht nur auf die Intensität der hervorgerufenen Wirkung aus. Auch pharmakokinetische Parameter wie Verteilungsvolumen, Metabolisierung und Elimination werden vom Ausmaß der Proteinbindung eines Arzneistoffs beeinflusst.^[34]

1.2.1 Verteilungsvolumen

Unter dem Verteilungsvolumen V_d versteht man das Verhältnis aus der gesamten Arzneistoffmenge nach Applikation und der gemessenen Arzneistoffkonzentration C :

$$\text{Verteilungsvolumen } V_d = \frac{\text{Gesamtarzneistoffmenge im Körper}}{\text{Gemessene Arzneistoffkonzentration } C} = \frac{\text{Dosis}}{C}$$

Üblicherweise wird die Konzentration des Arzneistoffs im Plasma gemessen. Wird nun Arzneistoff im extravaskulären Raum gebunden, verringert sich entsprechend die Plasmakonzentration des Arzneistoffs und das Verteilungsvolumen steigt an. Das Verteilungsvolumen ist also ein Maß für die Verteilung eines Arzneistoffs im Körper.

Ausgehend von einer Bestimmung der Wirkstoffmenge im Plasma erhält man die Gesamtmenge an Arzneistoff im Körper ($= c_P \cdot V_d$) als Summe aus der Menge an Arzneistoff im Plasma und an Arzneistoff im Gewebe:

$$c_P \cdot V_d = c_P \cdot V_P + c_T \cdot V_T \quad (1)$$

V_P und V_T entsprechen dem Plasmavolumen und dem Volumen im Gewebe, c_P und c_T sind die Gesamtkonzentrationen des Arzneistoffs im Plasma bzw. im Gewebe. Im Steady-State ist die freie Arzneistoffkonzentration $c_{u(P)}$ im Plasma und Gewebe gleich. Die ungebundenen Anteile des Arzneistoffs im Plasma ($f_{u(P)}$) bzw. im Gewebe ($f_{u(T)}$) ergeben sich zu:

$$\text{Plasma: } f_{u(P)} = \frac{c_{u(P)}}{c_P} \quad (2)$$

$$\text{Gewebe: } f_{u(T)} = \frac{c_{u(P)}}{c_T} \quad (3)$$

Einsetzen von (3) in (2) ergibt dementsprechend:

$$\frac{f_{u(P)}}{f_{u(T)}} = \frac{c_T}{c_P} \quad (4)$$

Setzt man nun Gleichung (4) in Gleichung (1) ein und löst nach dem Verteilungsvolumen V_d auf, erhält man den Zusammenhang zwischen Plasmavolumen V_P , der freien Arzneistoffkonzentration im Plasma $f_{u(P)}$, der freien Arzneistoffkonzentration im Gewebe $f_{u(T)}$ und dem Gewebivolumen V_G :

$$V_d = V_P + \frac{f_{u(P)}}{f_{u(T)}} \cdot V_T \quad (5)$$

Diese Gleichung gilt analog, wenn sich das Verteilungsvolumen auf Blut anstatt Plasma bezieht. Je höher also der freie Anteil eines Arzneistoffs im Plasma bzw. Blut, desto höher das Verteilungsvolumen des Stoffes.

1.2.2 Metabolisierung und Clearance

Auch Metabolisierung und Clearance eines Arzneistoffs werden durch dessen Proteinbindung beeinflusst. So kann der an Plasmaproteine gebundene Arzneistoffanteil weder über die Niere ausgeschieden, noch in der Leber metabolisiert werden.

Die Clearance CL beschreibt die Elimination eines Arzneistoffs aus dem Körper. Sie entspricht dem Volumen einer Körperflüssigkeit, das in einer bestimmten Zeit von einem Wirkstoff befreit wird. Grundsätzlich ist es möglich zu jedem Ausscheidungsorgan (z.B. Leber, Niere) die entsprechende Clearance ($CL_{\text{hepatisch}}$, CL_{renal}) zu bestimmen. Die Gesamtkörperclearance ergibt sich dann aus der Summe der Organclearances.

Die Durchblutungsgeschwindigkeit Q eines Organs steht im Zusammenhang mit der Clearance. Denn je höher der Blutfluss ist, desto schneller bzw. mehr Arzneistoff kann im Organ eliminiert werden:

$$CL = Q \cdot \varepsilon \quad (1)$$

ε entspricht hierbei dem Extraktionskoeffizienten des jeweiligen Arzneistoffs, der wie folgt definiert ist:

$$\varepsilon = \frac{c_i - c_a}{c_i} \quad (2)$$

c_i ist die Arzneistoffkonzentration, die in das Organ eintritt, c_a die Konzentration, die es wieder verlässt. Der Extraktionskoeffizient ε nimmt dementsprechend immer einen Wert zwischen 0 und 1 an. Ist $\varepsilon = 0$, bedeutet dies, dass der Wirkstoff nicht eliminiert wird, $\varepsilon = 1$ entspricht einer vollständigen Elimination durch das entsprechende Ausscheidungsorgan. Der Extraktionskoeffizient wiederum ist von der Durchblutungsgeschwindigkeit Q des entsprechenden Eliminationsorgans, der Proteinbindung des Arzneistoffes und der intrinsischen Clearance CL_{int} abhängig. Als intrinsische Clearance CL_{int} bezeichnet man die maximale Eliminationsleistung des Organs bei unlimitierter Arzneistoffzufuhr. Die Proteinbindung kann als ungebundene Fraktion f_u des Arzneistoffs ausgedrückt werden. Sie spielt deshalb

eine Rolle für die Clearance, da nur der freie Arzneistoffanteil eliminiert und metabolisiert werden kann.

Bezogen auf die Leber als Eliminationsorgan können diese Zusammenhänge durch die Wilkinson-Shand-Gleichung beschrieben werden:

$$CL_{hep} = Q_{hep} \cdot \varepsilon_{hep} = \frac{Q_{hep} \cdot f_u \cdot CL_{int}}{Q_{hep} + f_u \cdot CL_{int}} \quad (3)$$

CL_{hep} und Q_{hep} entsprechen hierbei der hepatischen Clearance bzw. der Durchblutungsgeschwindigkeit der Leber.

Basierend auf Gleichung 3 kann man zwei Extremfälle unterscheiden:

1. „Low-extraction drugs“

Arzneistoffe, die nur geringem Metabolismus unterliegen, haben eine geringe intrinsische Clearance CL_{int} . Daher gilt:

$$Q_{hep} \gg f_u \cdot CL_{int} \quad \Rightarrow \quad Q_{hep} \approx Q_{hep} + f_u \cdot CL_{int}$$

Demzufolge entspricht die Clearance: $CL_{hep} \approx f_u \cdot CL_{int}$ (4)

Von „low-extraction Drugs“ spricht man, wenn die Konzentration des Arzneistoffs bei der Leberpassage lediglich um weniger als 20 % sinkt. Der Extraktionskoeffizient solcher Substanzen ist also kleiner 0.2. Gleichung 4 zeigt, dass die hepatische Clearance der „low-extraction drugs“ in erster Linie von der intrinsischen Clearance der Leber und dem Ausmaß der Proteinbindung abhängt. Würde sich die freie Plasmakonzentration eines Arzneistoffes durch eine erniedrigte Proteinbindung erhöhen, hätte dies eine ansteigende Clearance zur Folge. Durch die gesteigerte Elimination sinkt der Gesamtplasmaspiegel des Arzneistoffs, die Konzentration des ungebundenen Anteils bleibt aber letztendlich gleich.

Beispiele für „low-extraction drugs“ sind Warfarin, Phenytoin oder Tolbutamid.

2. „High-extraction drugs“

Arzneistoffe, die stark metabolisiert werden, haben eine hohe intrinsische Clearance. Für solche Stoffe gilt:

$$Q_{hep} \ll f_u \cdot CL_{int} \quad \Rightarrow \quad Q_{hep} + f_u \cdot CL_{int} \approx f_u \cdot CL_{int}$$

Folglich reduziert sich Gleichung 3 zu: $CL_{hep} \approx Q_u$ (5)

Als „high-extraction drugs“ werden Stoffe bezeichnet, deren Konzentration nach der Passage der Leber um mehr als 80 % verringert ist. Ihr Extraktionskoeffizient ϵ ist dementsprechend > 0.8 . Gleichung 5 veranschaulicht, dass ihre hepatische Clearance primär von der Durchblutungsgeschwindigkeit der Leber abhängig ist. Eine Änderung der freien Plasmakonzentration durch Veränderung der Proteinbindung hat dementsprechend keine Auswirkungen auf die Clearance des Arzneistoffes. Allerdings liegen hier bei gleichbleibendem Plasmaspiegel unterschiedliche Mengen an freiem Arzneistoff vor. Ein Drug-Level-Monitoring solcher Wirkstoffe sollte dementsprechend besser auf die Konzentration des frei vorliegenden Arzneistoffes abzielen.

Propranolol, Lidocain oder Pethidin zählen zu den klassischen „high-extraction drugs“.

Tabelle 3: Veränderung der pharmakokinetischen Parameter bei ansteigender freier Arzneistoffkonzentration im Blut^[34]; \uparrow = zunehmend, \downarrow = abnehmend, --- = unverändert

| pharmakokinetischer Parameter | "high-extraction drug" | "low-extraction drug" |
|-------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Verteilungsvolumen | \uparrow | \uparrow |
| Clearance | --- | \uparrow |
| Halbwertszeit | \uparrow | \downarrow |
| Gesamtplasmaspiegel | --- | \downarrow |
| Plasmaspiegel des freien Wirkstoffanteils | \uparrow | --- |

Das Ausmaß der Proteinbindung eines Arzneistoffs beeinflusst also nicht nur die Intensität der pharmakologischen Wirkung, sie hat auch Auswirkungen auf pharmakokinetische Parameter, wie Verteilung, Metabolismus und Elimination. Sinkt die Proteinbindung eines Wirkstoffes, beispielsweise durch eine Interaktion mit einem zweiten Arzneistoff (s. 4.3), führt dies zur Erhöhung des freien Anteils

des Arzneistoffs im Plasma. Wie beschrieben wurde, hat dies aber nicht zwingend eine überschießende Wirkung zur Folge, da ein Anstieg der freien Plasmakonzentration häufig durch zunehmende Elimination ausgeglichen wird („low-extraction drugs“). Klinisch bedenkliche Effekte sind nur bei Veränderungen der Proteinbindung von „high-extraction drugs“ zu erwarten, die intravenös appliziert werden und zusätzlich noch eine geringe therapeutische Breite aufweisen.^[35,36]

1.2.3 Quantitative Beschreibung der Proteinbindung

Bindet ein Arzneistoff (A) an ein Protein (P), kann das Ausmaß der Proteinbindung durch die Assoziationsgleichgewichtskonstante k_a ausgedrückt werden:

$$k_a = \frac{[AP]}{[A] \cdot [P]} \quad (1)$$

Die Konzentration des gebundenen Arzneistoffs (AP) entspricht daher:

$$[AP] = K_a \cdot [A] \cdot [P] \quad (2)$$

Wird davon ausgegangen, dass pro Proteinmolekül nur eine Bindungsstelle existiert, erhält man die Menge an Arzneistoff pro Proteinmolekül (r) aus dem Quotienten von gebundener Arzneistoffkonzentration und Gesamtprotein-konzentration:

$$r = \frac{[AP]}{[P]_{gesamt}} = \frac{[AP]}{[AP] + [P]} \quad (3)$$

Durch Umformung erhält man:

$$r = \frac{k_a \cdot [A] \cdot [P]}{k_a \cdot [A] \cdot [P] + [P]} = \frac{k_a \cdot [A]}{k_a \cdot [A] + 1} \quad (4)$$

Liegen mehrere (n) äquivalente Bindungsstellen vor, ergibt sich r zu:

$$r = \frac{n \cdot k_a \cdot [A]}{k_a \cdot [A] + 1} \quad (5)$$

Ist r aus experimentellen Daten ermittelt worden, können die Assoziationsgleichgewichtskonstante k_a und die Anzahl der Bindungsstellen n graphisch bestimmt werden. Dazu wird Gleichung 5 zu einer Geradengleichung umgeformt:

$$\frac{r}{[A]} = n \cdot k_a - r \cdot k_a \quad (6)$$

Diese Art der graphischen Darstellung wird als Scatchard-Plot^[37] bezeichnet (s. Abbildung 4). Die Steigung der Geraden ($-k_a$) entspricht der Gleichgewichtskonstanten. Aus dem y-Achsenabschnitt ($n \cdot k_a$) kann man die Anzahl der Bindungsstellen ermitteln. Sind mehrere Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität vorhanden, ergibt der Scatchard-Plot keine Gerade, sondern eine Kurve. Durch Extrapolation der linearen Teile der Kurve können aber auch hier Informationen über die Assoziationskonstanten gewonnen werden.

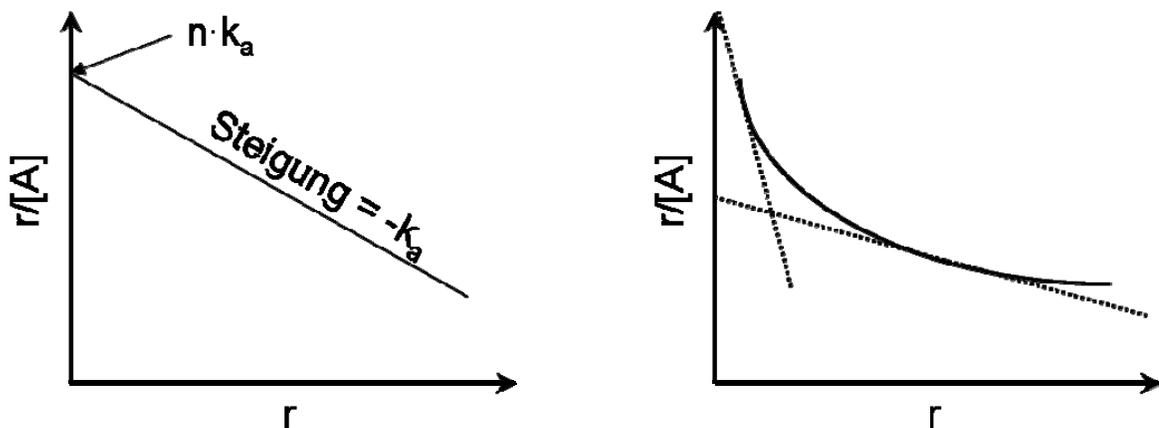


Abbildung 4: Beispiel der graphischen Darstellung eines Scatchard-Plots bei einer (links) bzw. mehreren Bindungsstellen (rechts)

1.3 Methoden zur Bestimmung der Proteinbindung von Arzneistoffen

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung eines Arzneistoffes stehen zahlreiche analytische Methoden zur Verfügung.^[38,39] In den folgenden Abschnitten werden die unterschiedlichen Möglichkeiten zur Bestimmung der Proteinbindung bzw. der entsprechenden Bindungskonstanten vorgestellt und ein Überblick über einige Arbeiten der letzten Jahre gegeben.

1.3.1 Mikrodialyse

Die Mikrodialyse ist die einzige Methode zur Bestimmung der Proteinbindung, die *in vivo* durchgeführt werden kann. Dazu wird eine Sonde in die Blutbahn eingeführt. An der Spitze der Sonde sitzt eine semipermeable Dialysemembran, über die nur der ungebundene Arzneistoff ins Innere der Kapillare diffundieren kann. Während des Dialysevorgangs wird die Sonde mit Ringerlösung gespült. Das Dialysat wird im Anschluss auf den Gehalt an Arzneistoff analysiert. Da sich während der Dialyse kein Gleichgewicht zwischen der Konzentration innerhalb und außerhalb einstellt, wird die im Dialysat gemessene Konzentration immer niedriger sein als die Konzentration in der Blutbahn. Um korrekte Ergebnisse zu erhalten, muss die sogenannte relative Wiederfindungsrate bestimmt werden. Zusätzlich muss zur Bestimmung der Menge an gebundenem Arzneistoff der Gesamtplasmaspiegel des Arzneistoffs bestimmt werden, da die Mikrodialyse nur Aufschluss über die Konzentration an freiem Arzneistoff liefert.

Mit der Mikrodialyse lässt sich die Konzentration von freiem Arzneistoff nicht nur in der Blutbahn, sondern auch in Organen und Geweben ermitteln.^[40,41,42] Trotz des Vorteils der möglichen *In-vivo*-Messung ist die Mikrodialyse eine relativ aufwändige Methode, weswegen sie selten zur Bestimmung von Proteinbindungen verwendet wird.^[43] Die *In-vitro*-Variante der Mikrodialyse findet dagegen häufigere Anwendung.^[44,45,46]

1.3.2 Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyse ist die Standardmethode zur Bestimmung der Proteinbindung eines Arzneistoffes. Dementsprechend viele Untersuchungen wurden in den letzten Jahren mit dieser Methode durchgeführt.^[47,48,49,50,51]

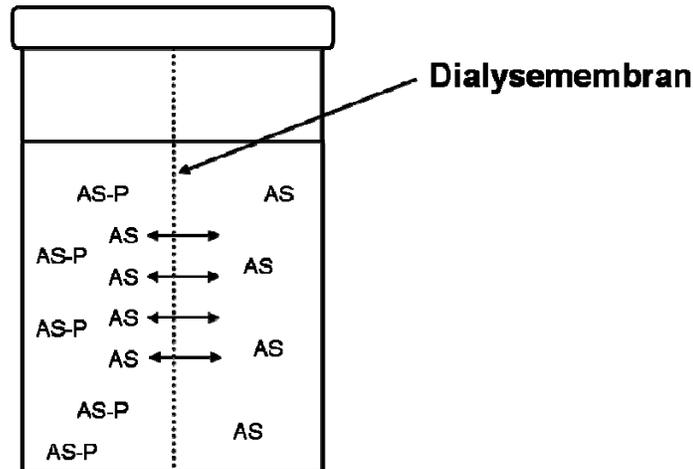


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Dialysekammer; AS=Arzneistoff, AS-P= proteingebundener Arzneistoff

Zur Bestimmung der Proteinbindung wird eine Dialysekammer verwendet, die durch eine semipermeable Membran in zwei Hälften aufgeteilt ist (s. Abbildung 5). Die Gleichgewichtsdialyse ist das wohl am häufigsten verwendete Verfahren zur Bestimmung der Proteinbindung von Arzneistoffen. Auf der einen Seite der Membran befindet sich üblicherweise Plasma, in dem der zu untersuchende Arzneistoff gelöst ist. Die zweite Seite enthält isotonen Puffer oder proteinfreies Plasmawasser. Der freie Arzneistoff ist in der Lage, die Membran zu passieren, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen beiden Seiten einstellen kann. Die Dialysekammer sollte temperiert werden, um die physiologischen Bedingungen während der Gleichgewichtseinstellung zu imitieren. Ist der Gleichgewichtszustand erreicht, werden die Konzentrationen der jeweiligen Reservoirs bestimmt. Die Konzentration im proteinfreien Teil der Kammer entspricht der Konzentration an freiem ungebundenem Arzneistoff. Die Gehaltsbestimmung nach der eigentlichen Gleichgewichtsdialyse erfolgt in den meisten Fällen mittels HPLC.

Ein Nachteil der Methode ist, dass sich die Gesamtplasmakonzentration des Wirkstoffs durch die Diffusion in die andere Hälfte der Kammer erniedrigt. Dies sollte vor allem bei Stoffen beachtet werden, die eine stark konzentrationsabhängige Bindung zum Protein aufweisen. Des Weiteren kann die Adsorption an die Oberflächen der Dialysekammer, vor allem bei stark lipophilen Stoffen, zu Problemen führen.^[38]

Aufgrund der teilweise langen Dauer (bis zu 24 Std.) bis zur Einstellung des Gleichgewichts stellt die Gleichgewichtsdialyse eine relativ zeitaufwändige Methode dar. Dementsprechend wurden in den letzten Jahren verschiedene Ansätze entwickelt, um einen höheren Probendurchsatz zu erreichen. So wurden beispielsweise mehrere Wirkstoffproben vereint und gleichzeitig bestimmt.^[52] Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Effizienz ist die Verwendung sogenannter RED-Platten („rapid equilibrium dialysis“), die bis zu 48 kleine, austauschbare Dialysekammern enthalten.^[53] Ebenfalls von Nachteil ist, dass sich der pH-Wert in der Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung verändern kann, was zu verfälschten Ergebnissen führen kann.^[54]

In einer neuen, modifizierten Variante der Gleichgewichtsdialyse wird anstatt der Dialysemembran eine schlauchförmige, mit Puffer gefüllte Membran („hollow-fibre membrane“) verwendet.^[55,56,57]

1.3.3 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ist die neben der Gleichgewichtsdialyse am häufigsten angewendete Methode zur Bestimmung der Proteinbindung von Arzneistoffen. Man unterscheidet dabei die klassische diskontinuierliche und die in dieser Arbeit verwendete kontinuierliche Ultrafiltration.

Bei der diskontinuierlichen Ultrafiltration wird eine Plasmaprobe mit Arzneistoff inkubiert und anschließend in eine Ultrafiltrationskartusche gegeben. Die Ultrafiltrationseinheit enthält eine Membran, die nur die niedermolekularen Plasmakomponenten wie Arzneistoffe passieren können. Dementsprechend wird

an Protein gebundener Arzneistoff von der Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten, während sich der freie Anteil des Arzneistoffs im Filtrat befindet. Um eine schnelle und vollständige Filtration zu erreichen, werden die Ultrafiltrationseinheiten nach der Inkubation meist zentrifugiert. Zur Imitation der physiologischen Bedingungen werden die Proben während der Inkubation bzw. Filtration temperiert. Die Analyse des Filtrats erfolgt wie bei der Gleichgewichtsanalyse in der Regel mittels HPLC. Mittels Ultrafiltration wurden in den vergangenen Jahren die Proteinbindungen von zahlreichen alten und neuen Arzneistoffen bestimmt.^[58,59,60,61,62,63] Des Weiteren wurden die Bindungseigenschaften von Enantiomeren^[64,65] und unterschiedlicher Albumin-Chargen^[66] mittels Ultrafiltration überprüft oder die Ultrafiltration als Referenzmethode mit anderen Methoden zur Proteinbindungsbestimmung verglichen.^[67,68]

1.3.4 Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation basiert auf den Unterschieden im Sedimentationsverhalten von Protein bzw. Protein-Arzneistoff-Komplex und freiem Arzneistoff. Ähnlich der Ultrafiltration werden die zu untersuchenden Arzneistoffe zunächst mit Protein inkubiert. Nach Einstellung des Gleichgewichts erfolgt die Trennung von gebundenem und freiem Arzneistoff. Da das Protein bzw. der Arzneistoff-Protein-Komplex natürlich wesentlich größer und schwerer ist als die freien Arzneistoffmoleküle, findet sich der gebundene Anteil im Sediment wieder. Der Überstand, der den freien Arzneistoff enthält, wird im Anschluss quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgt auch hier meist per HPLC.

Die Ultrazentrifugation als eigenständige Methode zur Bestimmung der Proteinbindung wird heutzutage selten verwendet.^[69,70] Allerdings ist die Zentrifugation häufig Bestandteil der Ultrafiltration (s.1.3.3).

1.3.5 HPLC

Die HPLC wird nicht nur zur Quantifizierung der freien Arzneistoffmenge nach vorangegangener Gleichgewichtsdialyse oder Ultrafiltration verwendet, sie kann auch direkt zur Bestimmung der Proteinbindung von Arzneistoffen angewendet werden. Dazu stehen verschiedene Varianten zur Verfügung, die „frontal analysis“, die „vacancy-peak“- und die Hummel-Dreyer-Methode, sowie die Affinitätschromatographie (HPAC).

Affinitätschromatographie (HPAC)

Bei der HPAC werden Säulen verwendet, die immobilisierte Proteine wie HSA enthalten. Je höher die Proteinbindung eines Wirkstoffes bzw. seine Affinität zum in der Säule befindlichen Protein ist, desto höher ist auch die Retentionszeit des Arzneistoffes. Es wird hier eine Arzneistoffprobe definierter Konzentration auf die Säule gegeben und deren Retentionszeit mit Hilfe von Retentionszeiten unterschiedlicher Standardsubstanzen ausgewertet.^[67,68,71,72,73]

Frontalanalyse

Eine Variante der zuvor beschriebenen HPAC ist die Frontalanalyse („frontal-analysis“). Auch hier werden Säulen verwendet, die immobilisiertes Serumalbumin enthalten. Allerdings wird hier nicht nur eine Arzneistoffprobe fester Konzentration auf die Säule gegeben, sondern die Säule kontinuierlich mit Arzneistofflösung beladen, so dass die Bindungsstellen des Serumalbumins gesättigt werden. Mit den erhaltenen Chromatogrammen lassen sich im Anschluss die Proteinbindung bzw. die Bindungskonstanten berechnen.^[74,75,76]

In einer zweiten, in der HPLC seltener verwendeten Version der „frontal-analysis“ kommen normale HPLC-Säulen zum Einsatz. Diese Methode wird allerdings häufiger in der Kapillarelektrophorese angewendet (s. 1.3.7).

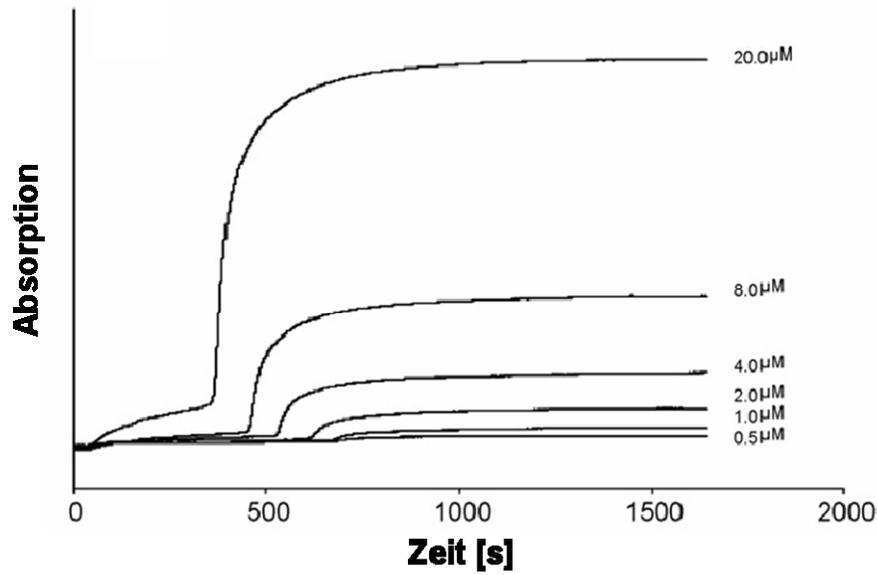


Abbildung 6: Chromatogramm verschiedener Konzentration von (S)-Verapamil nach HPLC-frontal analysis mit HSA funktionalisierter Silica-Säule nach^[76]

Hummel-Dreyer-Methode

Im Gegensatz zu den beiden genannten Möglichkeiten, die Proteinbindung eines Arzneistoffes mittels HPLC zu bestimmen, basiert die 1962 entwickelte Hummel-Dreyer-Methode auf den Prinzipien der Größenausschlusschromatographie.^[77]

Die zur Trennung verwendeten Säulen sind mit einem Gel gefüllt und werden mit einer Arzneistofflösung gespült, so dass eine konstante Arzneistoffmenge detektiert wird. Im Anschluss wird eine definierte Menge Albumin, die in der Arzneistofflösung gelöst ist, injiziert. Bindet der Arzneistoff an das Protein, zeigt das Chromatogramm einen Basislinienabfall. Die Absorption am Minimum entspricht dem Anteil an freiem Arzneistoff (s. Abbildung 7).^[78,79,80,81]

Die Hummel-Dreyer-Methode findet mittlerweile auch in der Kapillarelektrophorese Verwendung (s. 1.3.7).

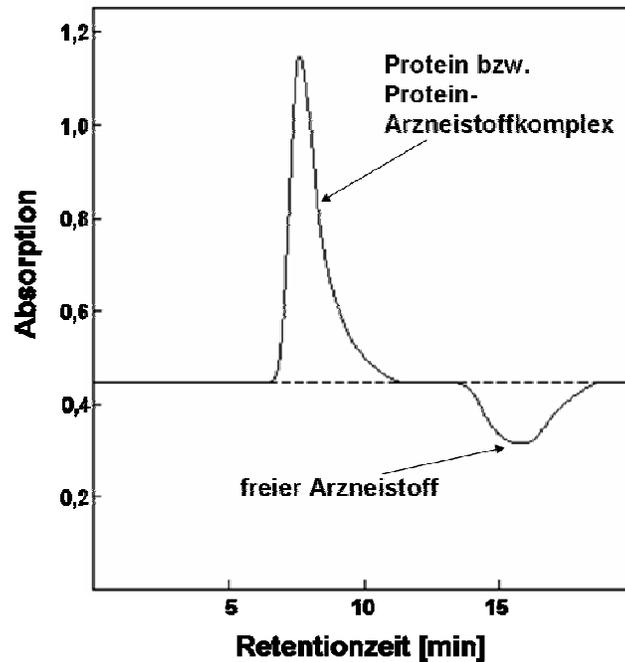


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Chromatogramms der Hummel-Dreyer Methode

„Vacancy-Peak“-Methode

Die 1979 entwickelte „vacancy-peak“-Methode ist eine Abwandlung der zuvor beschriebenen Hummel-Dreyer-Methode.^[82] Dementsprechend werden hier auch Säulen verwendet, die beispielsweise mit einem Gel befüllt sind. Im Gegensatz zur Hummel-Dreyer-Methode wird eine Pufferlösung als mobile Phase verwendet, die sowohl Arzneistoff, als auch Protein enthält. Injiziert wird nur eine geringe Menge des reinen Fließmittelpuffers, so dass eine Zone ohne Wirkstoff bzw. Protein erhalten wird. Während der Elution diffundieren nun der Arzneistoff-Protein-Komplex sowie der freie Arzneistoff in diese Zone und man erhält in den entsprechenden Bereichen zwei negative Peaks, die zur Auswertung verwendet werden.

Im Vergleich zu den konventionellen Methoden (Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltration) zur Bestimmung der Proteinbindung von Arzneistoffen hat die HPLC

mehrere Vorteile. Je nach Bestimmungsmethode werden vergleichsweise geringe Substanzmengen benötigt, der Zeitaufwand ist relativ gering, die Reproduzierbarkeit und die Präzision dagegen hoch. Des Weiteren bietet sich die Möglichkeit das Bindungsverhalten von Enantiomeren zu beobachten. Vor allem die Affinitätschromatographie und die an sie angelehnte Variante der „frontal-analysis“ finden dementsprechend immer häufigere Anwendung.

1.3.6 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Bei der Mikroextraktion wird der freie Arzneistoff aus einer Arzneistoff-Plasma-Lösung an eine feste Phase adsorbiert und somit extrahiert. Die Quantifizierung erfolgt anschließend beispielsweise mittels HPLC. So wurden die Proteinbindungen von Ibuprofen, Warfarin, Verapamil, Propranolol und Coffein^[83], sowie von Diazepam^[84] und Lidocain^[85] bestimmt.

1.3.7 Kapillarelektrophorese (CE)

Zur Bestimmung der Proteinbindung von Arzneistoffen kann auch die Kapillarelektrophorese verwendet werden. Die zur Verfügung stehenden Methoden, die „vacancy-peak“-, die Hummel-Dreyer-Methode und die „frontal-analysis“ wurden 1992 von *Kraak et al.* von der HPLC auf die Kapillarelektrophorese übertragen.^[86] Die zugrunde liegenden Vorgehensweisen wurden bereits in Abschnitt 1.3.5 beschrieben, allerdings erfolgt die Trennung hier natürlich aufgrund der elektrophoretischen Mobilität. Die „frontal-analysis“ wird in der HPLC vorwiegend in der affinitätschromatographischen Variante angewendet. Die Trennung mittels „frontal-analysis“ an normalen HPLC-Phasen spielt dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Dagegen ist sie in der Kapillarelektrophorese die am häufigsten verwendete Methode zur Bestimmung von Proteinbindungen und soll daher im Folgenden kurz erläutert werden.^[87,88,89,90,91,92,93]

In der „frontal-analysis“ wird die Kapillare mit Puffer gefüllt und anschließend eine große Probenmenge, die neben dem Puffer sowohl Arzneistoff, als auch Protein enthält, injiziert. Da die elektrophoretische Mobilität des Proteins wesentlich höher ist als die des Arzneistoffs, kommt es zur Auftrennung des Gemischs (s. Abbildung 8).

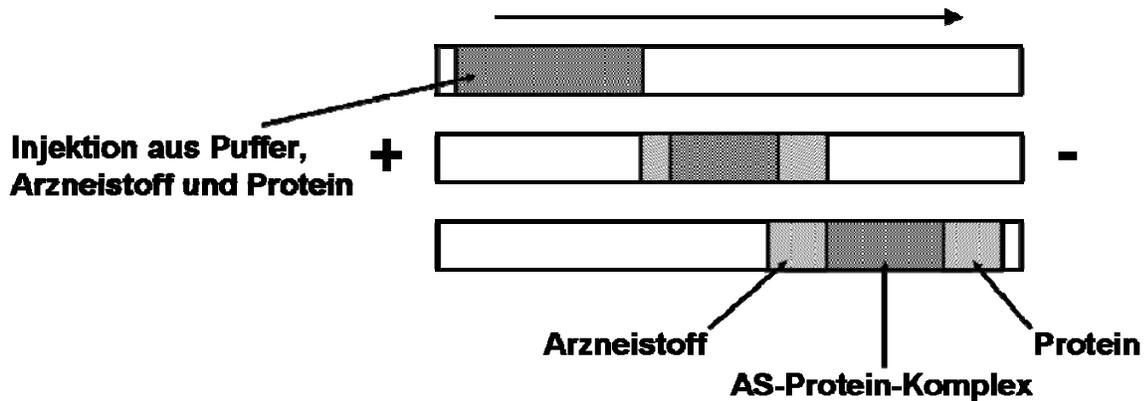


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Proteinbindungsbestimmung mittels kapillarelektrophoretischer „frontal-analysis“

Das entsprechende Elektropherogramm (s. Abbildung 9) enthält charakteristische Plateaus für Protein, Protein-Arzneistoff-Komplex und freien Arzneistoff, aus denen die Proteinbindung ermittelt werden kann.

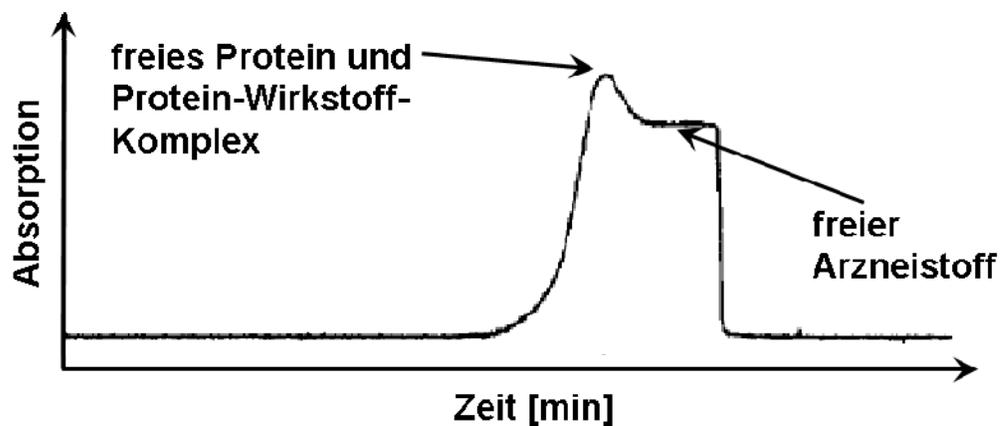


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Elektropherogramms einer kapillarelektrophoretischen „frontal-analysis“

Analog zur HPLC gilt auch für die Kapillarelektrophorese, dass sie eine relativ schnelle, präzise und gut reproduzierbare Methode darstellt. Wie schon erwähnt wird die „frontal-analysis“ am häufigsten verwendet. Arbeiten mit anderen kapillarelektrophoretischen Methoden waren in den vergangenen Jahren die Ausnahme.^[94,95,96,97]

1.3.8 Fluoreszenzspektroskopie

Eine immer häufiger verwendete Methode zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Arzneistoffen und Proteinen ist die Fluoreszenzspektroskopie.

Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin fluoreszieren bei Anregung durch UV-Licht. Dementsprechend kann bei Proteinen und Peptiden, die diese Aminosäuren enthalten, Fluoreszenz beobachtet werden. Bei humanem Serumalbumin ist die Fluoreszenz primär auf den einzelnen vorhandenen Tryptophan-Rest (s. Tabelle 2, 1.1.1) zurückzuführen, da die Intensität der Fluoreszenz der Phenylalanin bzw. Tyrosin-Reste zu gering ist.^[98]

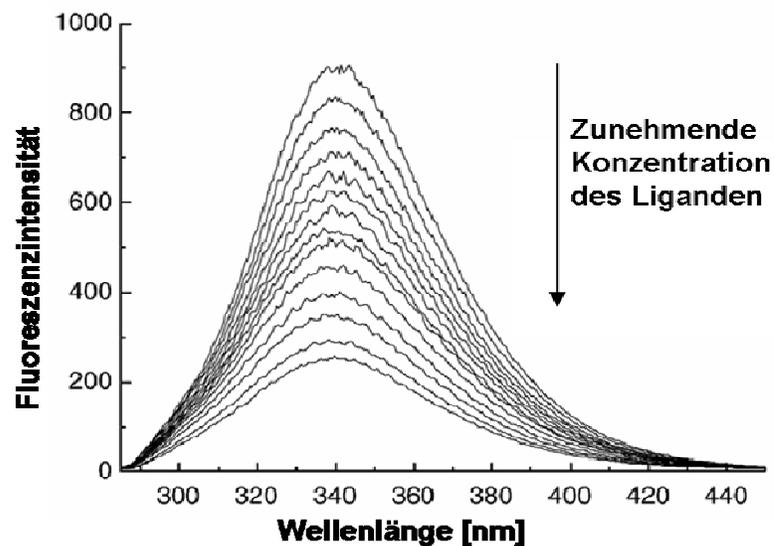


Abbildung 10: Fluoreszenzemissionsspektren von HSA in Gegenwart ansteigender Konzentrationen von Loratadin (Anregungswellenlänge 280nm)^[99]

Bindet nun ein Ligand an das Fluorophor, führt dies zur Abnahme der Intensität der Fluoreszenz, man bezeichnet diesen Vorgang als Quenching (s. Abbildung 10). Im Allgemeinen unterscheidet man zwei Arten des Quenching: dynamisches und statisches Quenching. Beim dynamischen Quenching wird die Energie des angeregten Fluorophores durch einen Zusammenstoß mit einem Liganden vom Fluorophor auf den Liganden übertragen. Beim statischen Quenching bildet der Ligand mit dem Fluorophor einen Komplex, dessen Fluoreszenz geringer ist. Aus den erhaltenen Daten lassen sich dann die Bindungskonstanten berechnen.

Da der Tryptophanrest 214 in der Domäne IIA der Bindungsstelle I sitzt, besitzt Serumalbumin ideale Voraussetzungen um eventuelle Arzneistoff-Protein-Interaktionen mittels Fluoreszenzspektroskopie zu untersuchen. BSA eignet sich ebenfalls, da es zwei Tryptophanreste besitzt. Tryptophan-212 befindet sich ebenfalls in der hydrophoben Region der Bindungsstelle I, der zweite Rest ist dagegen auf der Moleküloberfläche zu finden. Da Messungen mit bovinem und humanem Serumalbumin keine signifikanten Unterschiede zeigen, ist davon auszugehen, dass die Region, in der der zweite bovine Tryptophanrest sitzt, keinen Beitrag zur Bindung von Liganden leistet.^[98]

Die Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der Proteinbindungskonstanten von Arzneistoffen zeichnet sich durch ihre Schnelligkeit und den geringen Substanzbedarf aus. Außerdem zeigt sie eine gute Vergleichbarkeit mit herkömmlichen Methoden zur Proteinbindungsbestimmung.^[93] Unabhängig davon ist die Fluoreszenzspektroskopie die aktuell am häufigsten verwendete Methode zur Charakterisierung der Proteinbindung von Arzneistoffen. So wurden in den letzten Jahren zahlreiche Wirkstoffe wie Furosemid und Hydrochlorthiazid^[93], Loratadin^[99], Thiopental^[100], Betulinsäure^[101], die Flavonoide Nevadensin^[102] und Sophoricosid^[103], Phycocyanin^[104] sowie verschiedene Phenothiazine^[105] und Coxibe^[106] mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

1.3.9 NMR-Spektroskopie

Auch die NMR-Spektroskopie kann zur Beschreibung von Wirkstoff-Protein-Interaktionen verwendet werden. Die Charakterisierung des Bindungsverhaltens erfolgt hierbei meist durch Diffusions- oder Relaxationsmessungen und die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten (s. 4.5).^[107,108,109]

Auf diese Weise wurden beispielsweise Proteinbindungsstudien mit Bendalin,^[110] Quercetin^[111] und unterschiedlichen Chinolonen^[112] durchgeführt.

1.3.10 Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (SPR)

Die wohl innovativste Methode zur Bestimmung von Proteinbindungskonstanten ist die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR). Sie ist eine Biosensortechnologie, die auf der Detektion von Massenänderungen beruht. Hierbei wird Serumalbumin auf der Oberfläche eines Sensorchips in einer Miniaturflusszelle immobilisiert. Die Arzneistoffe werden über die Oberfläche dieses Sensorchips gespült und Wechselwirkungen mit den immobilisierten Molekülen werden über eine Änderung des Brechungsindexes detektierbar. Verschiedene Arbeitsgruppen nutzten in den letzten Jahren diese Methode zur Bestimmung von Proteinbindungskonstanten.^[113,114,115,116]

1.3.11 Theoretische Methoden

Theoretische Berechnungen von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR) sind ein wichtiges Werkzeug in der Arzneistoffentwicklung. Dementsprechend wurden auch verschiedene theoretische Modelle entwickelt, um die Affinität von Arzneistoffen zu Albumin zu quantifizieren.^[117,118,119,120] Üblicherweise werden die Ergebnisse dieser Modelle mit entsprechenden experimentellen Daten verglichen.

Die Veränderung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von Wirkstoffen in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Plasmaproteinen ist für *Rusnak et al.* die Grundlage zur Berechnung der Proteinbindung von Wirkstoffen.^[121]

2 ZIEL DER ARBEIT

Zusätzlich zur bereits existierenden, von *Heinze*^[122] entwickelten, Messanlage sollte eine zweite Anlage, die mit einem Diodenarraydetektor ausgestattet ist, aufgebaut werden. In diesem Zusammenhang sollte die Software entsprechend angepasst und bestehende Fehlerquellen im Bereich der Hard- und Software beseitigt werden. Im Allgemeinen sollte die bestehende Anlage im Laufe der Arbeit weiter optimiert werden.

Um die Nähe der kontinuierlichen Ultrafiltration zu den *In-vivo*-Bedingungen zu unterstreichen, sollten erstmals Messungen mit humanem Plasma durchgeführt werden. Die erhaltenen Messwerte sollten hierfür mit Ergebnissen aus Experimenten mit bovinem und humanem Serumalbumin verglichen werden.

Des Weiteren sollte ein Ansatz entwickelt werden, die häufig diskutierte Verdrängung eines Wirkstoffes aus seiner Proteinbindung zu simulieren. Als Modellsubstanzen wurden Phenprocoumon und Phenylbutazon eingesetzt, da von ihnen eine entsprechende Interaktion literaturbekannt war und sie geeignete Voraussetzungen zur photometrischen Detektion aufwiesen.

Da die Messung der Proteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration im wässrigen Milieu stattfindet, sollte ein Lösungsweg zur Bestimmung der Proteinbindung wasserunlöslicher Substanzen gefunden werden. Diesbezüglich sollten Versuche mit bekannten Substanzen durchgeführt werden. Die Wirkstoffe sollten hierfür in unterschiedlichen Mengen DMSO gelöst werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollten im Anschluss mit Werten, die ohne die Verwendung von DMSO erhalten wurden, verglichen werden.

Zusätzlich sollten weitere neue Wirkstoffe vermessen werden, von denen die Proteinbindung bisher unbekannt war.

3 KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION

3.1 Aufbau der Messanlage

Die Messanlage, mit der die im Nachfolgenden beschriebenen Messungen durchgeführt wurden, wurde von *Heinze*^[122] aufgebaut und optimiert. Als Vorbild diente eine Messanlage aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. P. Nickel* an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, die von *Illy*^[123] und *Oehlmann*^[124] entwickelt wurde. Im Laufe dieser Arbeit wurde eine zweite, nahezu identische Anlage in Betrieb genommen. An den Messanlagen vorgenommene Modifizierungen werden in den entsprechenden Kapiteln besprochen.

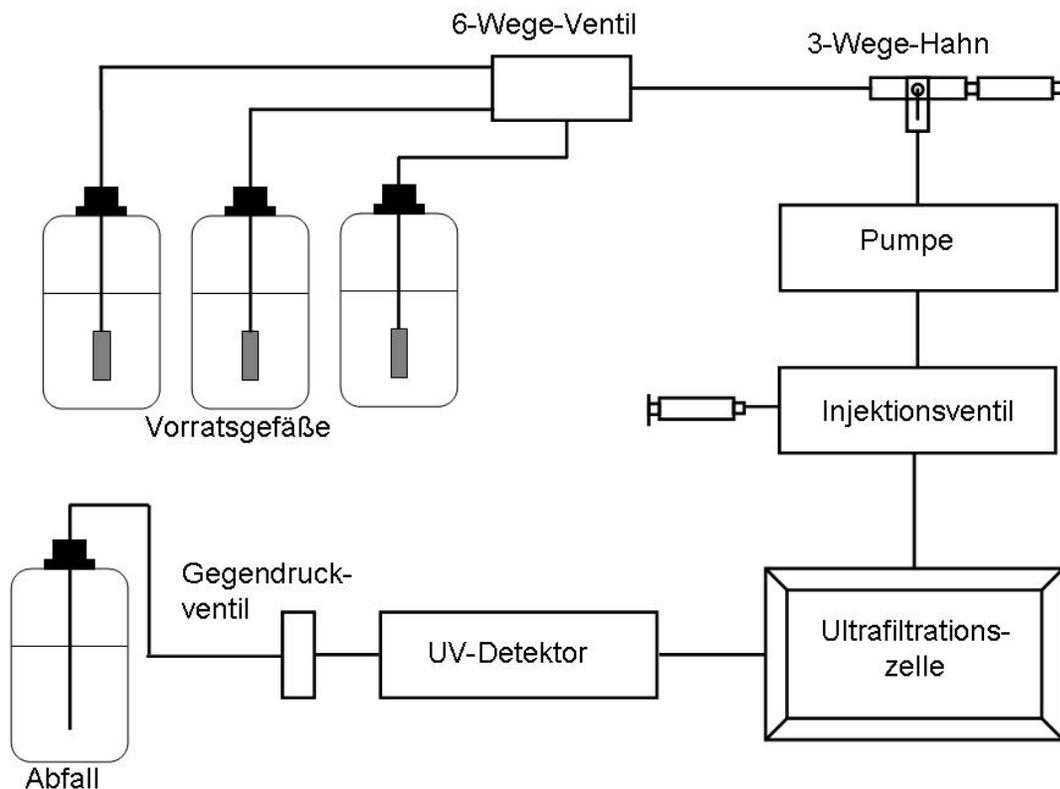


Abbildung 11: Schematischer Aufbau der verwendeten Messanlage

3.1.1 Vorratsgefäße

Wasser, Puffer und Arzneistofflösungen, die innerhalb der Messungen verwendet wurden, werden über Edelstahlfritten mit einer Porengröße von 2 µm direkt aus den Vorratsgefäßen angesaugt. Die verwendeten Fritten sorgen dafür, dass eventuelle Verunreinigungen wie Schwebstoffe von den anderen Teilen der Messanlage, insbesondere der Pumpe und dem UV-Detektor, ferngehalten werden.

3.1.2 6-Wege-Ventil

Um während der Versuche zwischen den Vorratsgefäßen für Wirkstofflösung und Puffer wechseln können, wird ein Teflon-Schaltventil mit 6 Positionen (Rheodyne, Cotati, CA, USA, Modell 5011) verwendet. Die weiteren Positionen des 6-Wege-Ventils sind mit Wasservorratsgefäßen belegt und werden im Routinebetrieb nur zum Spülen der Anlage nach Versuchsende angesteuert. Die Schaltung zwischen den einzelnen Positionen erfolgt hierbei mittels Druckluft. Da das Ventil über einen Schalter an den Controller (Kommunikationseinheit zwischen Computer/Software und Bestandteilen der Messanlage) angeschlossen ist, können die Schaltungen während der Messungen vollautomatisch über die Steuerungssoftware durchgeführt werden. Für Wartungszwecke kann das Ventil auch softwareunabhängig über den Controller gesteuert werden.

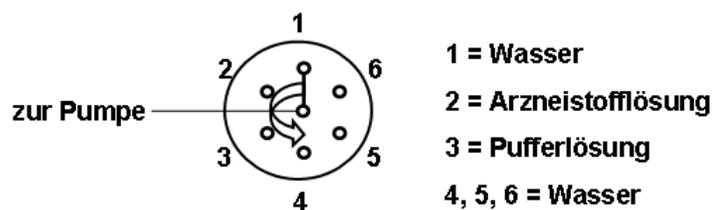


Abbildung 12: Schaltskizze und Anschlüsse des 6-Wege-Ventils

3.1.3 Pumpe

An beiden Messanlagen wird das Modell 2250 der Firma Bischoff (Leonberg, Deutschland) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Doppelkolbenpumpe, die mit einem analytischen Pumpenkopf (Flussrate 0,01-4,99 ml/min) ausgestattet ist. Sie zeichnet sich besonders durch ihr pulsationsarmes Arbeiten im Niederdruckbereich aus und garantiert somit eine konstante Flüssigkeitsförderung. Falls der Druck im System ansteigen sollte, besteht die Möglichkeit an der Pumpe einen Maximaldruck einzustellen, ab dem die Pumpe Ihren Betrieb automatisch einstellt. Diese Funktion ist von Vorteil, um in entsprechenden Fällen die Ultrafiltrationsmembran zu schützen. Die Pumpe ist über eine RS232-Schnittstelle direkt mit dem Computer verbunden und kann dementsprechend über die Steuerungssoftware angesteuert werden. Über ein sogenanntes „Purge“-Ventil kann die Pumpe problemlos entlüftet werden. Denselben Zweck erfüllt ein Teflon-3-Wege-Hahn, der der Pumpe vorgeschaltet ist. Durch einen Luer-Anschluss am 3-Wege-Hahn kann mit einer handelsüblichen Einmalspritze, neben der Entlüftung der Pumpe, auf einfachem Weg Lösung aus den Schläuchen angesaugt werden, um diese so ebenfalls zu entlüften.

3.1.4 Injektionsventil

Um die verwendete Proteinlösung in das Messsystem zu injizieren wird ein Injektionsventil der Firma Rheodyne (Cotati, CA, USA), Modell 7010 verwendet. Eine konstante Injektionsmenge wird durch den Anschluss einer 1-ml-Probenschleife gewährleistet.

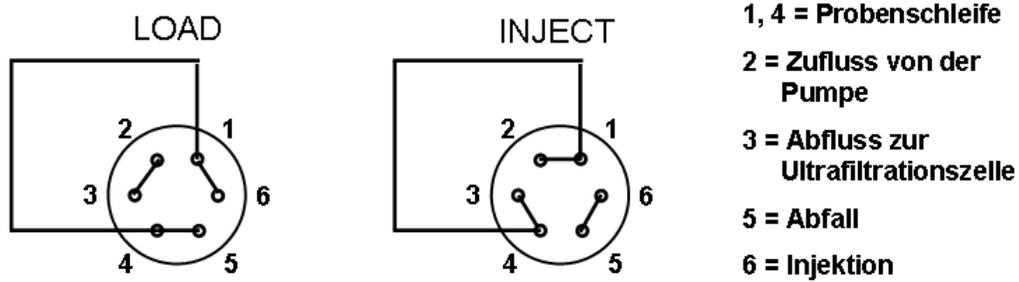


Abbildung 13: Schaltskizze und Anschlüsse des Injektionsventils

3.1.5 Ultrafiltrationszelle

In der nachfolgenden Abbildung 14 ist der schematische Aufbau der verwendeten Ultrafiltrationszelle dargestellt.

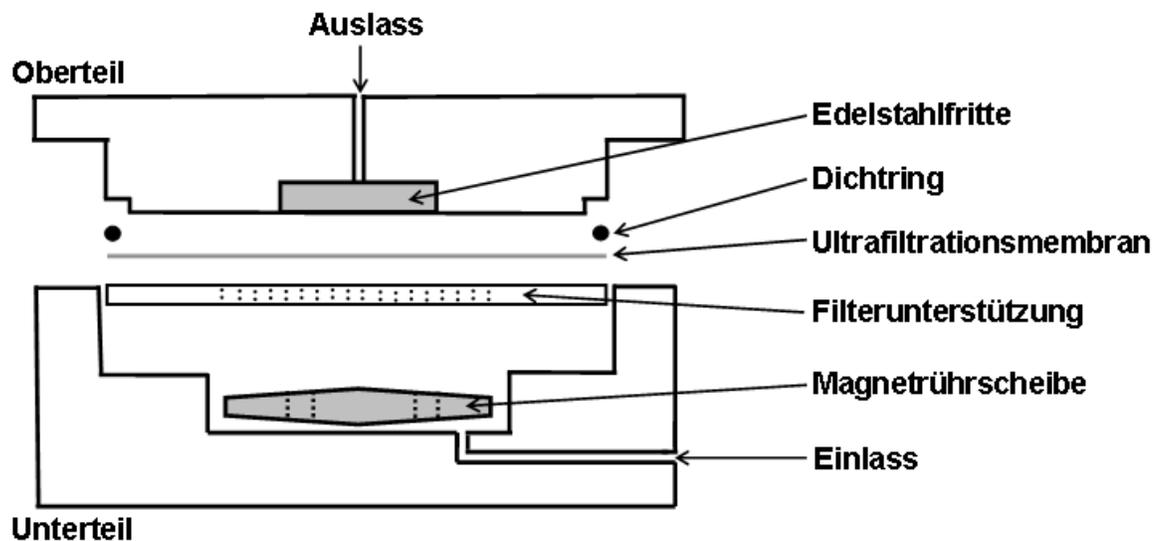


Abbildung 14: Schematischer Aufbau der Ultrafiltrationszelle

Im Unterteil der Messzelle befindet sich zum einen ein Kanal, durch den die Lösungen in die Zelle einfließen, zum anderen ist eine Vertiefung für eine Magnetrührscheibe in den Zellenboden eingearbeitet. Ihr Innendurchmesser beträgt 47 mm, was exakt der Größe der verwendeten Ultrafiltrationsmembran entspricht. Eine Edelstahlfritte mit 2 µm Porenweite, die in das Oberteil der Zelle eingearbeitet ist, sorgt dafür, dass eventuell vorhandene Schwebstoffe, wie z.B.

Fasern der Ultrafiltrationsmembran etc. den UV-Detektor nicht erreichen. Oberhalb der Fritte befindet sich der Flüssigkeitsauslass, durch den die Lösungen letztendlich die Zelle wieder verlassen und weiter zum Detektor gepumpt werden. Beide Teile sind aus Plexiglas gefertigt.

Während der Messung wird die Zelle in einem Edelstahlgestell mit vier Flügelmuttern fixiert und durch einen Dichtring, der exakt in das Unterteil passt, dicht verschlossen.

3.1.5.1 Magnetrührscheibe

Die Magnetrührscheibe sitzt in der dafür vorgesehenen Vertiefung im Zellenboden. Sie besitzt vier minimal abgeschrägte Bohrungen und sorgt für die gleichmäßige Mischung der in der Zelle befindlichen Flüssigkeiten. Der Durchmesser der verwendeten Rührscheibe wurde gegenüber Heinze ^[122] um 1-2 mm verkleinert, da sich die Rührscheibe in der ursprünglichen Größe relativ häufig im Zellenboden verkantete, und damit gleichmäßiges Rühren nicht gewährleistet war. Des Weiteren wurde die Unterseite der Magnetrührscheibe in Analogie zur Oberseite begradigt, was keinen ersichtlichen Nachteil bezüglich des Rührverhaltens mit sich brachte.

3.1.5.2 Filterunterstützung

Die Filterunterstützung hat einen Durchmesser von 47 mm und passt somit genau in das Zellenunterteil. Sie hat im Wesentlichen die Funktion eine mögliche Beschädigung der Ultrafiltrationsmembran durch die auftretenden Drücke im System oder durch mechanische Einflüsse seitens des Magnetrührers zu verhindern. Die Filterunterstützung besteht wie die Zelle selbst aus Plexiglas. In der Mitte besitzt die Scheibe über 100 kleine Bohrungen (Durchmesser 1 mm), die dafür sorgen, dass ein gleichmäßiger Flüssigkeitsstrom gesichert ist. Zusätzlich ist die Filterunterstützung zur Mitte hin geringfügig abgeflacht, damit die Filtration der

Flüssigkeit nicht nur im Bereich der Bohrungen, sondern über den ganzen Filterdurchmesser stattfinden kann.

Durch ihre Verwendung ist die Ultrafiltrationsmembran optimal geschützt ohne dabei die Druckverhältnisse im System bzw. die Messungen zu beeinträchtigen.

3.1.5.3 Ultrafiltrationsmembran

Zur Filtration der injizierten Proteine werden Ultracel Ultrafiltrationsmembranen der Firma Millipore (Bedford, MA, USA) verwendet. Sie bestehen aus regenerierter Cellulose und zeichnen sich durch ein geringes Adsorptionsvermögen gegenüber Proteinen, DNA und anderen Makromolekülen aus, was eine Grundvoraussetzung für die Verwendung zur Proteinbindungsbestimmung ist^[125]. Trotz korrekter Lagerung etc. verursachten die im Routinebetrieb verwendeten Albumine gelegentlich einen höheren Proteindurchgang durch die Ultrafiltrationsmembran, was möglicherweise mit der Alterung des Albumins in Zusammenhang stehen könnte. Daher wurden zusätzlich zu den von *Heinze*^[122] standardmäßig verwendeten Membranen mit einer Trenngrenze von 30000 Dalton (PLTK04710) auch Ultrafiltrationsmembranen mit einer Trenngrenze von 10000 Dalton (PLGC04710) verwendet. Mit ihnen konnte der Proteindurchgang stabil auf ein Minimum reduziert werden. Bei vorschriftsmäßiger Pflege können die Membranen etwa drei Wochen verwendet werden.

3.1.6 UV-Detektor

Zur Detektion der Arzneistofflösungen stehen zwei verschiedene UV-Detektoren zur Verfügung. Hierbei handelt es sich einmal um ein Einstrahlphotometer, Modell M87 der Firma Knauer (Berlin, Deutschland) mit einer Durchflussszelle von 1 cm Schichtdicke. Messbar sind Wellenlängen von 205-400 nm. Beim zweiten Detektor handelt es sich um einen DAD-3L der Firma Bischoff (Leonberg, Deutschland). Im Vergleich zum Erstgenannten, können hiermit bis zu 3 Wellenlängen im Bereich

von 190-395 nm gleichzeitig detektiert werden. Dadurch ist es zum Beispiel möglich das Verhalten zweier Arzneistoffe simultan zu beobachten, weshalb der Detektor vor allem bei der Simulation der Verdrängungsversuche 4.3) Anwendung fand. Die Durchflusszelle hat hier ebenfalls eine Schichtdicke von 1 cm.

3.1.7 Gegendruckventil

Zwischen den jeweiligen Detektoren und den Abfallgefäßen ist in jeder der beiden Messanlagen ein Durchfluss-Rückdruckregler der Firma SSI (Artikel: SSI-06-0120, Spence Strainers International, Walden, NY, USA) eingebaut. Mit ihm kann stufenlos ein Gegendruck zwischen 0,3 und 10 bar aufgebaut werden. Das hat zur Folge, dass sich die Lösungen in den Schläuchen und vor allem im Detektor nicht entspannen können und somit keine die Messung störenden Luftblasen entstehen.

3.1.8 Sonstiges

3.1.8.1 Magnetrührer

Damit die Lösung in der Zelle gleichmäßig durchmischt werden kann, wird die gesamte Zelle auf einem Magnetrührer platziert. Verwendet wurde hier das Modell „RCT basic“ der Firma IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland).

3.1.8.2 Verbrauchsmaterialien / Ersatzteile

Neben den oben beschriebenen Hauptbestandteilen der Messanlage wurde eine Vielzahl an Kleinteilen zum Aufbau der Anlage verwendet, die im Folgenden aufgelistet sind.

Folgende Bestandteile der Messanlage wurden von der Firma Duratec Analystechnik GmbH (Hockenheim, Deutschland) bezogen:

- 1/16“ Teflon-Kapillare (PTFE), ID = 0,75 mm Art.-Nr. 300163
- 1/16“ Flanged Niederdruckfittings Art.-Nr. 516513
- Rheodyne SS-Schneidring Art.-Nr. 517010-010
- Rheodyne Probenschleife 1,0 ml Art.-Nr. 517027
- Teflon-3-Wege-Hahn, T-Ausführung Art.-Nr. 240911
- 2µm Lösungsmittelansaugfilter, 1/16“ Fitting Art.-Nr. 300018
- Rheodyne RheBuild Kit, 5700 Series Art.-Nr. 515700-999

Firma Latek Labortechnik-Geräte GmbH (Eppelheim, Deutschland):

- 1/16“ Edelstahlschrauben Art.-Nr. 8070-8080
- 1/16“ Teflon-Kegel Art.-Nr. 8070-8086
- Edelstahlfritte 2 µm Art.-Nr. 8020-8020

Sonstiges:

Firma B.Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)

- Injekt Solo 2 ml – Luer-Ansatz-zentrisch Art.-Nr. 4606027V
- Injekt Solo 5 ml – Luer-Ansatz-exzentrisch Art.-Nr. 4606051V
- Vasofix Braunüle Luer Lock, 16G 2“ Art.-Nr. 4268172B

Firma Bischoff Analystechnik und -geräte GmbH (Leonberg, Deutschland)

- Pumpenkolbendichtung 1/8“ Art.-Nr. 22000217

3.2 Steuerung des Messsystems

3.2.1 Hardware

Beide Messanlagen sind mit einem handelsüblichen Desktop-PC ausgestattet, mit dem die komplette Anlage gesteuert werden kann. Der Computer ist wie im nachfolgenden Schema zu sehen, über eine RS232-Schnittstelle sowohl direkt mit der HPLC-Pumpe als auch mit einem W_S A-Controller verbunden.

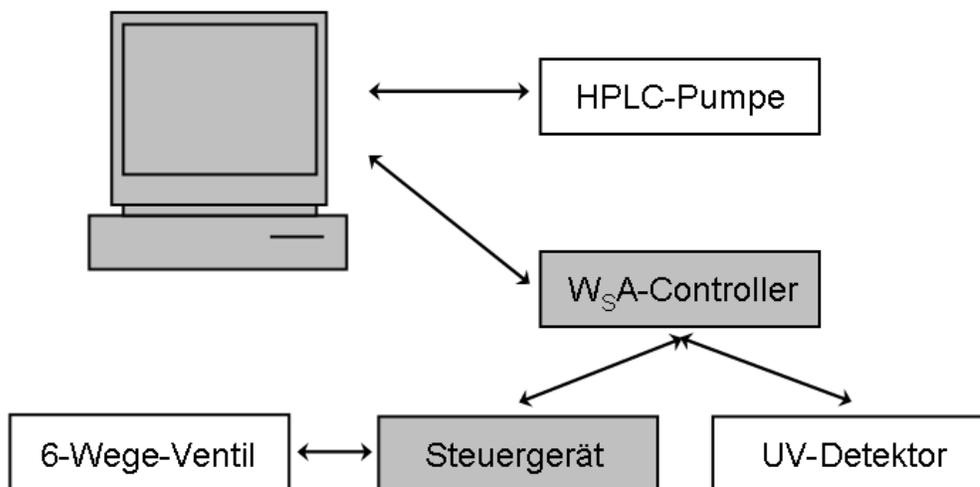


Abbildung 15: Diagramm zur Steuerung des Messsystem

Daher kann die Pumpe, wie in 3.1.3 angesprochen, direkt vom Computer aus bedient werden. Der W_S A-Controller seinerseits stellt die Kommunikationseinheit zwischen UV-Detektor bzw. 6-Wege-Ventil und dem Computer dar. Gegenüber der Messanlage von *Heinze*^[122] musste bei der Entwicklung des zweiten Controllers berücksichtigt werden, dass es mit dem DAD-3L-Detektor möglich ist drei Wellenlängen gleichzeitig zu messen. Deshalb verfügt der „neue“ W_S A-Controller über ein größeres Speichermodul und über drei separate Eingänge, entsprechend der Anzahl messbarer Signale. Die Messmethodik ist dagegen bei beiden verwendeten Controllern die selbe, es werden innerhalb einer Sekunde acht

Messwerte vom UV-Detektor abgenommen, diese gemittelt und anschließend an die Computersoftware weitergegeben. Des Weiteren gibt der Controller die Befehle zum Umschalten des 6-Wege-Ventils von der Software an das zugehörige Steuergerät weiter, das letztendlich den Schaltvorgang auslöst. Über das Steuergerät kann das 6-Wege-Ventil auch unabhängig vom Computer geschaltet werden, was sich vor allem bei Wartungsarbeiten als äußerst hilfreich erweist.

3.2.2 Software

Die Steuerung der gesamten Anlage ist mit dem eigens geschriebenen und innerhalb dieser Arbeit weiterentwickelten Programm „WSA-Protein“ möglich. Das Hauptmenü des Steuerprogramms ist in Abbildung 16 zu sehen:

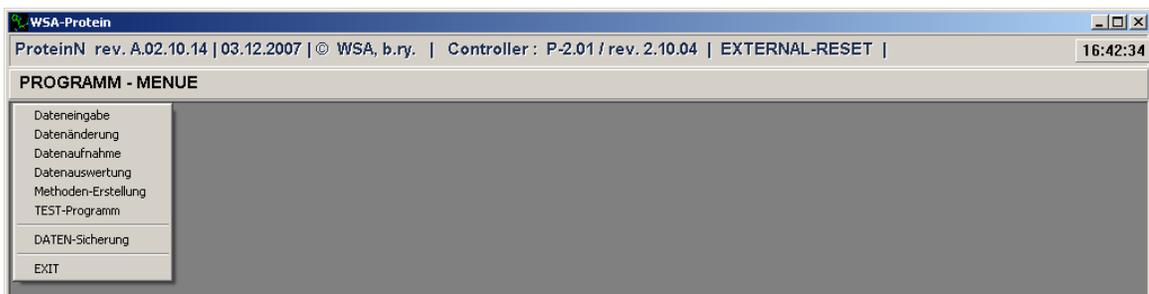


Abbildung 16: Hauptmenü der Steuerungssoftware

Wichtigster Punkt im Hauptmenü ist die Methodenerstellung. Hier werden in den Masken für Substanz, Protein, Kammer, Vorversuch und Hauptversuch alle notwendigen Daten eingegeben und gespeichert.

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, beinhaltet die Substanzmaske beispielsweise Eingabefelder für den Namen der Substanz, deren Molmasse, Summenformel und Einwaage, sowie Felder für das verwendete Lösungsmittel, dessen Menge und pH-Wert der Lösung. Da über 100 solcher Substanzmasken innerhalb des Programms zur Verfügung stehen, kann jeder verwendeten Substanz eine Nummer zugeteilt werden, so dass die Versuchsdaten nicht immer wieder von neuem eingegeben werden müssen, sondern gegebenenfalls nur noch korrigiert werden müssen.

Substanz-Daten

Kommentar : Candesantan | Nr. : 31
 Benutzer-Name : Albert

Versuch

Kennung : A | Nr. : 0

Wirkstoff

Name : Candesantan
 Summenformel : C24H20N6O3
 Molmasse : 440,50 g/mol | Einwaage : 9,60 mg
 Log.Mol. Ext.-Koeff. : 1,000

Lösungsmittel

Bezeichnung : Phosphat-Puffer
 Volumen : » 500«mL
 Zusatz 0,1M-HCl : 0 mL
 Zusatz 0,1M-NaOH : 0 mL
 pH-Wert : 7,40
 Messwellenlänge : 250 nm

Bitte ändern und mit > Quit < bestätigen !

Quit

Eingabe-Grenzen

50, 9999

letzte Änderung : 16 Sep 2005 / 09:57:24

Abbildung 17: Eingabemaske der Substanzdaten

Ähnlich ist das Menü für das Protein bzw. die Messzelle gestaltet. Auch hier werden die entsprechenden Daten wie Proteineinwaage, Molmasse des Proteins, Zugabevolumen etc. eingegeben.

In den Masken für Vor- und Hauptversuch werden die Flussraten und die Zeiten für die jeweiligen Versuchsteile festgelegt. Der Maske „Vorversuch“ kommt allerdings nur eine untergeordnete Bedeutung zu, da die beiden Versuchsteile „Ohne Reaktionskammer“ bzw. „Mit Kammer ohne Membran“ im routinemäßigen Messbetrieb nicht verwendet werden. Im Menüpunkt Hauptversuchsdaten finden sich dann entsprechend die Abschnitte einer Messung, mit denen die Daten zur Proteinbindungsbestimmung generiert werden.

Wenn alle Angaben zum Versuch in der Methoden-Erstellung hinterlegt sind, werden die einzelnen Masken eines Versuchs im Hauptmenü über den Button „Dateneingabe“ zusammengestellt. Es müssen nur noch die Nummern der zum Versuch gehörigen Substanz-, Protein-, Kammer- und Versuchsmasken eingegeben werden, die anschließend nochmals abgefragt und überprüft werden können.

WSA-Protein
ProteinN rev. A.02.10.14 | 03.12.2007 | © WSA, b.ry. | Controller : P-2.01 / rev. 2.10.04 | EXTERNAL-RESET | 16:44:56

| Hauptversuch-Daten | | | |
|---------------------------------|---------------|------------|------------------------|
| Kommentar | : Candesartan | | I Nr. : 1 |
| Ohne Protein | | | |
| Laden Wirkstoff | : | 60 min | |
| Spülen Lösungsmittel | : | 60 min | |
| Flussrate | : | 0,5 mL/min | |
| Protein-Injektion | | | |
| Spülen Lösungsmittel | : | 60 min | |
| Flussrate | : | 0,5 mL/min | |
| Mit Protein | | | |
| Laden Wirkstoff | : | 60 min | |
| Spülen Lösungsmittel | : | 60 min | |
| Flussrate | : | 0,5 mL/min | |
| Zwischenspülen | | | |
| Wasser | : | 0 min | Flussrate : 1,0 mL/min |
| Puffer ohne Daten | : | 0 min | Flussrate : 1,0 mL/min |
| Puffer mit Daten | : | 0 min | Flussrate : 1,0 mL/min |
| Spülen nach Versuchsende | | | |
| Wasser | : | 0 min | Flussrate : 0,5 mL/min |

Bitte ändern und mit > Quit < bestätigen !

| Eingabe-Grenzen | |
|------------------------------------------|--|
| .1, 2 | |
| letzte Änderung : 27 Okt 2008 / 09:59:11 | |

Abbildung 18: Eingabemaske der Hauptversuchsdaten am Beispiel von Candesartan

Sind alle Eingaben bestätigt, kann der Versuch im Hauptmenü unter „Datenaufnahme“ gestartet werden. Zur eigentlichen Messung startet dann das „ProteinRUN“-Programm, das die Gerätesteuerung und Datenspeicherung übernimmt und den aktuellen Messverlauf graphisch darstellt. Das Hauptprogramm läuft währenddessen im Hintergrund weiter. Bevor der Versuch beginnt, wird zur Sicherheit nochmals die zur betreffenden Substanz gehörige Messwellenlänge abgefragt. Wenn diese als korrekt bestätigt wird, startet die Aufnahme der Daten. Ab diesem Zeitpunkt läuft die Messung automatisch. Vor der Proteininjektion wird die Datenaufnahme nochmals angehalten, bis man dem System bestätigt hat, dass das Protein injiziert wurde. Anschließend läuft das Programm selbständig bis zum letzten Versuchsteil durch.

Durch Betätigung der „Stop“-Taste kann die Datenaufnahme in jedem einzelnen Versuchsteil manuell beendet werden, woraufhin das Programm dann automatisch die bis dato gemessenen Daten speichert und mit dem nächsten Versuchsteil fortfährt. Diese Funktion dient vor allem dazu Zeit innerhalb der einzelnen

Versuchsteile zu sparen, so lassen sich z. B. überlange Spülschritte entsprechend abkürzen.

Zusätzlich verfügt das Programm noch über ein Test-Menü, mit dem Pumpe und Ventil unabhängig von einer Messung angesteuert werden können und Substanztestläufe durchgeführt werden können.



Abbildung 19: Testmenü

Änderungen gegenüber der Programmversion aus der Arbeit von *Heinze*^[122] beziehen sich auch hier hauptsächlich auf die Verwendung des neuen Detektors. So wurde die Möglichkeit geschaffen, die gemessene zweite oder dritte Wellenlänge nicht nur am Detektor zu beobachten, sondern auch „online“ am Monitor zu verfolgen und aufzuzeichnen.

In der alten Programmversion konnte nur direkt auf die Positionen 1-3 zugegriffen werden. Da die damalige Art der Kommunikation zwischen Programm, Controller und Ventilschalter regelmäßig zu fehlerhaften Schaltvorgängen führte, wurde die Programmierung dahingehend geändert, dass nun jede der sechs Positionen direkt ansteuerbar ist.

Daneben wurden noch diverse kleinere Fehler entdeckt und behoben, die bis dato z. B. Programmabstürze oder den Abbruch der Messung zur Folge hatten.

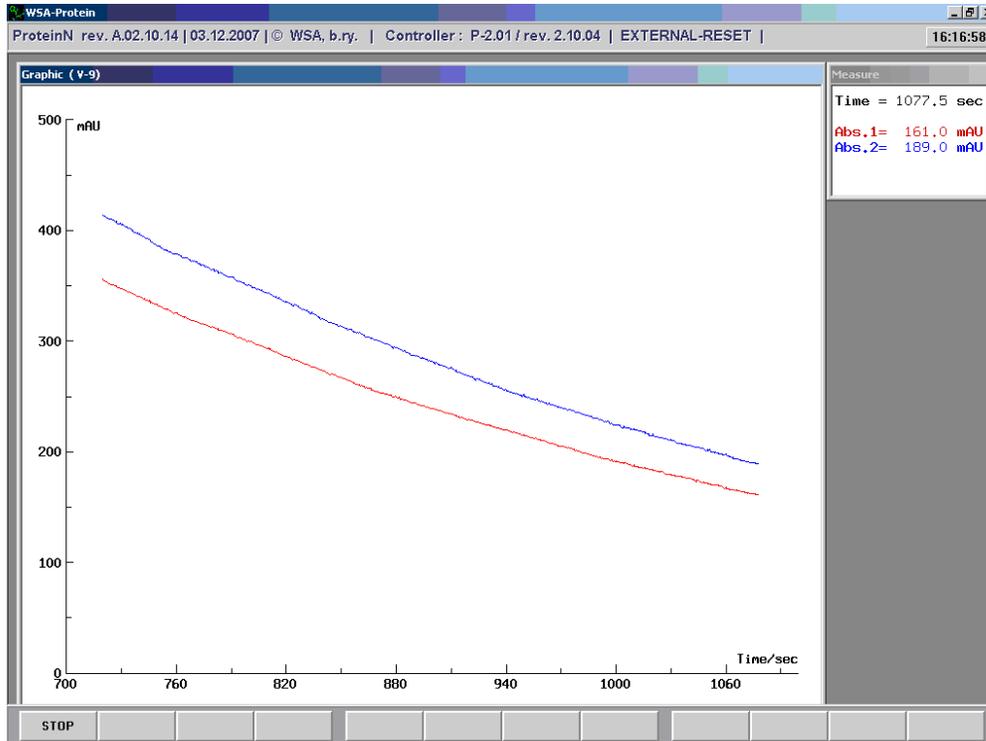


Abbildung 20: Abbildung zweier bei verschiedenen Wellenlängen simultan aufgenommenen Spülkurven

3.3 Fehlervermeidung - Wartung und Pflege der Messanlage

Da eventuell auftretende technische Probleme oder Unregelmäßigkeiten in der Regel erst während einer laufenden Messung auffallen, und dies meist mit erheblichem Zeitverlust einhergeht, ist es umso wichtiger der gesamten Messanlage eine regelmäßige Wartung bzw. Pflege zukommen zu lassen. Im folgenden Abschnitt sollen nun kurz die wichtigsten Maßnahmen zur Fehlervermeidung beschrieben werden.

3.3.1 6-Wege-Ventil

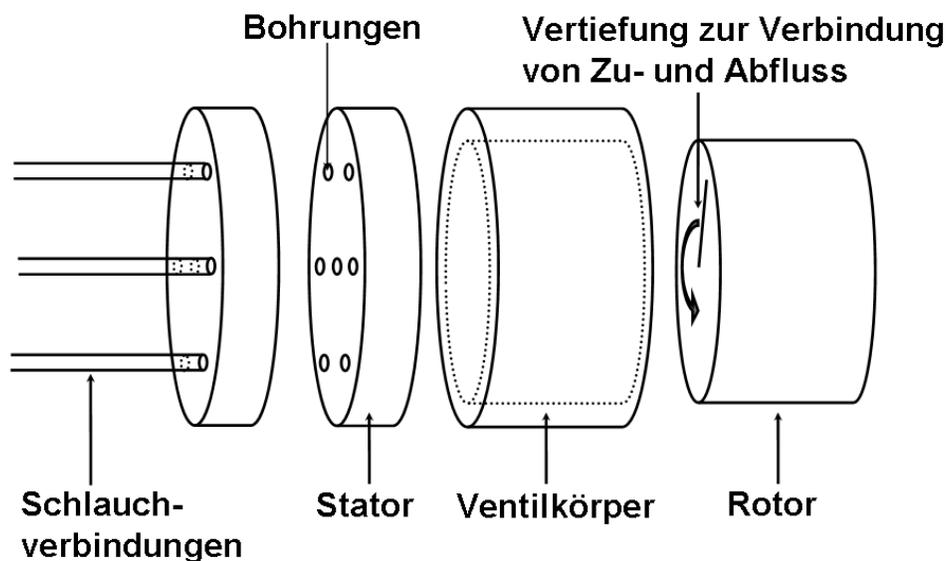


Abbildung 21: Schematischer Aufbau des 6-Wege-Ventils

In Abbildung 21 ist der Aufbau des verwendeten 6-Wege-Ventils zu sehen. Da sowohl der Ventilkörper als auch der Stator aus Teflon bestehen, erzeugt die Bewegung des Rotors während der Schaltungen immer wieder Teflon-Abrieb. Dies führt dazu, dass die Bohrungen der Ab- und Zuflüsse durch den Abrieb verstopfen und eine gleichmäßige Förderung der Lösungsmittel letztendlich nicht mehr sichergestellt ist. Ein Druckabfall an der Pumpe oder schwankende Elutionskurven können Indizien für eine Verstopfung des Stators sein. Um diesem Problem aus

dem Weg zu gehen, sollte das 6-Wege-Ventil nach Möglichkeit in wöchentlichem Abstand auseinandergebaut und gesäubert werden. Beim Zusammenbau des Ventils ist dementsprechend darauf zu achten, dass das Ventil weder zu fest noch zu locker verschraubt wird, da hierdurch entweder der Abrieb gefördert wird oder Undichtigkeiten entstehen können.

3.3.2 Injektionsventil

Nach Beendigung eines Versuches muss das Injektionsventil gründlich mit Wasser gespült werden. Geschieht dies nicht, können Proteinreste in die Anlage gelangen und so die Messung verfälschen. Zusätzlich sollte die Injektionsschleife regelmäßig z. B. mit einer ethanolischen Lösung gespült werden, um eine eventuelle Verkeimung zu vermeiden.

3.3.3 Ultrafiltrationsmembran

Eine intakte Ultrafiltrationsmembran ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Proteinbindungsbestimmung. Allerdings sind Schäden an der Membran häufig mit bloßem Auge nicht oder nur schwer erkennbar, so dass meist erst ein erhöhter Proteindurchgang während der Messung auf eine fehlerhafte Membran hinweist. Um Beschädigungen zu vermeiden, sollten die Membranen niemals mit spitzen Gegenständen (z. B. Pinzetten) angefasst werden. Es empfiehlt sich die Membran an den Seiten anzufassen und die Filtrationsfläche möglichst wenig zu berühren. Wird die Membran in die Zelle eingelegt, sollte darauf geachtet werden, dass die Zelle nicht zu fest verschraubt wird. Ein zu hoher Druck vom Zellenoberteil auf die Membran kann beispielsweise zu minimalen Druckstellen oder Mikrorissen in der Membran führen.

Damit die Ultrafiltrationsmembranen mehrfach verwendet werden können, sollten folgende Hinweise beachtet werden: Vor dem ersten Einsatz ist die Membran ca.

eine Stunde in destilliertem Wasser einzulegen, um Weichmacher und ähnliche Stoffe, die eine Messung stören könnten, von der Membran zu waschen. Hierzu wird die Membran mit der glänzenden Seite nach unten ins Wasser gelegt. Das verwendete Wasser sollte während dieser Zeit mehrmals gewechselt werden. Nach einer beendeten Messung muss die Membran zur Reaktivierung mit Wasser gewaschen und wiederum ca. eine Stunde in 0,1 M Natronlauge eingelegt werden. Danach kann sie für weitere Versuche verwendet werden. Die Membranen werden in 10%igem Ethanol bei ca. 4°C im Kühlschrank gelagert und vor erneuter Verwendung kurz in Pufferlösung konditioniert.

3.4 Durchführung der Versuche

3.4.1 Verwendete Substanzen und Geräte

3.4.1.1 Wirkstoffe

Folgende Wirkstoffe kamen innerhalb den nachfolgend beschriebenen Versuche zum Einsatz:

| <i>Wirkstoff</i> | <i>Firma</i> |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Candesartan | AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland |
| Eprosartan | Solvay Arzneimittel, Hannover, Deutschland |
| Irbesartan | Sanofi-Synthelabo GmbH, Berlin, Deutschland |
| Telmisartan | Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland |
| Valsartan | Schwarz-Pharma AG, Monheim, Deutschland |
| Cinoxacin | Lilly GmbH, Giessen, Deutschland |
| Ciprofloxacin | Bayer AG, Leverkusen, Deutschland |
| Gatifloxacin | Grünenthal AG, Aachen, Deutschland |
| Levofloxacin | Höchst AG, Frankfurt a. Main, Deutschland |
| Nalidixinsäure | Sanofi-Winthrop GmbH, München, Deutschland |
| Ofloxacin | Höchst AG, Frankfurt a. Main, Deutschland |
| Phenprocoumon | Wörwag Pharma GmbH & Co. KG, Böblingen, Deutschland |
| Phenylbutazon | Merckle GmbH, Ulm, Deutschland |

Des weiteren wurden viele Stoffe aus der Gruppe der N,C-gekoppelten Naphthylisoquinoline verwendet, die von *Gulder*^[126] synthetisiert wurden.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen genannten Quellen herzlichst für die freundliche Unterstützung bedanken.

3.4.1.2 Albumine

Folgende Albumine wurden zur Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung verwendet:

Bovines Serum-Albumin

- Fluka, BioChemika, Fraction V, $\geq 96,0\%$ Art.-Nr. 05488
- Fluka, BioChemika, Fraction V, $\geq 95,0\%$ Art.-Nr. 05484

Bezogen über: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Humanes Serum-Albumin

- Calbiochem, Fraction V, High Purity Art.-Nr. 126658
- Sigma, Fraction V, 96-99% Art.-Nr. A1653

Bezogen über: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

3.4.1.3 Geräte

Zur Herstellung der Lösung wurden folgende Geräte verwendet:

Waage:

- Sartorius Research R180D Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

pH-Meter:

- PHM220 Lab pH-Meter Radiometer Analytical SAS, Lyon, Frankreich

Ultraschallbad:

- Branson 2510 Heinemann Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, Deutschland

3.4.2 Verwendete Lösungen

3.4.2.1 Pufferlösung

Zur Messung des Ausmaßes der Proteinbindung wird eine physiologische Pufferlösung verwendet, die auch in der Arbeit von *Heinze*^[122] eingesetzt wurde.

Der Puffer ist folgendermaßen zusammengesetzt:

| | |
|---------------------------------------------|-----------|
| Na ₂ HPO ₄ - Dihydrat | 4,025 g/l |
| NaH ₂ PO ₄ - Dihydrat | 0,800 g/l |
| Natriumchlorid | 5,844 g/l |

Die Salze werden entsprechend eingewogen und in Millipore-Wasser gelöst. Zur Entgasung wird die Lösung für ca. 30 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Abschließend wird der pH-Wert überprüft und falls notwendig mit konzentrierter Phosphorsäure oder 0,1 M Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt.

Die Lösung wird nach der Verwendung dicht verschlossen und sollte vor dem erneuten Gebrauch nochmals entgast werden. Unabhängig davon sollte der Puffer mindestens zweimal wöchentlich frisch hergestellt werden, um Beeinträchtigungen durch die Alterung des Puffers zu vermeiden.

3.4.2.2 Substanzlösungen

Alle verwendeten Substanzen werden im Puffer, der in 3.4.2.1 beschrieben ist, gelöst. Die Konzentration der hergestellten Lösungen sollte so gewählt sein, dass das detektierte Absorptionsplateau im Bereich zwischen 0,4 und 0,8 AU liegt. Damit die Versuche korrekt auswertbar sind, muss zusätzlich das molare Verhältnis von Wirkstoff- und Proteinlösung zwischen 0,4 und 0,8 liegen. Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich meist ein Konzentrationsbereich von 10-25 mg/l. Mit Hilfe eines Testlaufs (s. 3.2.2) können die Konzentrationen der hergestellten Lösungen auf einfachem Wege überprüft werden.

Falls sich die Substanzen nur schwer in Wasser bzw. Puffer lösen, können sie, je nach Säure-Base-Eigenschaften, z. B. mit konzentrierter Phosphorsäure oder 0,1

M Natronlauge angelöst werden. Die Wirkstofflösungen werden ebenfalls für ca. 30 Minuten im Ultraschallbad entgast.

3.4.2.3 Proteinlösung

Die Konzentrationen der Albuminlösungen, die innerhalb der Versuche verwendet wurden, lagen zwischen 38 und 42 mg/ml, was dem physiologischen Konzentrationsbereich entspricht. Nach der Einwaage in einen Messkolben wird das Albumin in der Pufferlösung (3.4.2.1) gelöst. Da sich Albumine aufgrund ihrer Proteinstruktur sehr gut in Wasser bzw. in dem hier zur Lösung verwendeten Puffer lösen, ist ein Schütteln des Ansatzes nicht notwendig, zumal dies nur zu einer unerwünschten Schaumbildung führen würde. Zur homogenen Durchmischung der Albuminlösung ist es daher ausreichend den Messkolben mehrmals langsam zu kippen.

3.4.3 Versuchsablauf

In Abbildung 22 sind die einzelnen Abschnitte eines Versuches schematisch dargestellt. In jedem Versuchsteil, außer der Proteininjektion, wird zunächst Wirkstofflösung verwendet und im Anschluss mit Pufferlösung gespült, so dass jeweils zwei Elutionskurven erhalten werden. Die Abläufe innerhalb der einzelnen Versuchsschritte werden im Folgenden besprochen.

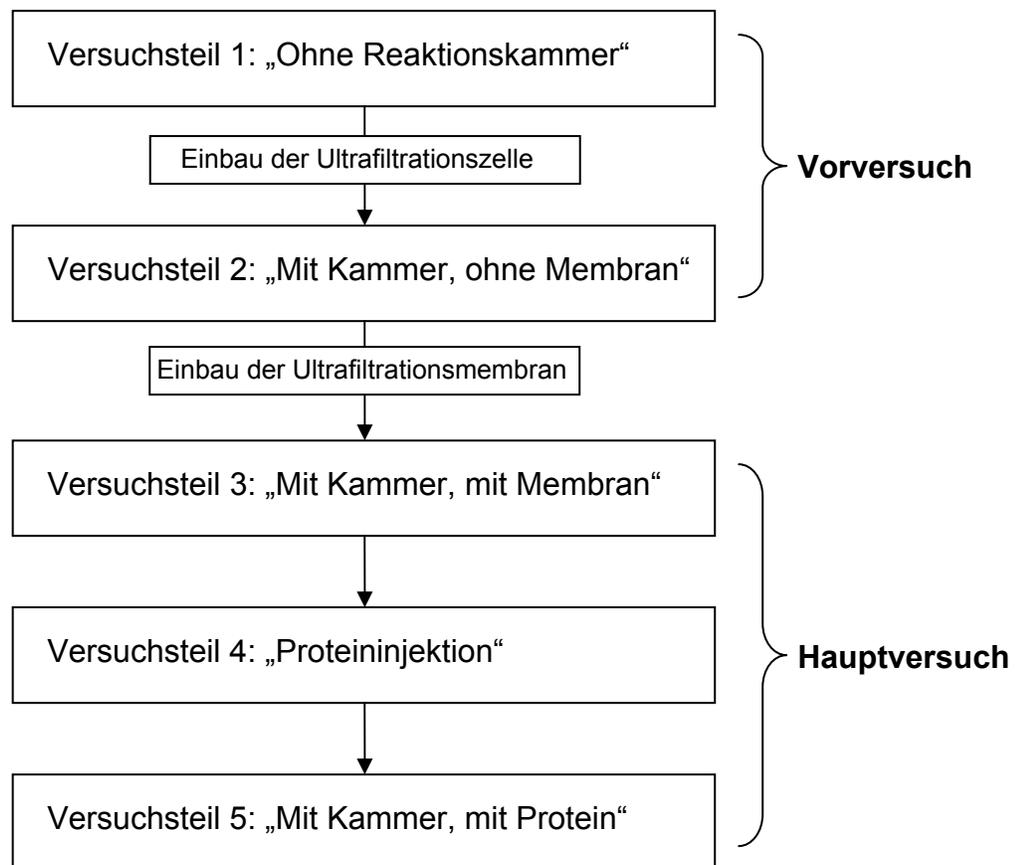


Abbildung 22: Bestandteile eines Versuchs

3.4.3.1 Versuchsteil 1: „Ohne Reaktionskammer“

Dem ersten Versuchsteil „ohne Reaktionskammer“ kommt ähnliche Bedeutung zu wie dem in 3.2.2 angesprochenen Testlauf im Menü der Software. Da die Anlage hier keine Messzelle enthält, entfällt dieser Abschnitt eines Versuches innerhalb der Routinemessungen. Dennoch eignet sich dieser Versuchsteil insbesondere zur Überprüfung der anderen Teile der Messanlage. Hiermit kann zum Beispiel auf einfachem Wege die Dichtigkeit des Systems oder das Fördervolumen der Pumpe beobachtet werden.

Bei der Durchführung dieses Versuchsteils wird zuerst Wirkstoff- und im Anschluss Pufferlösung durch die Anlage gepumpt, wodurch die Kurven 1 (Wirkstoff) und 2

(Spülkurve) erhalten werden. Nach Beendigung des Versuchsteils 1 stoppt das Programm die Messung und weist auf den Einbau der Messzelle hin.

3.4.3.2 Versuchsteil 2: „Mit Kammer, ohne Membran“

Vor Beginn des zweiten Versuchsteils wird die Ultrafiltrationszelle (hier ohne Ultrafiltrationsmembran) in die Messanlage integriert. Auch hier wird zunächst wieder Wirkstofflösung und danach Puffer durch die Anlage gepumpt. Man erhält so die Kurven 3 und 4.

Durch den Vergleich der Kurve 1 aus dem ersten Versuchsteil und der hier erhaltenen Kurve 3 kann beurteilt werden, ob der verwendete Wirkstoff an die Bestandteile der Ultrafiltrationszelle adsorbiert. Ein Unterschied bezüglich des Zeitpunkts, an dem die Absorption der Wirkstoffkurve ansteigt, ergibt sich hier durch das nun zusätzlich vorhandene Volumen der Messzelle, das der Wirkstoff durchlaufen muss. Diese zeitliche Verschiebung spiegelt also nur das größere Totvolumen der Anlage wieder und kann nicht als Indiz für eine Adsorption des Wirkstoffs an Zellenmaterial gewertet werden. Sollte allerdings ein flacherer Anstieg der Wirkstoffkurve 3 im Vergleich zur Kurve 1 erkennbar sein, würde dies auf eine Adsorption des Wirkstoffes hinweisen.

Nach Ende des Spülteils hält das Programm die Messung an und fordert das Einlegen der Ultrafiltrationsmembran.

Auch auf diesen zweiten Teil der Vorversuche kann im Routinebetrieb verzichtet werden.

3.4.3.3 Versuchsteil 3: „Mit Kammer, mit Membran“

Mit dem dritten Versuchsteil beginnt die eigentliche Messung. Alle nun aufgenommenen Kurven und erhaltenen Daten werden, im Gegensatz zu den vorher geschilderten Vorversuchen, zur Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung zwingend benötigt.

Nach den Vorversuchen bzw. zu Beginn einer Messung wird die Zelle, wie in Abbildung 14 (3.1.5) zu sehen ist, zusammengebaut. Die Zelle wird zunächst mit Pufferlösung gefüllt und anschließend der Rührer, die Filterunterstützung, die Ultrafiltrationsmembran und der Dichtring eingesetzt. Danach setzt man das Oberteil auf und fixiert die Zelle im dafür vorgesehenen Gestell. Beim Einbau ist wie üblich darauf zu achten, dass die Zelle dicht verschlossen wird und blasenfrei mit Puffer befüllt ist. Ist die Zelle korrekt zusammengebaut, kann der eigentliche Versuch starten.

Auch hier wird zuerst Wirkstofflösung und im Anschluss daran Pufferlösung zum Spülen durch die Anlage gepumpt. Hieraus ergeben sich dann die Kurven 5 und 6, die in Abbildung 23 und 14 zu sehen sind. Beide Kurven werden, wie schon erwähnt, zur Auswertung herangezogen.

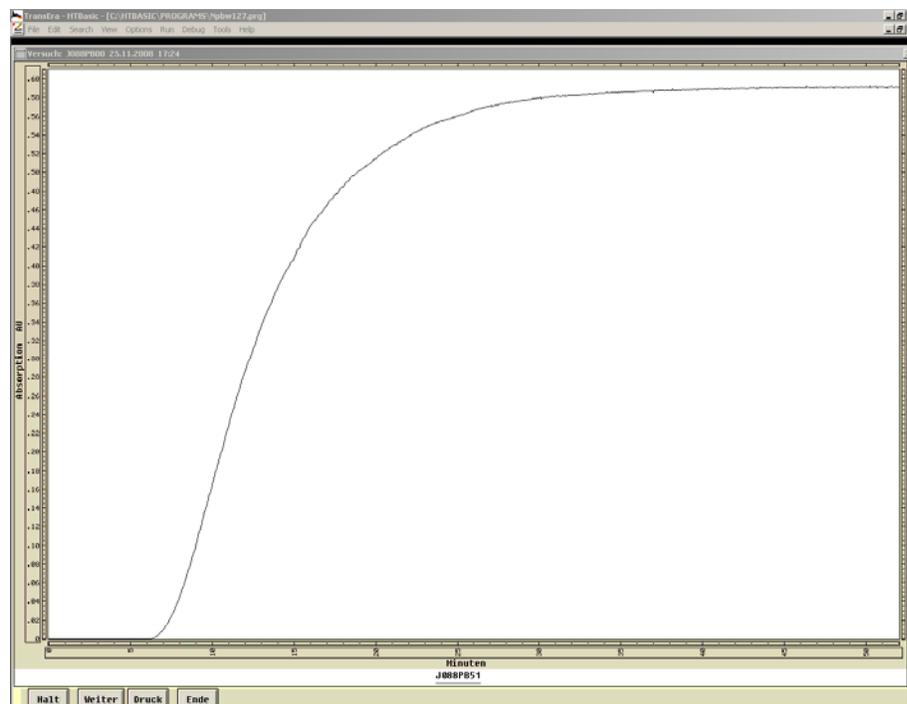


Abbildung 23: Wirkstoffkurve (Kurve 5) aus Versuchsteil 3

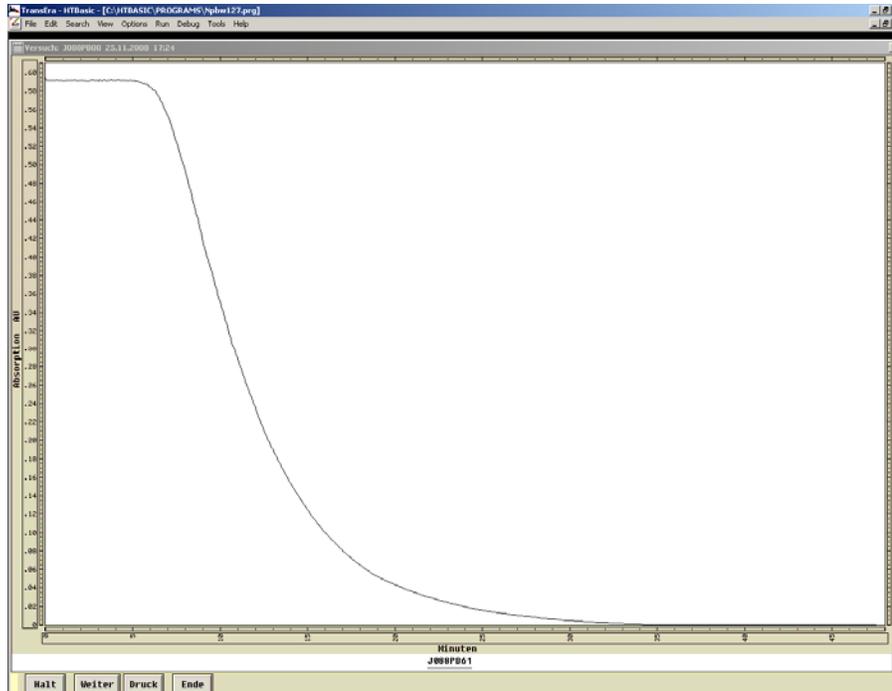


Abbildung 24: Spülkurve (Kurve 6) aus Versuchsteil 3

Des Weiteren kann, ähnlich wie in 3.4.3.2 beschrieben, ein Vergleich von Kurve 5 und Kurve 3 Aufschluss auf das Adsorptionsverhalten des Wirkstoffs an die Ultrafiltrationsmembran geben. Ein unterschiedlich starkes Ansteigen der Absorptionskurven wäre wiederum ein Hinweis auf eine stärkere Adsorption des Arzneistoffs, was grundsätzlich unerwünscht ist. Da sich die verwendeten Ultrafiltrationsmembranen durch ein sehr geringes Adsorptionsvermögen auszeichnen, bleiben solche Effekte normalerweise aus.

3.4.3.4 Versuchsteil 4: Proteininjektion

Wenn die Spülkurve wieder den Nullpunkt erreicht hat, hält die Anlage die Messung automatisch an und fragt nach der Proteininjektion. Sollte die Anlage schon vor Ablauf der vorgegebenen Zeit wirkstofffrei sein, kann der Spülvorgang zur Zeitersparnis auch manuell beendet werden. Das verwendete Protein wird in die Injektionsschleife injiziert und der Schalter am Injektionsventil auf „Inject“ umgelegt. Anschließend bestätigt man die Aufforderung des Programms und die

Messung läuft weiter. Das Plasmaprotein wird nun mit Pufferlösung aus der Injektionsschleife in die Ultrafiltrationszelle gespült und dort dank der Ultrafiltrationsmembran festgehalten. Innerhalb dieses Spülschrittes werden Bruchstücke des Albumins, die die Trenngrenze der Ultrafiltrationsmembran passieren können, aus dem System entfernt und erzeugen entsprechend ein Signal am UV-Detektor (Kurve 7, Abbildung 25). Vor Ende des Spülschrittes muss das Injektionsventil wieder in die ursprüngliche Position geschaltet werden, denn sonst wäre das Totvolumen der Anlage in den folgenden Versuchsschritten um das Volumen der Injektionsschleifen vergrößert.

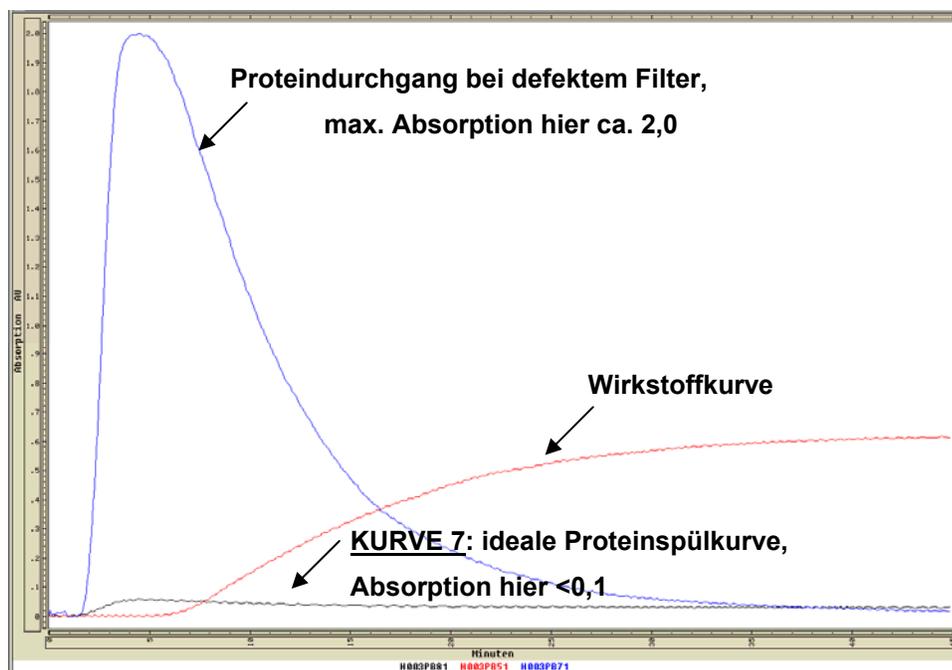


Abbildung 25: Proteinspülkurven bei defektem und intaktem Filter

An dieser Stelle des Versuches lässt sich erkennen, ob die Membran verwendbar oder beschädigt ist. Ein Schaden an der Membran würde unweigerlich zu einem stark erhöhten Proteindurchgang führen (Abbildung 25). Zunehmender Verschleiß der Membran kann auch an einem stetig größer werdenden Proteinsignal erkannt werden. In solchen Fällen muss die Membran erneuert werden.

3.4.3.5 Versuchsteil 5: „Mit Kammer, mit Protein“

Im letzten Teil eines Versuches wird nun erneut zuerst Wirkstoff- und anschließend Pufferlösung durch das System gepumpt. Man erhält so die letzten beiden Kurven 8 und 9. Da sich nun Albumin in der Ultrafiltrationszelle befindet, kann der Wirkstoff mit dem Protein interagieren, wodurch sich der Anstieg der Elutionskurve 8 im Vergleich zur Kurve 5 verzögert (s. Abbildung 26). Die Fläche zwischen diesen beiden Kurven entspricht dem Ausmaß der Proteinbindung des verwendeten Arzneistoffs.

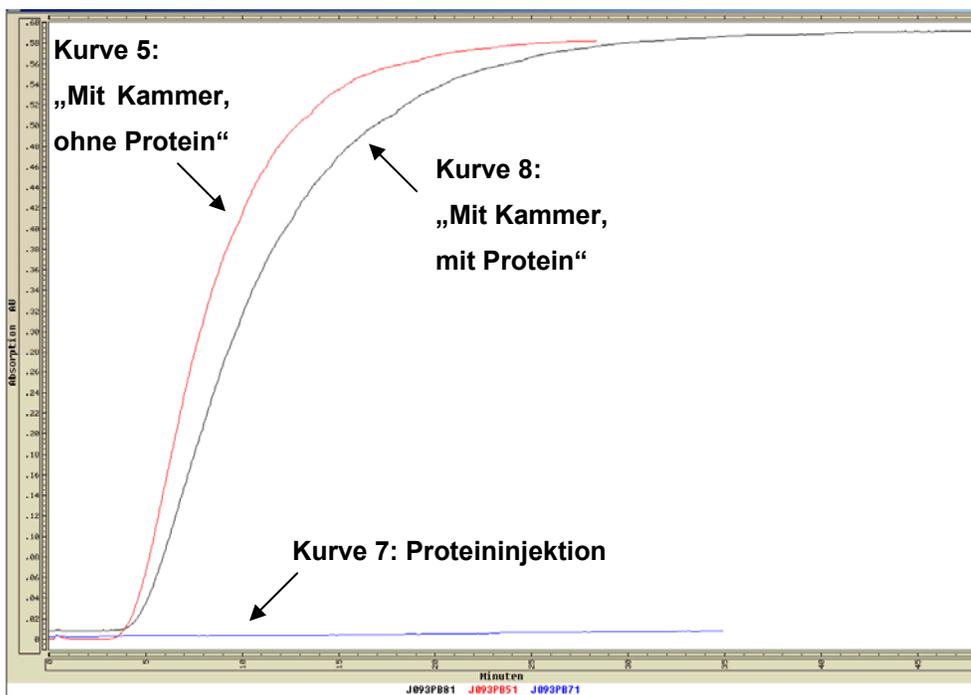


Abbildung 26: Abbildung der zur Auswertung benötigten Originalkurven eines Versuches. Während der Auswertung werden die gemessenen Kurven noch so normiert, dass die Kurvenstartpunkte auf der selben Höhe liegen.

3.5 Auswertung der Versuche

Vor der Datenauswertung müssen die erhaltenen Datensätze zunächst mit dem Programm *NPBUW03* konvertiert werden, damit sie letztendlich vom Auswerteprogramm *NPBW127* verwertet werden können. Beide Programme laufen unabhängig von der Messsoftware und sind ursprünglich von *Nickel* erstellt worden.

3.5.1 Berechnung der Titrationskurven

Nur der freie, ungebundene Anteil der Wirkstofflösung kann durch den Detektor erfasst werden. Dementsprechend entspricht der restliche Anteil der Menge an Arzneistoff, die vom Protein gebunden wurde. Durch die aus den Messungen erhaltenen Daten ist es nun möglich für jeden Moment des Versuchs zu ermitteln, wie viel Substanz sich innerhalb, beziehungsweise außerhalb, der Ultrafiltrationszelle befindet. Die Menge an Arzneistoff, die im Laufe des Versuchs durch die Anlage gepumpt wurde, ergibt sich hierbei aus dem bekannten Fluss und der vorab in die Software eingegebenen Konzentration der Wirkstofflösung. Der freie Arzneistoffanteil kann aus den Daten der Elutionskurve entnommen werden. Die Differenz entspricht folglich dem Anteil an Wirkstoff, der sich zu dem jeweiligen Zeitpunkt in der Zelle befand.

Aus diesen errechneten Daten lässt sich nun eine experimentelle Titrationskurve errechnen. Hierfür wird der negative dekadische Logarithmus der freien Wirkstoffkonzentration gegen das molare Wirkstoff-Protein-Verhältnis innerhalb der Messzelle aufgetragen. Die so erhaltene Titrationskurve wird anschließend als Vergleichskurve zur Bestimmung der Bindungskonstanten verwendet.

Die theoretischen Titrationskurven werden auf Basis der berechneten Bindungskonstanten (3.5.2) ermittelt. Die erhaltenen Werte werden in Analogie zu den experimentellen Titrationskurven aufgetragen. Abbildung 27 zeigt die Darstellung im Auswertungsprotokoll. Spiegeln die errechneten

Bindungskonstanten die experimentellen Verhältnisse korrekt wider, sollte eine möglichst gute Übereinstimmung zwischen experimenteller und theoretischer Titrationskurve erhalten werden.

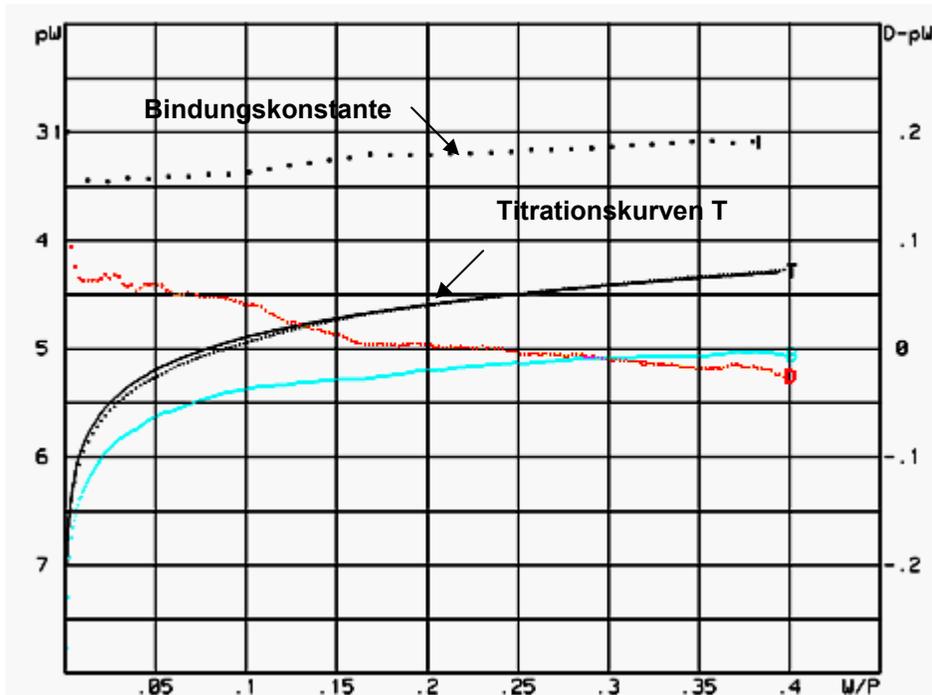


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Titrationskurven im Auswertungsprotokoll: Kurve T: Titrationskurve $pW = -\log(C_F)$, freier Wirkstoff, gepunktet = experimentell, durchgezogene Kurve = berechnet; Kurve B (hellblau): $pW = -\log(C_B)$, gebundener Wirkstoff; Kurve D (gelb): Differenzkurve $T(\text{berechnet}) - T(\text{experimentell})$

3.5.2 Iterative Berechnung der Bindungskonstanten

Zu Beginn der Berechnung der Bindungskonstanten wird die minimale Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen ermittelt. Dazu wird das molare Verhältnis von gebundenem Wirkstoff zu Protein am Ende des Versuchs berechnet. Da normalerweise nicht alle Bindungsstellen zu 100% besetzt sind, wird davon ausgegangen, dass entsprechend mehr Bindungsstellen vorhanden sind, als das errechnete Verhältnis angibt. Für den ersten Rechenansatz wird daher die doppelte Anzahl an Bindungsstellen angenommen.

Für die Bindungskonstanten werden zunächst Extremwerte vorausgesetzt. Aus diesen Extremwerten wird im Anschluss die Gesamtmenge an Wirkstoff berechnet, die sich demnach in der Ultrafiltrationszelle befinden müsste. Die erhaltenen Werte werden nun mit der Menge verglichen, die sich aus der gemessenen Spülkurve ergibt. Üblicherweise erhält man so in den ersten Berechnungen zu hohe Werte. Deshalb wird die Bindungskonstante für die nächste Berechnung verkleinert und die Berechnung von neuem gestartet. Mit allen übrigen Bindungskonstanten wird analog verfahren.

Die beschriebene Berechnung erfolgt jeweils über einen größeren Abschnitt der experimentellen Titrationskurve. Hierbei wird als Bindungskonstante k immer ein Mittelwert aus mehreren Bindungskonstanten betrachtet, die an unterschiedlichen Punkten der Kurve berechnet werden. Da hier Konstanten berechnet werden, müssten am Ende der Berechnung idealerweise für jeden Punkt der Kurve die gleichen Bindungskonstanten erhalten werden. Da dies in der Praxis üblicherweise nicht der Fall ist, wird die Iteration dann standardmäßig abgebrochen, wenn die gewichtete Summe der Standardabweichungen ein Minimum erreicht hat.

Ist die Abbruchbedingung erfüllt und sind somit alle Bindungskonstanten k berechnet, startet der nächste Iterationsansatz mit einer angenommenen Bindungsstelle weniger als im Modell zuvor. Das Verfahren wird solange fortgesetzt, bis die Mindestanzahl der Bindungsstellen erreicht ist. Das Rechenmodell, das die kleinste Standardabweichung der pK -Einzelwerte ergeben hat, wird als am zuverlässigsten betrachtet und zur Auswertung verwendet.

Der Berechnung der Bindungskonstanten k liegen zwei unterschiedliche Bindungsmodelle zugrunde. Im Allgemeinen wird angenommen, dass sich die einzelnen Bindungsstellen nicht gegenseitig beeinflussen. Die resultierenden Bindungsparameter sind somit völlig unabhängig voneinander. Zum anderen wird davon ausgegangen, dass die Stärke der Bindung an eine bestimmte Stelle davon beeinflusst wird, ob an einer anderen Stelle eine Bindung stattfindet. Die entsprechenden Bindungskonstanten k sind also voneinander abhängig. Die Ergebnisse beider Bindungsmodelle werden im Versuchsprotokoll angegeben.

3.5.3 Scatchard-Plot

Der Scatchard-Plot^[37] ist eine allgemein anerkannte, graphische Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten. Mit ihm können die iterativ berechneten Bindungskonstanten überprüft werden, wodurch die Richtigkeit der Iteration zusätzlich belegt wird.

Beim Scatchard-Plot wird der Quotient aus spezifischem Bindungsvermögen und der molaren Konzentration an freiem Wirkstoff gegen das spezifische Bindungsvermögen aufgetragen. Das spezifische Bindungsvermögen entspricht hierbei dem Quotient aus molarer Konzentration des gebundenen Wirkstoff und molarer Gesamtkonzentration des Proteins. Durch Extrapolation des linearen Kurvenabschnittes auf die Abszisse kann so in guter Näherung ein Wert für die erste Bindungskonstante erhalten werden, der mit den berechneten Werten verglichen werden kann.

3.5.4 Auswertungsprotokoll

Auf der ersten Seite des Auswertungsprotokolls findet sich nochmals eine Übersicht über alle vorab eingegebenen Versuchsdaten und Einstellungen. Auf den weiteren Seiten folgen die Abbildung der aufgenommenen Kurven, die berechneten Bindungskonstanten und die schon erwähnten graphischen Darstellungen der Titrationskurven (s. 3.5.1, Abbildung 27) und des Scatchard-Plot. Zusätzlich sind weitere graphische Darstellungen der Ergebnisse enthalten.

4 ERGEBNISSE

4.1 Proteinbindung der Sartane

4.1.1 Allgemeines

Sartane sind Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, die im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System selektiv den AT_1 -Rezeptor blockieren und so eine Blutdrucksenkung bewirken.^[127] Da Sartane das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) nicht blockieren, und Bradykinin somit normal abgebaut werden kann, bleiben die typischen Nebenwirkungen der ACE-Hemmer in der Regel aus.

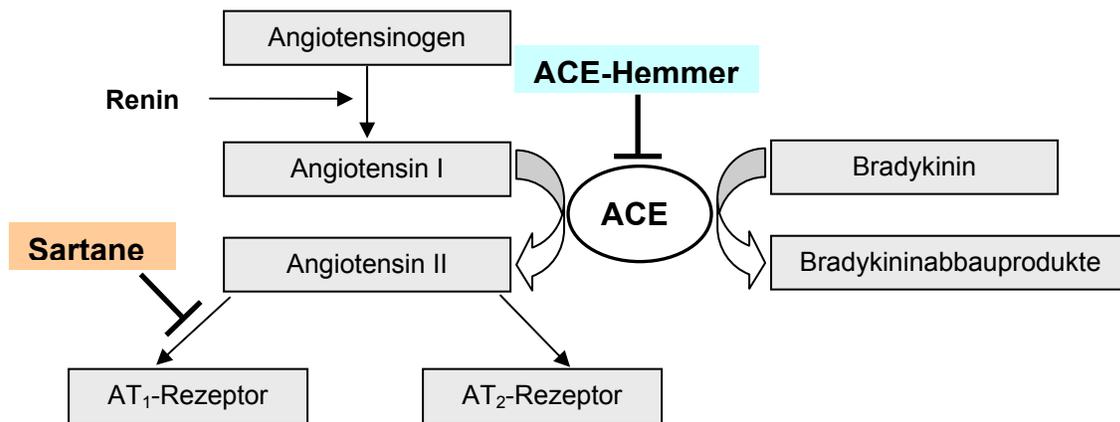


Abbildung 28: Angriffspunkte von Sartanen und ACE-Hemmern

Im Folgenden wurde das Ausmaß der Proteinbindung der Sartane mit bovinem und humanem Serumalbumin bestimmt. Um zu zeigen, dass Messungen mit Plasma an der vorhandenen Messanlage durchgeführt werden können, wurden alle Stoffe zusätzlich erstmals mit humanem Plasma vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden im Anschluss mit Werten aus der Literatur verglichen. Alle angegebenen Proteinbindungen beziehen sich auf ein Wirkstoff-Protein-Verhältnis von 0,001.

4.1.2 Candesartan

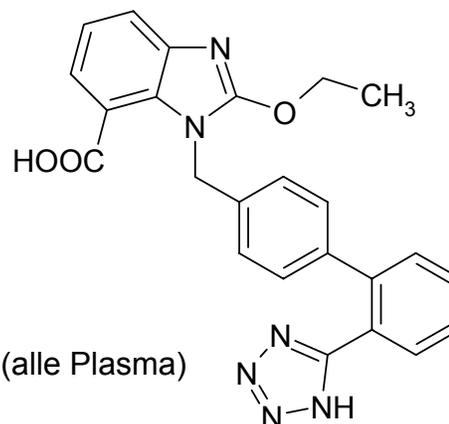
Summenformel: C₂₄H₂₀N₆O₃

Molare Masse: 440,5 g/mol

Messwellenlänge: 250 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 15-20 mg/l

Literaturwerte: 99,5%^[128], 99,7%^[129], > 99%^[130] (alle Plasma)



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 98.6 | 4.78 | 4.60 | 4.32 | 98.1 | 4.93 | 4.75 | --- |
| 2 | 98.6 | 4.74 | 4.56 | 4.38 | 98.0 | 4.92 | 4.75 | --- |
| 3 | 98.4 | 4.86 | 4.50 | 2.09 | 98.3 | 4.98 | 4.25 | --- |
| 4 | 99.2 | 5.14 | 4.89 | 3.71 | 99.0 | 5.21 | 4.91 | --- |
| 5 | 99.1 | 5.04 | 4.87 | 3.94 | 98.8 | 5.14 | 4.93 | --- |
| 6 | 99.2 | 5.18 | 4.78 | --- | 99.1 | 5.27 | 4.70 | --- |
| Mittelwert | 98.9 | 4.96 | 4.70 | 3.69 | 98.5 | 5.07 | 4.71 | --- |
| sdv | 0.4 | 0.19 | 0.17 | 0.94 | 0.5 | 0.15 | 0.25 | --- |
| rel sdv [%] | 0.4 | 3.81 | 3.58 | 25.40 | 0.5 | 2.96 | 5.20 | --- |

Messungen mit humanem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 99.6 | 5.60 | 4.54 | --- | 99.6 | 5.63 | 4.50 | --- |
| 2 | 99.6 | 5.60 | 4.69 | --- | 99.6 | 5.66 | 4.61 | --- |
| 3 | 99.0 | 5.21 | 3.76 | --- | 99.0 | 5.23 | 3.73 | --- |
| 4 | 99.4 | 5.46 | 3.98 | --- | 99.4 | 5.47 | 4.00 | --- |
| 5 | 99.1 | 5.26 | 3.93 | --- | 99.2 | 5.29 | 3.88 | --- |
| 6 | 99.3 | 5.38 | 4.12 | --- | 99.3 | 5.39 | 4.13 | --- |
| Mittelwert | 99.4 | 5.42 | 4.17 | --- | 99.4 | 5.44 | 4.14 | --- |
| sdv | 0.2 | 0.17 | 0.37 | --- | 0.2 | 0.18 | 0.35 | --- |
| rel sdv [%] | 0.3 | 3.05 | 8.79 | --- | 0.2 | 3.25 | 8.43 | --- |

Messungen mit humanem Plasma:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 99.8 | 5.77 | 5.01 | 3.51 | 99.8 | 5.88 | 4.91 | 3.61 |
| 2 | 99.8 | 5.87 | 5.03 | 3.74 | 99.8 | 5.93 | 4.99 | 3.74 |
| 3 | 99.6 | 5.57 | 4.98 | --- | 99.6 | 5.75 | 4.84 | --- |
| Mittelwert | 99.7 | 5.74 | 5.01 | --- | 99.7 | 5.85 | 4.91 | --- |
| sdv | 0.1 | 0.15 | 0.03 | --- | 0.1 | 0.09 | 0.08 | --- |
| rel sdv [%] | 0.1 | 2.66 | 0.50 | --- | 0.1 | 1.59 | 1.53 | --- |

4.1.4 Irbesartan

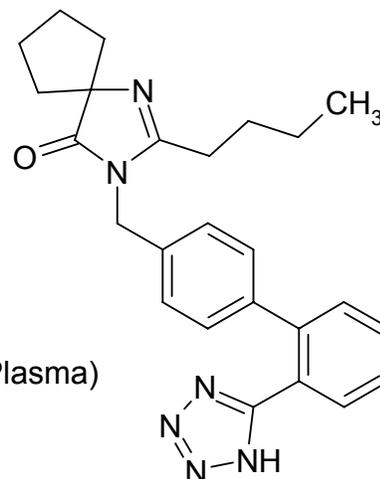
Summenformel: C₂₅H₂₈N₆O

Molare Masse: 428,5 g/mol

Messwellenlänge: 248 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 18-20 mg/l

Literaturwerte: 90%^[128], 99,5%^[129], 96%^[132], (alle Plasma)



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 95,6 | 4,18 | 4,00 | 3,82 | 3,65 | 94,8 | 4,48 | 4,22 | 3,77 |
| 2 | 95,7 | 4,33 | 4,04 | 3,70 | --- | 94,9 | 4,49 | 4,10 | 3,76 |
| 3 | 95,0 | 4,12 | 3,95 | 3,77 | 3,59 | 94,7 | 4,47 | 4,09 | 3,79 |
| 4 | 96,9 | 4,60 | 3,95 | 3,37 | 2,96 | 96,4 | 4,65 | 4,09 | 3,31 |
| 5 | 94,2 | 4,20 | 3,89 | 3,51 | --- | 92,7 | 4,32 | 3,99 | 3,81 |
| Mittelwert | 95,5 | 4,29 | 3,96 | 3,63 | 3,40 | 94,7 | 4,48 | 4,10 | 3,69 |
| sdv | 1,0 | 0,19 | 0,06 | 0,19 | 0,38 | 1,3 | 0,12 | 0,08 | 0,21 |
| rel sdv [%] | 1,1 | 4,48 | 1,46 | 5,25 | 11,18 | 1,4 | 2,62 | 2,00 | 5,80 |

Messungen mit humanem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 96,8 | 4,35 | 4,17 | 3,99 | 3,47 | 95,6 | 4,56 | 4,37 | 4,04 |
| 2 | 95,9 | 4,21 | 4,04 | 3,86 | 3,68 | 95,5 | 4,55 | 4,37 | 3,95 |
| 3 | 96,8 | 4,58 | 3,91 | 3,54 | --- | 96,7 | 4,70 | 3,95 | 3,67 |
| 4 | 95,5 | 4,36 | 3,86 | 3,53 | 3,17 | 95,2 | 4,52 | 3,99 | 3,47 |
| 5 | 96,8 | 4,54 | 4,10 | 3,52 | --- | 96,3 | 4,64 | 4,22 | --- |
| Mittelwert | 96,4 | 4,41 | 4,02 | 3,69 | 3,44 | 95,9 | 4,59 | 4,18 | 3,78 |
| sdv | 0,6 | 0,15 | 0,13 | 0,22 | 0,26 | 0,6 | 0,07 | 0,20 | 0,26 |
| rel sdv [%] | 0,7 | 3,46 | 3,25 | 6,02 | 7,48 | 0,7 | 1,56 | 4,80 | 6,86 |

Messungen mit humanem Plasma:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 92,7 | 4,24 | 3,61 | --- | 91,4 | 4,25 | 3,85 | --- |
| 2 | 93,8 | 4,20 | 3,78 | 3,49 | 93,3 | 4,37 | 3,86 | 3,68 |
| 3 | 95,1 | 4,34 | 3,79 | 3,60 | 95,2 | 4,52 | 3,87 | 3,54 |
| Mittelwert | 93,9 | 4,26 | 3,73 | 3,54 | 93,3 | 4,38 | 3,86 | 3,61 |
| sdv | 1,2 | 0,07 | 0,11 | 0,08 | 1,9 | 0,14 | 0,01 | 0,10 |
| rel sdv [%] | 1,2 | 1,68 | 2,84 | 2,15 | 2,0 | 3,12 | 0,23 | 2,84 |

4.1.5 Telmisartan

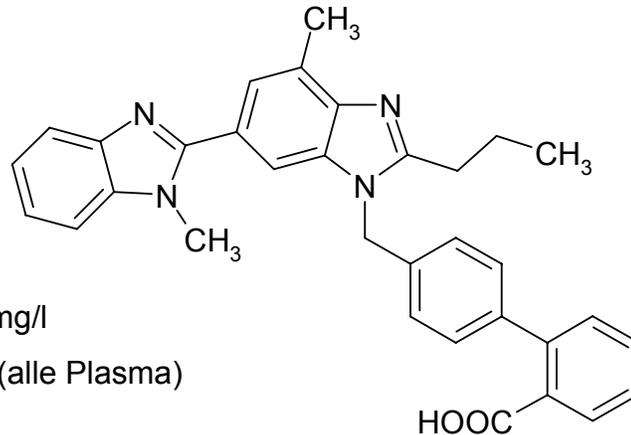
Summenformel: C₃₃H₃₀N₄O₂

Molare Masse: 514,6 g/mol

Messwellenlänge: 295 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 18-20 mg/l

Literaturwerte: > 99%^[128], > 99%^[133] (alle Plasma)



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 97.2 | 4.64 | 4.01 | 3.55 | 97.3 | 4.78 | 3.99 | 3.65 |
| 2 | 97.3 | 4.63 | 4.09 | 3.78 | 97.4 | 4.79 | 4.20 | --- |
| 3 | 98.0 | 4.78 | 4.29 | --- | 97.5 | 4.82 | 4.32 | --- |
| 4 | 97.7 | 4.72 | 4.27 | --- | 97.4 | 4.80 | 4.24 | --- |
| 5 | 97.4 | 4.63 | 4.19 | 3.70 | 97.4 | 4.79 | 4.24 | --- |
| 6 | 97.8 | 4.68 | 4.27 | 3.86 | 97.6 | 4.82 | 4.35 | 3.55 |
| Mittelwert | 97.6 | 4.68 | 4.19 | 3.72 | 97.4 | 4.80 | 4.22 | 3.65 |
| sdv | 0.3 | 0.06 | 0.11 | 0.13 | 0.1 | 0.02 | 0.13 | 0.07 |
| rel sdv [%] | 0.3 | 1.31 | 2.68 | 3.58 | 0.1 | 0.35 | 3.06 | 1.82 |

Messungen mit humanem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 98.9 | 4.99 | 4.69 | --- | 98.8 | 5.12 | 4.57 | --- |
| 2 | 98.8 | 4.99 | 4.56 | --- | 98.7 | 5.09 | 4.47 | --- |
| 3 | 98.9 | 4.98 | 4.71 | --- | 98.6 | 5.08 | 4.64 | --- |
| 4 | 99.0 | 5.08 | 4.62 | 3.74 | 98.8 | 5.15 | 4.68 | --- |
| 5 | 99.0 | 5.03 | 4.73 | --- | 98.9 | 5.16 | 4.60 | --- |
| Mittelwert | 98.9 | 5.01 | 4.66 | 3.74 | 98.7 | 5.12 | 4.59 | --- |
| sdv | 0.1 | 0.04 | 0.07 | --- | 0.1 | 0.04 | 0.08 | --- |
| rel sdv [%] | 0.1 | 0.81 | 1.52 | --- | 0.1 | 0.70 | 1.75 | --- |

Messungen mit humanem Plasma:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 98.3 | 4.95 | 3.75 | --- | 98.1 | 4.94 | 3.84 | --- |
| 2 | 98.4 | 4.86 | 4.48 | --- | 98.2 | 4.96 | 4.41 | --- |
| 3 | 98.1 | 4.93 | --- | --- | 97.9 | 4.89 | --- | --- |
| Mittelwert | 98.3 | 4.91 | 4.12 | --- | 98.1 | 4.93 | 4.12 | --- |
| sdv | 0.2 | 0.05 | 0.52 | --- | 0.2 | 0.04 | 0.40 | --- |
| rel sdv [%] | 0.2 | 0.95 | 12.58 | --- | 0.2 | 0.73 | 9.76 | --- |

4.1.6 Valsartan

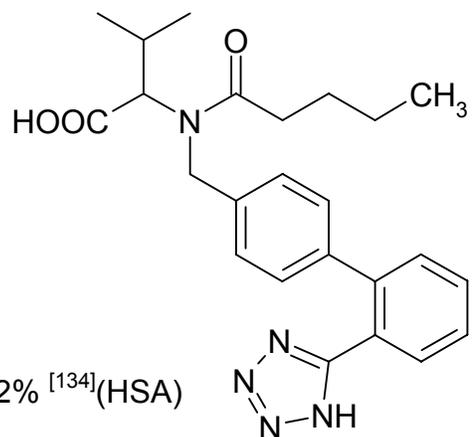
Summenformel: C₂₄H₂₉N₅O₃

Molare Masse: 435,5 g/mol

Messwellenlänge: 250 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 15-20 mg/l

Literaturwerte: 94-97% ^[128], 94% ^[134] (Plasma), 92% ^[134] (HSA)



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 99.0 | 5.16 | 4.40 | --- | 99.0 | 5.20 | 4.34 | 3.58 |
| 2 | 98.9 | 5.06 | 4.50 | --- | 98.9 | 5.18 | 4.38 | --- |
| 3 | 98.8 | 5.02 | 4.52 | --- | 98.7 | 5.09 | 4.47 | --- |
| 4 | 99.7 | 5.70 | --- | --- | 99.3 | 5.37 | 4.30 | 3.90 |
| 5 | 97.5 | 4.70 | 4.18 | --- | 97.4 | 4.80 | 4.03 | 3.79 |
| 6 | 98.5 | 4.95 | 4.28 | 3.44 | 98.3 | 5.00 | 4.30 | 3.38 |
| Mittelwert | 98.7 | 5.10 | 4.38 | 3.44 | 98.6 | 5.10 | 4.30 | 3.67 |
| sdv | 0.7 | 0.33 | 0.14 | --- | 0.7 | 0.20 | 0.15 | 0.23 |
| rel sdv [%] | 0.7 | 6.57 | 3.29 | --- | 0.7 | 3.84 | 3.47 | 6.36 |

Messungen mit humanem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 99.4 | 5.32 | 4.64 | --- | 99.3 | 5.48 | 4.51 | --- |
| 2 | 99.5 | 5.48 | 4.56 | --- | 99.5 | 5.51 | --- | --- |
| 3 | 99.4 | 5.34 | 4.65 | --- | 99.4 | 5.42 | 4.58 | --- |
| 4 | 97.3 | 4.73 | 3.77 | --- | 97.5 | 4.81 | --- | --- |
| 5 | 98.7 | 5.03 | 4.32 | --- | 98.7 | 5.11 | 4.13 | --- |
| Mittelwert | 98.9 | 5.18 | 4.39 | --- | 98.9 | 5.26 | 4.40 | --- |
| sdv | 0.9 | 0.30 | 0.37 | --- | 0.8 | 0.30 | 0.24 | --- |
| rel sdv [%] | 1.0 | 5.80 | 8.43 | --- | 0.9 | 5.70 | 5.52 | --- |

Messungen mit humanem Plasma:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 98.9 | 5.16 | 3.62 | --- | 98.9 | 5.17 | 3.54 | --- |
| 2 | 99.1 | 5.25 | 3.51 | --- | 99.1 | 5.25 | 3.48 | --- |
| 3 | 99.0 | 5.19 | 3.43 | --- | 99.0 | 5.20 | 3.46 | --- |
| Mittelwert | 99.0 | 5.20 | 3.52 | --- | 99.0 | 5.21 | 3.49 | --- |
| sdv | 0.1 | 0.05 | 0.10 | --- | 0.1 | 0.04 | 0.04 | --- |
| rel sdv [%] | 0.1 | 0.87 | 2.76 | --- | 0.1 | 0.71 | 1.20 | --- |

4.1.7 Diskussion

In Tabelle 4 sind die Mittelwerte der Proteinbindungsbestimmung der Sartane zusammengefasst. Die angegebenen Werte entsprechen den Ergebnissen aus dem unabhängigen Bindungsmodell.

Tabelle 4: Mittelwerte der Proteinbindungsbestimmung der Sartane

| Arzneistoff | Proteinbindung | | | |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| | BSA | HSA | Plasma | Literatur |
| Candesartan | 98.9 % ± 0.4 | 99.4 % ± 0.2 | 99.7 % ± 0.1 | 99.5 % ^[128] , 99.7 % ^[129] > 99 % ^[130] (Plasma) |
| Eprosartan-Mesylat | 95.9 % ± 0.4 | 97.2 % ± 0.5 | 95.8 % ± 1.4 | 98 % ^[128] , 98,6 % ^[131] (Plasma) |
| Irbesartan | 95.5 % ± 1.0 | 96.4 % ± 0.6 | 93.9 % ± 1.2 | 90,0 % ^[128] , 99,5 % ^[129] 96,0 % ^[132] (Plasma) |
| Telmisartan | 97.6 % ± 0.3 | 98.9 % ± 0.1 | 98.3 % ± 0.2 | > 99 % ^[128] > 99 % ^[133] (Plasma) |
| Valsartan | 98.7 % ± 0.7 | 98.9 % ± 0.9 | 99.0 % ± 0.1 | 94 % ± 2% ^[134] (Plasma) 92 % ± 5% ^[134] (HSA) |

Der Vergleich der Messergebnisse mit den Werten aus der Literatur, die mittels Ultrafiltration und Gleichgewichtsdialyse erhalten wurden, zeigt bei allen Wirkstoffen eine relativ gute Übereinstimmung. Einzig bei Valsartan konnten höhere Proteinbindungswerte und wesentlich kleinere Standardabweichungen als in der Literatur gefunden werden. Solche Abweichungen von den Literaturwerten können beispielsweise durch die jeweils verwendete Methode bedingt sein. Wie in den Arbeiten von Oehlmann^[124] und Heinze^[122] schon beschrieben wurde, können sich vor allem durch das verwendete Protein Unterschiede innerhalb der gemessenen Proteinbindung ergeben. Wie die Literaturangaben zu Valsartan zeigen, können die Ergebnisse allerdings auch durch verschiedenen Chargen des gleichen Proteins variieren.^[134] Im Fall der Sartane sind hier nur geringfügige

Unterschiede zu erkennen, dennoch sind die Werte, die bei den Messungen mit BSA erhalten wurden, tendenziell etwas niedriger als die Literaturwerte. Unabhängig von der Wahl des Proteins liegen die gemessenen Werte in vergleichbaren Bereichen.

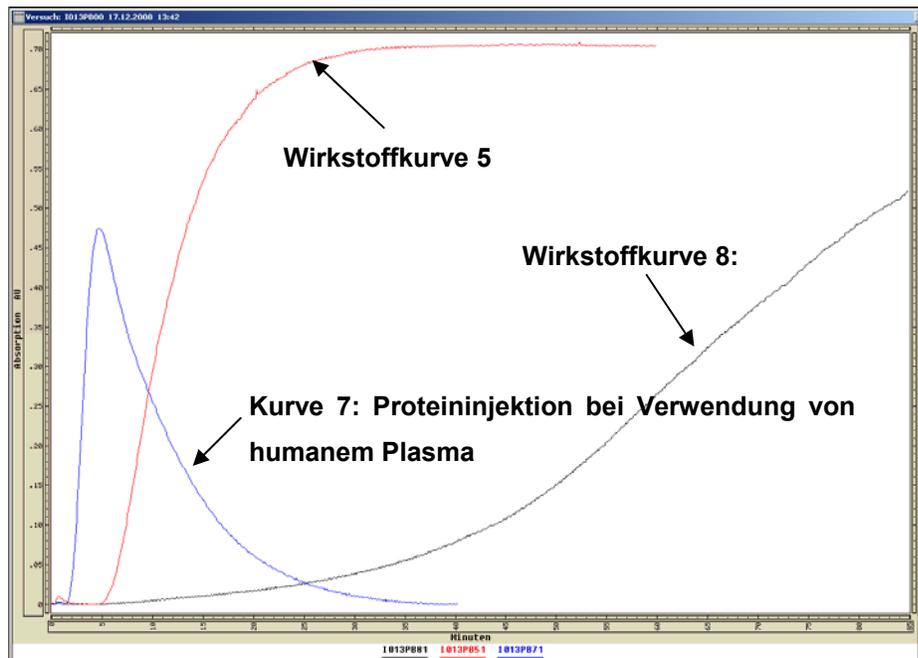


Abbildung 29: Stark erhöhte Proteinkurve bei Messungen mit humanem Plasma

Wie in 4.1.1 erwähnt, wurden innerhalb dieser Versuchsreihe erstmals Messungen mit humanem Plasma durchgeführt. Die Messungen erwiesen sich im Allgemeinen als unproblematisch. Nach ersten Versuchen wurde allerdings festgestellt, dass das Plasma dazu tendiert, die Ultrafiltrationsmembranen zu verstopfen, was einen Druckanstieg an der HPLC-Pumpe bzw. im System zur Folge hatte. Außerdem war dadurch die Wiederverwendbarkeit der Membranen nicht mehr gewährleistet. Um diesem Problem zu begegnen, wurde das Plasma nach dem Auftauen mit einem $0,22\mu\text{m}$ Spritzenfilter filtriert. Nach der Filtration waren die Messungen normal durchführbar, ein Druckanstieg an der Pumpe und Unregelmäßigkeiten innerhalb der Messungen waren nicht mehr festzustellen. Ein weiterer Unterschied gegenüber Messungen mit HSA oder BSA bestand darin, dass die Proteinkurve einen starken Anstieg zeigte (Abbildung 29). Dies lag an den niedermolekularen Bestandteilen im Blutplasma, die die Membran ungehindert passieren konnten,

und somit ein Signal am Detektor erzeugten. Die für die Proteinbindung relevanten Plasmaproteine wurden allerdings in der Zelle zurückgehalten. Die Ergebnisse aus den Messungen zeigen, dass Versuche mit humanem Blutplasma an der verwendeten Anlage durchführbar sind. Auch der Vergleich mit Literaturdaten liefert gute Übereinstimmungen.

4.2 Proteinbindung der Naphthylisochinoline

4.2.1 Allgemeines

Naphthylisochinolin-Alkaloide sind Sekundärmetabolite, die in tropischen Lianen der Familien Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae zu finden sind. Ausgeprägte Bioaktivitäten gegen Erreger tropischer Infektionskrankheiten, wie zum Beispiel Leishmanien, Plasmodien und Trypanosomen, machen diese Naturstoffe zu einem interessanten Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten. So zeigen zum Beispiel Dioncophyllin C und Dioncopeltin A (Abbildung 30) *in vitro* und *in vivo* Aktivität gegen die Malariaerreger *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium berghei*.^[135,136]

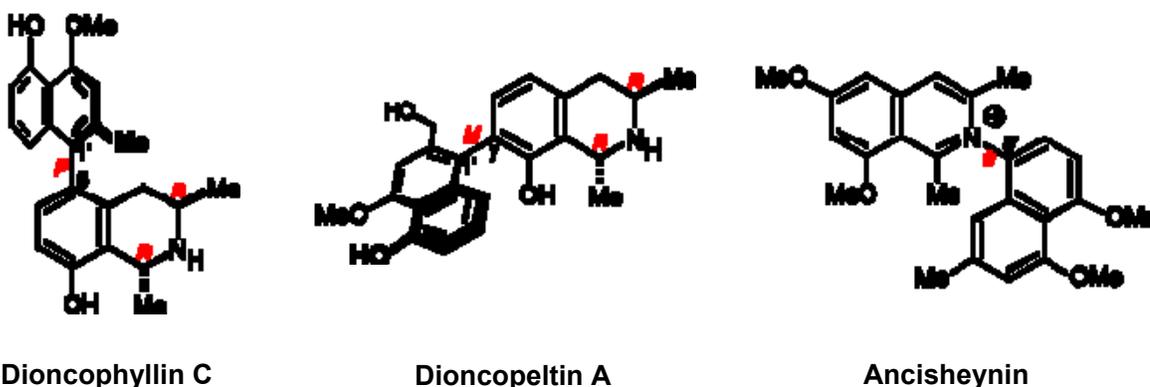


Abbildung 30: Beispiele verschiedener Naphthylisochinolin-Alkaloide: die antimalaria-aktiven Substanzen Dioncophyllin C und Dioncopeltin A, sowie das erste N,C-gekuppelte Naphthylisochinolin Ancisheyenin

Die Vielfältigkeit dieser Stoffgruppe wurde 2003 mit der Isolierung von Ancisheyenin (Abbildung 30) aus *Ancistrocladus heyneanus* in der Gruppe von Butler^[137], um die Gruppe der N,C-verknüpften Naphthylisochinoline erweitert. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Bringmann (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) wurden in den letzten Jahren viele weitere Naphthylisochinoline isoliert und neue Wege zur Synthese der Naphthylisochinoline gefunden.^[126] Viele der so synthetisierten Verbindungen wiesen in Testungen sehr gute Aktivitäten gegen die schon erwähnten Erreger auf.^[138,139,140]

Im Folgenden wurde von einer Auswahl an N,C-verknüpften Naphthylisochinolininen die Plasmaproteinbindung bestimmt. Alle gemessenen Verbindungen wurden von Gulder in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bringmann synthetisiert.^[126] Die unterschiedliche Anzahl der Einzelmessungen sowie fehlende HSA-Messungen erklären sich durch die jeweilige Verfügbarkeit der Substanz. Alle angegebenen Ergebnisse beziehen sich auf ein Wirkstoff-Protein-Verhältnis von 0,001.

4.2.2 Gemessene Substanzen

4.2.2.1 GB-AP 89

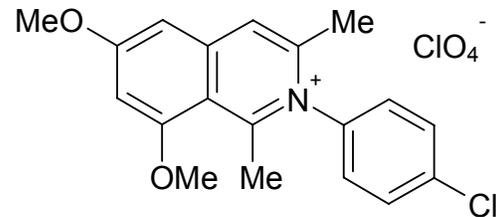
N-(4'-Chlorphenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisoquinoliniumperchlorat

Summenformel: C₁₉H₁₉NO₆Cl₂

Molare Masse: 428,3 g/mol

Messwellenlänge: 273nm

Eingesetzte Konzentrationen: 10-15mg/l



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 60.7 | 3.29 | 2.79 | 60.2 | 3.40 | --- |
| 2 | 60.2 | 3.29 | 2.74 | 60.0 | 3.40 | --- |
| 3 | 56.9 | 3.12 | 2.94 | 57.2 | 3.35 | --- |
| 4 | 56.4 | 3.33 | --- | 56.4 | 3.33 | --- |
| 5 | 71.7 | 3.63 | --- | 70.4 | 3.60 | --- |
| 6 | 71.1 | 3.61 | --- | 69.9 | 3.59 | --- |
| 7 | 62.5 | 3.44 | --- | 62.3 | 3.44 | --- |
| 8 | 63.7 | 3.47 | --- | 63.5 | 3.46 | --- |
| 9 | 64.1 | 3.47 | --- | 63.9 | 3.47 | --- |
| Mittelwert | 63.0 | 3.41 | 2.83 | 62.6 | 3.45 | --- |
| sdv | 5.4 | 0.16 | 0.11 | 5.0 | 0.09 | --- |
| rel sdv [%] | 8.6 | 4.79 | 3.72 | 7.9 | 2.73 | --- |

Messungen mit humanem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 77.7 | 3.76 | --- | 77.4 | 3.76 | --- |
| 2 | 71.3 | 3.62 | --- | 71.1 | 3.61 | --- |
| 3 | 71.4 | 3.62 | --- | 71.2 | 3.62 | --- |
| 4 | 73.4 | 3.66 | --- | 73.2 | 3.66 | --- |
| 5 | 74.0 | 3.68 | --- | 73.8 | 3.67 | --- |
| 6 | 55.5 | 3.32 | --- | 55.7 | 3.32 | --- |
| 7 | 56.1 | 3.33 | --- | 56.2 | 3.33 | --- |
| 9 | 68.2 | 3.55 | --- | 64.1 | 3.47 | --- |
| Mittelwert | 68.5 | 3.57 | --- | 67.8 | 3.55 | --- |
| sdv | 8.3 | 0.16 | --- | 8.2 | 0.16 | --- |
| rel sdv [%] | 12.1 | 4.56 | --- | 12.1 | 4.54 | --- |

4.2.2.2 GB-AP 94

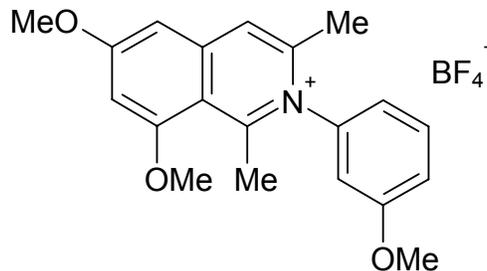
N-(3'-Methoxyphenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtetrafluoroborat

Summenformel: C₂₀H₂₂NO₃BF₄

Molare Masse: 411,2 g/mol

Messwellenlänge: 269nm

Eingesetzte Konzentrationen: 10-12mg/l



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 34.4 | 2.94 | --- | 34.7 | 2.95 | --- |
| 2 | 37.2 | 3.00 | --- | 36.7 | 2.99 | --- |
| 3 | 47.4 | 3.18 | --- | 47.5 | 3.18 | --- |
| 4 | 27.7 | 2.58 | 2.41 | 25.6 | 2.76 | --- |
| 5 | 41.8 | 2.86 | 2.68 | 39.1 | 3.03 | --- |
| 6 | 40.9 | 3.06 | --- | 40.2 | 3.05 | --- |
| 7 | 27.7 | 2.78 | 1.49 | 28.3 | 2.82 | --- |
| 8 | 28.3 | 2.70 | 2.20 | 27.0 | 2.78 | --- |
| Mittelwert | 35.7 | 2.89 | 2.20 | 34.9 | 2.94 | --- |
| sdv | 7.4 | 0.20 | 0.51 | 7.6 | 0.15 | --- |
| rel sdv [%] | 20.8 | 6.79 | 23.17 | 21.7 | 5.01 | --- |

4.2.2.3 GB-AP 101

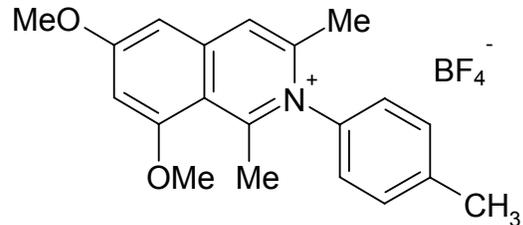
N-(4'-Tolyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtetrafluoroborat

Summenformel: C₂₀H₂₂NO₂BF₄

Molare Masse: 395,2 g/mol

Messwellenlänge: 267nm

Eingesetzte Konzentrationen: 9-12mg/l

**Messungen mit bovinem Serumalbumin:**

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 45.7 | 3.15 | --- | 45.4 | 3.14 | --- |
| 2 | 47.4 | 3.18 | --- | 48.0 | 3.19 | --- |
| 3 | 69.6 | 3.58 | --- | 68.5 | 3.56 | --- |
| 4 | 68.4 | 3.56 | --- | 68.4 | 3.56 | --- |
| 5 | 62.9 | 3.45 | --- | 62.7 | 3.45 | --- |
| 6 | 63.0 | 3.45 | --- | 62.8 | 3.45 | --- |
| 7 | 65.4 | 3.50 | --- | 54.9 | 3.31 | --- |
| 8 | 67.2 | 3.53 | --- | 55.2 | 3.31 | --- |
| Mittelwert | 61.2 | 3.43 | --- | 58.2 | 3.37 | --- |
| sdv | 9.4 | 0.17 | --- | 8.8 | 0.16 | --- |
| rel sdv [%] | 15.3 | 4.94 | --- | 15.1 | 4.71 | --- |

Messungen mit humanem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 63.7 | 3.47 | --- | 63.7 | 3.47 | --- |
| 2 | 45.0 | 3.14 | --- | 44.9 | 3.13 | --- |
| 3 | 65.6 | 3.50 | --- | 65.0 | 3.49 | --- |
| 4 | 73.2 | 3.66 | --- | 72.4 | 3.64 | --- |
| 5 | 70.9 | 3.61 | --- | 63.8 | 3.47 | --- |
| Mittelwert | 63.7 | 3.47 | --- | 62.0 | 3.44 | --- |
| sdv | 11.1 | 0.21 | --- | 10.2 | 0.19 | --- |
| rel sdv [%] | 17.5 | 5.91 | --- | 16.5 | 5.41 | --- |

4.2.2.4 GB-AP 104

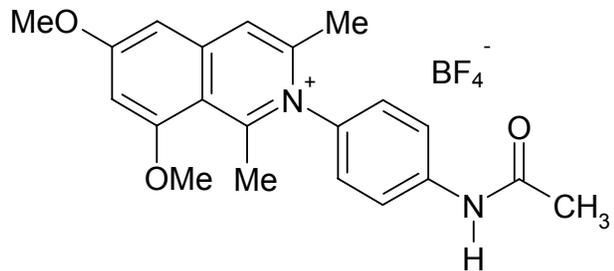
N-(4'-N'-Phenylacetamid)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtetrafluoroborat

Summenformel: C₂₁H₂₃N₂O₃BF₄

Molare Masse: 438,2 g/mol

Messwellenlänge: 272nm

Eingesetzte Konzentrationen: 10-12mg/l



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 58.7 | 3.37 | --- | 49.9 | 3.22 | --- |
| 2 | 57.4 | 3.35 | --- | 49.2 | 3.21 | --- |
| 3 | 54.2 | 3.29 | --- | 53.1 | 3.29 | --- |
| 4 | 55.5 | 3.10 | 2.92 | 53.3 | 3.28 | --- |
| Mittelwert | 56.4 | 3.28 | 2.92 | 51.3 | 3.25 | --- |
| sdv | 2.0 | 0.13 | --- | 2.1 | 0.04 | --- |
| rel sdv [%] | 3.6 | 3.87 | --- | 4.1 | 1.30 | --- |

4.2.2.5 GB-AP 107

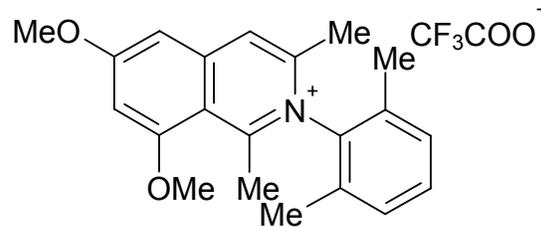
N-(2',6'-Dimethylphenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtrifluoroacetat

Summenformel: C₂₃H₂₄F₃NO₄

Molare Masse: 435,4 g/mol

Messwellenlänge: 270nm

Eingesetzte Konzentrationen: 10-12mg/l

**Messungen mit bovinem Serumalbumin:**

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ |
| 1 | 68.2 | 3.55 | --- | --- | 54.6 | 3.30 |
| 2 | 66.6 | 3.52 | --- | --- | 55.0 | 3.31 |
| 3 | 39.8 | 2.82 | 2.64 | --- | 36.3 | 2.98 |
| 4 | 40.5 | 2.83 | 2.66 | --- | 37.2 | 2.99 |
| 5 | 43.4 | 3.11 | --- | --- | 43.6 | 3.11 |
| 6 | 50.0 | 2.90 | 2.72 | 2.5458 | 43.7 | 3.11 |
| 7 | 50.9 | 3.11 | 2.64 | --- | 49.7 | 3.22 |
| 8 | 50.7 | 3.13 | 2.57 | --- | 49.8 | 3.22 |
| Mittelwert | 51.3 | 3.1 | 2.6 | 2.5 | 46.2 | 3.2 |
| sdv | 10.9 | 0.3 | 0.1 | --- | 7.2 | 0.1 |
| rel sdv [%] | 21.3 | 9.15 | 2.02 | --- | 15.6 | 4.05 |

Messungen mit humanem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 53.0 | 3.27 | --- | 52.2 | 3.26 | --- |
| 2 | 52.5 | 3.27 | --- | 52.3 | 3.26 | --- |
| 3 | 74.9 | 3.70 | | 69.9 | 3.56 | --- |
| 4 | 74.5 | 3.69 | | 70.1 | 3.59 | --- |
| 5 | 71.8 | 3.63 | | 70.7 | 3.60 | --- |
| 6 | 74.3 | 3.68 | | 64.0 | 3.47 | --- |
| 7 | 68.8 | 3.38 | 3.11 | 64.8 | 3.49 | --- |
| 8 | 71.3 | 3.41 | 3.20 | 68.0 | 3.55 | --- |
| Mittelwert | 67.6 | 3.5 | 3.2 | 64.0 | 3.5 | --- |
| sdv | 9.4 | 0.2 | 0.1 | 7.6 | 0.1 | --- |
| rel sdv [%] | 13.9 | 5.42 | 2.13 | 11.9 | 3.99 | --- |

4.2.2.6 GB-AP 110

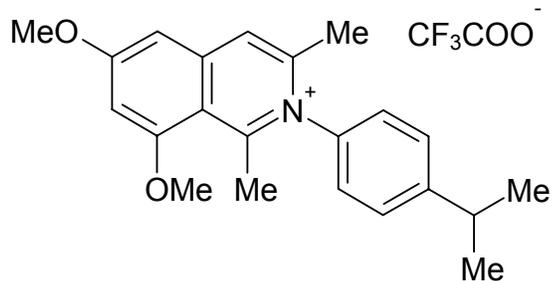
N-(4'-iso-Propylphenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtrifluoroacetat

Summenformel: C₂₄H₂₆F₃NO₄

Molare Masse: 449,5 g/mol

Messwellenlänge: 264nm

Eingesetzte Konzentrationen: 10-12mg/l



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 67.4 | 3.48 | 2.64 | 72.4 | 3.64 | --- |
| 2 | 67.4 | 3.48 | 2.65 | 72.4 | 3.64 | --- |
| 3 | 77.5 | 3.76 | --- | 77.4 | 3.76 | --- |
| 4 | 77.8 | 3.77 | --- | 77.6 | 3.76 | --- |
| 5 | 69.5 | 3.58 | --- | 68.5 | 3.56 | --- |
| 6 | 70.5 | 3.60 | --- | 68.5 | 3.56 | --- |
| 7 | 54.4 | 3.08 | 2.90 | 55.3 | 3.31 | --- |
| Mittelwert | 69.2 | 3.5 | 2.7 | 70.3 | 3.6 | --- |
| sdv | 7.9 | 0.2 | 0.1 | 7.6 | 0.2 | --- |
| rel sdv [%] | 11.4 | 6.61 | 5.37 | 10.8 | 4.22 | --- |

4.2.2.7 GB-AP 149

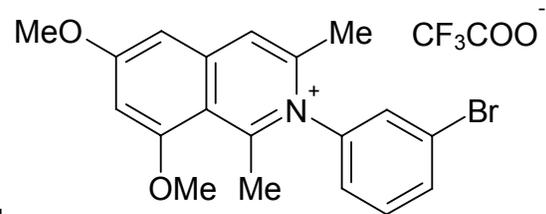
N-(3'-Bromphenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtrifluoroacetat

Summenformel: C₂₁H₁₉BrF₃NO₄

Molare Masse: 486,3 g/mol

Messwellenlänge: 270nm

Eingesetzte Konzentrationen: 10-12mg/l

**Messungen mit bovinem Serumalbumin:**

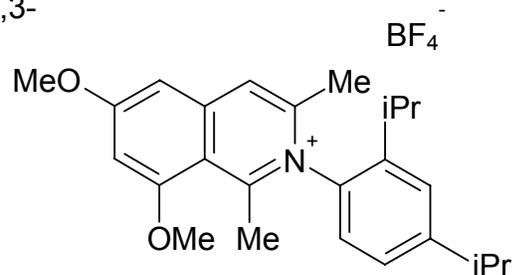
| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 68.2 | 3.55 | --- | 67.7 | 3.54 | --- |
| 2 | 60.0 | 3.40 | --- | 60.1 | 3.40 | --- |
| 3 | 50.4 | 3.01 | 2.83 | 38.7 | 3.02 | --- |
| 4 | 72.1 | 3.41 | 3.24 | 69.0 | 3.57 | --- |
| 5 | 57.5 | 3.35 | --- | 57.5 | 3.35 | --- |
| 6 | 59.6 | 3.26 | 2.81 | 59.2 | 3.38 | --- |
| Mittelwert | 61.3 | 3.3 | 3.0 | 58.7 | 3.4 | --- |
| sdv | 7.8 | 0.2 | 0.2 | 10.9 | 0.2 | --- |
| rel sdv [%] | 12.7 | 5.56 | 8.10 | 18.5 | 5.83 | --- |

4.2.2.8 GB-AP 186

N-(2',4'-Di-iso-propylphenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtetrafluoroborat

Summenformel: C₂₅H₃₅NO₂BF₄

Molare Masse: 465,0 g/mol



Messwellenlänge: 271nm

Eingesetzte Konzentrationen: 10-12mg/l

Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | Proteinbindung | pK ₁ |
| 1 | 55,8 | 3,22 | 2,65 | --- | 55,5 | 3,32 |
| 2 | 54,2 | 3,29 | --- | --- | 54,6 | 3,30 |
| 3 | 55,5 | 3,32 | --- | --- | 56,0 | 3,33 |
| 4 | 62,4 | 3,12 | 2,94 | 2,76 | 56,4 | 3,33 |
| 5 | 51,5 | 3,25 | --- | --- | 51,6 | 3,25 |
| 6 | 64,5 | 3,48 | --- | --- | 64,8 | 3,49 |
| 7 | 78,6 | 3,79 | --- | --- | 69,9 | 3,59 |
| 8 | 74,8 | 3,70 | --- | --- | 58,5 | 3,37 |
| 9 | 73,4 | 3,66 | --- | --- | 66,8 | 3,53 |
| Mittelwert | 63,4 | 3,4 | 2,8 | 2,8 | 59,3 | 3,4 |
| sdv | 10,1 | 0,2 | 0,2 | --- | 6,3 | 0,1 |
| rel sdv [%] | 15,9 | 7,00 | 7,42 | --- | 10,6 | 3,42 |

4.2.2.9 GB-AP 187

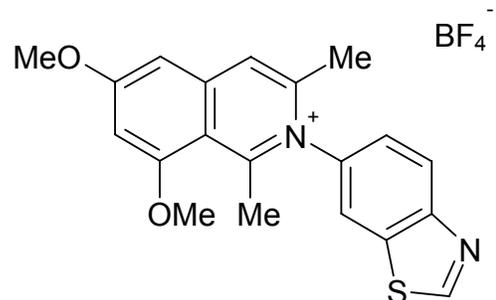
N-(6'-Benzothiazol)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtetrafluoroborat

Summenformel: C₂₀H₁₉N₂O₂SBF₄

Molare Masse: 438,3 g/mol

Messwellenlänge: 270nm

Eingesetzte Konzentrationen: 10-12mg/l

**Messungen mit bovinem Serumalbumin:**

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 43.0 | 3.10 | --- | 43.8 | 3.11 | --- |
| 2 | 25.5 | 2.63 | 2.15 | 25.0 | 2.74 | --- |
| 3 | 34.1 | 2.94 | --- | 34.2 | 2.94 | --- |
| 4 | 24.7 | 2.74 | --- | 25.3 | 2.75 | --- |
| 5 | 35.7 | 2.96 | 0.88 | 36.1 | 2.97 | --- |
| Mittelwert | 32.6 | 2.9 | 1.5 | 32.9 | 2.9 | --- |
| sdv | 7.7 | 0.2 | 0.9 | 8.0 | 0.2 | --- |
| rel sdv [%] | 23.5 | 6.52 | 59.10 | 24.2 | 5.43 | --- |

Messungen mit humanem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 27.0 | 2.79 | --- | 27.3 | 2.80 | --- |
| 2 | 38.1 | 3.01 | --- | 26.3 | 2.77 | --- |
| 3 | 40.9 | 3.06 | --- | 37.7 | 3.00 | --- |
| 4 | 30.4 | 2.86 | --- | 37.3 | 3.00 | --- |
| 5 | 31.8 | 2.89 | --- | 32.2 | 2.90 | --- |
| 6 | 36.2 | 2.98 | --- | 37.4 | 3.00 | --- |
| 7 | 36.5 | 2.98 | --- | 38.2 | 3.01 | --- |
| 8 | 48.9 | 2.98 | 2.81 | 47.7 | 3.18 | --- |
| 9 | 48.3 | 3.19 | --- | 48.0 | 3.19 | --- |
| Mittelwert | 37.6 | 3.0 | 2.8 | 36.9 | 3.0 | --- |
| sdv | 7.5 | 0.1 | --- | 7.7 | 0.1 | --- |
| rel sdv [%] | 20.1 | 3.95 | --- | 20.8 | 4.88 | --- |

4.2.2.10 GB-AP 189

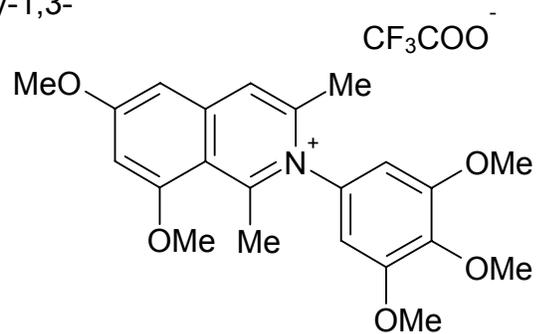
N-(3',4',5'-Trimethoxyphenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtrifluoroacetat

Summenformel: C₂₄H₂₆F₃NO₇

Molare Masse: 497,5 g/mol

Messwellenlänge: 270nm

Eingesetzte Konzentrationen: 12-15mg/l



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 51.6 | 3.03 | 2.85 | 50.5 | 3.23 | --- |
| 2 | 42.6 | 3.09 | --- | 38.4 | 3.02 | --- |
| 3 | 54.2 | 3.30 | --- | 49.0 | 3.20 | --- |
| 4 | 56.8 | 3.12 | 2.94 | 55.0 | 3.31 | --- |
| 5 | 61.1 | 3.42 | --- | 54.8 | 3.31 | --- |
| 6 | 54.9 | 3.31 | --- | 43.9 | 3.12 | --- |
| Mittelwert | 53.5 | 3.2 | 2.9 | 48.6 | 3.2 | --- |
| sdv | 6.2 | 0.2 | 0.1 | 6.5 | 0.1 | --- |
| rel sdv [%] | 11.6 | 4.73 | 2.22 | 13.3 | 3.55 | --- |

Messungen mit humanem Serumalbumin:

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 63.2 | 3.2344 | 3.0583 | 61.1 | 3.42 | --- |
| 2 | 55.5 | 3.3186 | --- | 55.6 | 3.32 | --- |
| 3 | 39.9 | 2.9757 | 2.2092 | 38.5 | 3.02 | --- |
| 4 | 49.4 | 3.1216 | 2.484 | 48.3 | 3.19 | --- |
| 5 | 45.7 | 2.9248 | 2.7487 | 38.0 | 3.01 | --- |
| Mittelwert | 50.7 | 3.1 | 2.6 | 48.3 | 3.2 | --- |
| sdv | 9.0 | 0.2 | 0.4 | 10.2 | 0.2 | --- |
| rel sdv [%] | 17.7 | 5.36 | 13.84 | 21.2 | 5.67 | --- |

4.2.2.11 GB-AP 197

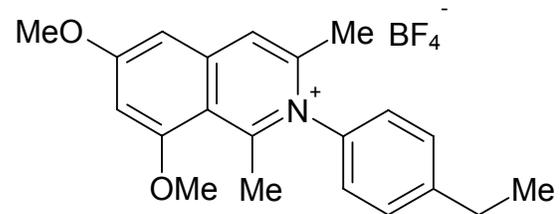
N-(4'-Ethylphenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtetrafluoroborat

Summenformel: C₂₁H₂₄NO₂BF₄

Molare Masse: 409,2 g/mol

Messwellenlänge: 267nm

Eingesetzte Konzentrationen: 10-12mg/l

**Messungen mit bovinem Serumalbumin:**

| Lauf | UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 61.4 | 3.20 | 3.03 | 61.4 | 3.42 | --- |
| 2 | 58.0 | 3.36 | --- | 58.1 | 3.36 | --- |
| 3 | 51.1 | 3.16 | 2.45 | 50.5 | 3.23 | --- |
| 4 | 54.3 | 3.23 | 2.46 | 53.8 | 3.29 | --- |
| 5 | 43.7 | 2.92 | 2.66 | 43.7 | 3.11 | --- |
| 6 | 62.8 | 3.45 | --- | 61.8 | 3.43 | --- |
| 7 | 44.7 | 3.13 | --- | 44.6 | 3.13 | --- |
| 8 | 46.1 | 3.15 | --- | 46.1 | 3.15 | --- |
| Mittelwert | 52.8 | 3.2 | 2.6 | 52.5 | 3.3 | --- |
| sdv | 7.6 | 0.2 | 0.3 | 7.4 | 0.1 | --- |
| rel sdv [%] | 14.3 | 4.94 | 10.17 | 14.1 | 3.97 | --- |

4.2.3 Diskussion

Die Ergebnisse der Proteinbindungsbestimmungen der Naphthylisochinoline mit bovinem Serumalbumin sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Alle gezeigten Werte entsprechen hierbei den Mittelwerten der Auswertungen nach dem unabhängigen Bindungsmodell. Die erhaltenen Werte reichen von 32,6 % bei GB-AP 187 bis zu 69,2 % bei GB-AP 110. Die bei den Messungen erhaltenen Standardabweichungen liegen im akzeptablen Bereich, auch wenn diese größer sind als beispielsweise bei den Sartanen (s.4.1).

Eine Abhängigkeit zwischen gemessener Proteinbindung und dem Substitutionsmuster der Naphthylisochinoline kann nicht festgestellt werden. Tragen die Substanzen lipophile, elektronenschiebende Substituenten, wie die Methyl-, Ethyl- oder Isopropylgruppen bei GB-AP 101 (4'-Methyl: 61,2%), 107 (2',6'-Dimethyl: 51,3%), 110 (4'-iso-Propyl: 69,2%), 186 (2',4'-Di-iso-propyl: 63,4), 197 (4'-Ethyl: 52,8%) findet man ebenso wie bei den Substanzen GB-AP 89 (4'-Chlor: 63,0%), 104 (4'-N-Phenylacetamid: 56,4%), 149 (3'-Brom: 61,3%), die hydrophile, elektronenziehende Substituenten besitzen, Proteinbindungen im Bereich von 50-70 %. Auch innerhalb der einzelnen Substituentengruppen lässt sich keine konkrete Tendenz im Bindungsverhalten feststellen. Warum die Substanzen GB-AP 94 und 187 eine vergleichsweise niedrige Proteinbindung von 32,6 bzw. 35,7 % besitzen, lässt sich aufgrund der Strukturmerkmale ebenfalls nicht schlüssig erklären.

Tabelle 5: Proteinbindungen der gemessenen Naphthylisochinoline gegenüber BSA

| Substanz | Derivat R = | Proteinbindung [%] | sdv |
|-----------|----------------------------|-----------------------|------|
| GB-AP 89 | 4'-Chlorphenyl- | 63.0 | 5.4 |
| GB-AP 94 | 3'-Methoxyphenyl- | 35.7 | 7.4 |
| GB-AP 101 | 4'-Methylphenyl- | 61.2 | 9.4 |
| GB-AP 104 | 4'-N'-Phenylacetamid- | 56.4 | 2.0 |
| GB-AP 107 | 2',6'-Dimethylphenyl- | 51.3 | 10.9 |
| GB-AP 110 | 4'-iso-Propylphenyl- | 69.2 | 7.9 |
| GB-AP 149 | 3'-Bromphenyl- | 61.3 | 7.8 |
| GB-AP 186 | 2',4'-Di-iso-propylphenyl- | 63.4 | 10.1 |
| GB-AP 187 | 6'-Benzothiazol- | 32.6 | 7.7 |
| GB-AP 189 | 3',4',5'-Trimethoxyphenyl- | 53.5 | 6.2 |
| GB-AP 197 | 4'-Ethylphenyl- | 52.8 | 7.6 |

Je nach Verfügbarkeit wurden einige der Naphthylisochinoline neben BSA zusätzlich auch mit HSA untersucht. In Tabelle 6 werden die entsprechenden Ergebnisse mit den Werten aus den Messungen mit HSA verglichen.

Tabelle 6: Vergleich der gegenüber HSA und BSA erhaltenen Proteinbindungen

| Substanz | Derivat R = | Proteinbindung [%] | | | |
|-----------|----------------------------|--------------------|------|------|------|
| | | HSA | sdv | BSA | sdv |
| GB-AP 89 | 4'-Chlorphenyl- | 68.5 | 8.3 | 63.0 | 5.4 |
| GB-AP 101 | 4'-Methylphenyl- | 63.7 | 11.1 | 61.2 | 9.4 |
| GB-AP 107 | 2',6'-Dimethylphenyl- | 67.6 | 9.4 | 51.3 | 10.9 |
| GB-AP 187 | 6'-Benzothiazol- | 37.6 | 7.5 | 32.6 | 7.7 |
| GB-AP 189 | 3',4',5'-Trimethoxyphenyl- | 50.7 | 9.0 | 53.5 | 6.2 |

Die gemessenen Proteinbindungen zu HSA und BSA liegen bei allen Substanzen außer GB-AP 107 in einem ähnlichen Bereich. Auch für GB-AP 187 konnte mit den HSA-Messungen der niedrige Proteinbindungswert der Versuche mit BSA bestätigt werden. Bei GB-AP 107 hingegen wurde gegenüber HSA eine deutlich erhöhte Proteinbindung gefunden. Wie schon in früheren Arbeiten nachgewiesen wurde^[122,141], können sich, trotz der hohen Ähnlichkeiten der beiden verwendeten Albumine, vereinzelt Unterschiede im Ausmaß der Proteinbindung ergeben. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass es durchaus legitim ist, das wesentlich preiswertere bovine Serumalbumin, als Alternative zu humanem Serumalbumin, zu Screeningzwecken zu verwenden.

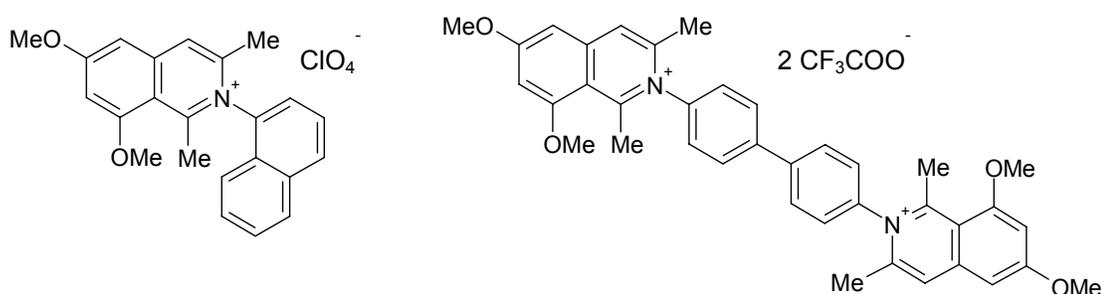


Abbildung 31: Strukturen der Naphthylisochinoline GB-AP 05 (links) und 143 (rechts)

Die Proteinbindungen der Naphthylisochinoline GB-AP 05 und GB-AP 143 konnten nicht effektiv bestimmt werden, da innerhalb der Messungen immer wieder starke Schwankungen der Kurven auftraten (Abbildung 32). Eine Auswertung war daher in den meisten Fällen unmöglich. So konnte für GB-AP 05 nur eine verwertbare Messung durchgeführt werden, die ermittelte Proteinbindung lag bei 70,0% ($pK_A=3,59$). Bei GB-AP 143 waren aufgrund der starken Schwankungen nur zwei Versuche auswertbar. Für die Proteinbindung wurde ein Mittelwert von 71,6% erhalten, die Standardabweichung lag entsprechend bei 18,4.

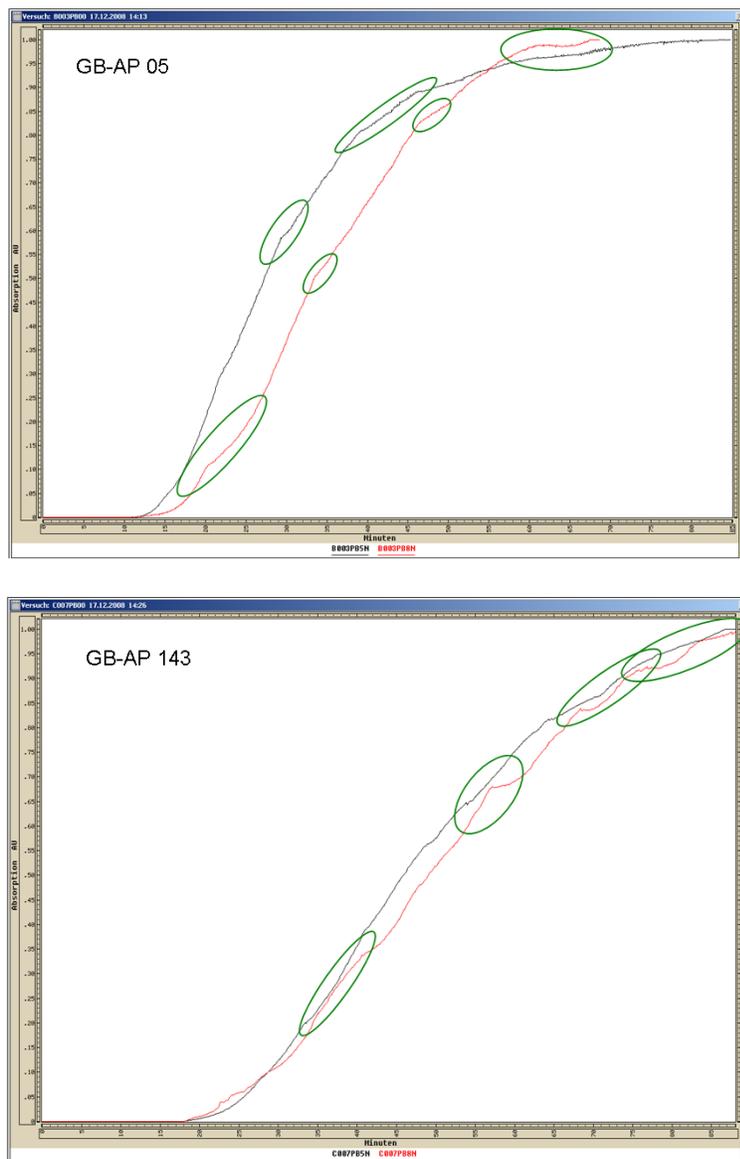


Abbildung 32: Schwankungen des Kurvenverlaufs bei Messungen von GB-AP 05 bzw. 143

Technische Ursachen, wie inhomogenes Rühren etc. können als Ursachen für diese Schwankungen ausgeschlossen werden. Falls eine Adsorption der Stoffe an die Ultrafiltrationsmembran der Grund für das beobachtete Verhalten gewesen wäre, hätte ein Vergleich der Kurven ohne bzw. mit Membran entsprechende Unterschiede zeigen müssen (s. 3.4.3.3). Im Gegensatz dazu zeigten die Kurven mit bzw. ohne Ultrafiltrationszelle erhebliche Unterschiede (s. Abbildung 33). Der wesentlich flachere Anstieg der Kurve mit Ultrafiltrationszelle deutet auf eine Adsorption der Substanzen an die Plexiglasoberfläche der Ultrafiltrationszelle hin. (s. 3.4.3.2)

Neben den Messungen mit BSA und HSA sollten einige Naphthylisochinoline eigentlich auch noch mit humanem Plasma vermessen werden. Im Gegensatz zu den Plasmamessungen mit den Sartanen (s. 4.1) traten hier allerdings Probleme auf, so dass letztendlich keine verwertbaren Messungen durchgeführt werden konnten. So war das in diesen Messungen verwendete Plasma nach dem Auftauen deutlich getrübt, teilweise waren sogar Schwebstoffe im Plasma zu erkennen. Obwohl nach der üblichen Filtration des Plasmas eine relativ klare Lösung erhalten wurde, konnte mit ihr keine Messung durchgeführt werden, da nach der Injektion der Pumpendruck schnell stark anstieg, bis die Pumpe automatisch abschaltete. Diese Beobachtung lässt auf ein Verstopfen der Ultrafiltrationsmembran durch das Plasma schließen. Erfolgreiche Messungen mit humanem Plasma sind also stark von der Qualität des verwendeten Plasmas abhängig.

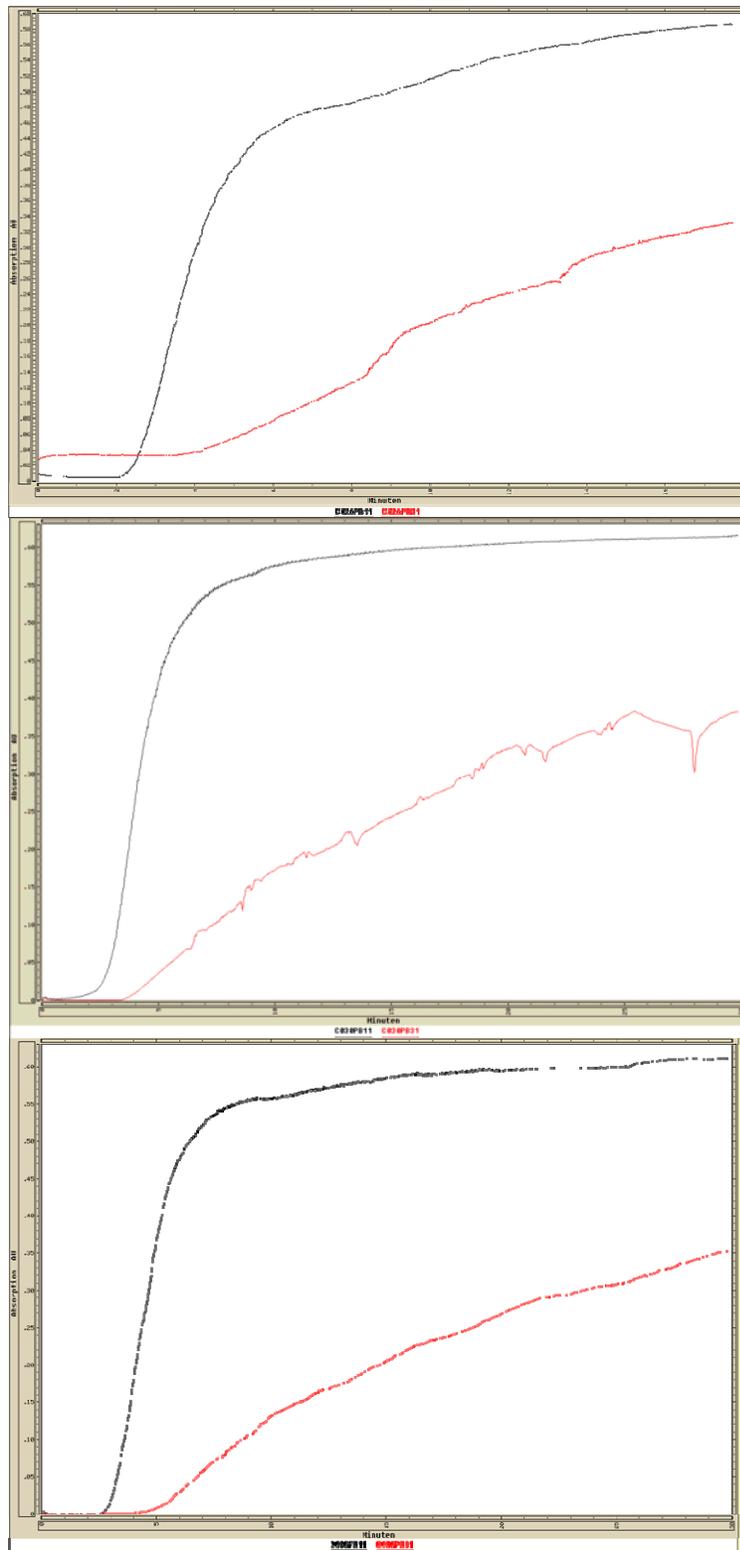


Abbildung 33: Unterschiede innerhalb der Elutionskurven mit (untere Kurve) bzw. ohne (obere Kurve) Ultrafiltrationszelle bei GB-AP 143

4.3 Verdrängung aus der Proteinbindung

4.3.1 Allgemeines

Wie in 1.2 beschrieben wurde, kann eine Erhöhung des freien, pharmakologisch aktiven Anteils eines Wirkstoffes im Plasma direkte Auswirkungen auf die Stärke der Wirkung des Stoffes haben. Normalerweise führt eine niedriger werdende Proteinbindung, beziehungsweise ein größer werdender freier Arzneistoffanteil nur selten zu erhöhten Plasmaspiegeln, da ein Ansteigen der Plasmakonzentration üblicherweise mit einer erhöhten Ausscheidungsrate, einer verstärkten hepatischen Metabolisierung oder einem größer werdenden Verteilungsvolumen einhergeht. Dennoch sollte eine Veränderung der Proteinbindung bei Arzneistoffen, die eine geringe therapeutische Breite besitzen und zu den sogenannten „high extraction drugs“ zählen, beachtet werden.^[35,36]

Da eine Freisetzung des Arzneistoffes aus seiner Proteinbindung zum Beispiel durch die Wechselwirkung mit anderen Arzneistoffen bedingt sein kann, ist dieses Thema immer wieder Gegenstand von Untersuchungen. Klassisches Beispiel für eine solche Interaktion ist die Wechselwirkung zwischen dem Antikoagulans Warfarin und dem nichtsteroidalen Antirheumatikum Phenylbutazon. Zwar kann in diesem Fall bei gleichzeitiger Gabe beider Stoffe sowohl ein erhöhter gerinnungshemmender Effekt, als auch eine verringerte Proteinbindung des Warfarin^[142], festgestellt werden, dennoch beruht die gesteigerte Wirkung des Antikoagulans primär auf pharmakodynamischen und, als Substrat für Cytochrom P450 2C9, auf metabolischen Prozessen.^[143,144] Weitere Arbeiten zu diesem Thema befassen sich aufgrund seiner geringen therapeutischen Breite ebenfalls mit Warfarin^[145,146,147,148,149] und vielen potentiellen Interaktionspartnern wie zum Beispiel Indometacin, Ceftriaxon, etc. Aber auch für diverse andere Stoffe wie beispielsweise Glibenclamid,^[150] Colchicin,^[151] Phenytoin,^[152] Valproinsäure und Carbamazepin,^[153] Nelfinavir^[154] oder Propranolol^[155] wurden Studien durchgeführt.

Die meisten der oben aufgeführten Arbeiten wurden mittels Gleichgewichtsdialyse durchgeführt, zwei Ansätze verwendeten aber auch Ultrafiltrationsmethoden,^[156,157] welche den Vorgänger der hier verwendeten Messanlage darstellt. Im Folgenden sollte nun getestet werden, ob mit der vorhandenen, modifizierten Messanlage ebenfalls Verdrängungen aus der Proteinbindung simuliert werden können. Die Messanlage wurde für diese Versuche zusätzlich mit einem Detektor ausgerüstet, der mehrere Wellenlängen gleichzeitig detektieren kann (s. 3.1.6). Dadurch ist es möglich die beiden interagierenden Stoffe getrennt zu beobachten. Voraussetzung hierfür ist, dass die Wellenlängen so gewählt werden, dass jede Substanz einzeln erfasst wird, die Absorptionsmaxima der Substanzen sollten also möglichst weit auseinander liegen. Da der verdrängende Wirkstoff erst nach der Proteininjektion im Versuch vorhanden ist, können die angezeigten Kurven nicht zur Auswertung verwendet werden. Sie dienen nur zur Beobachtung des Versuchsverlaufs.

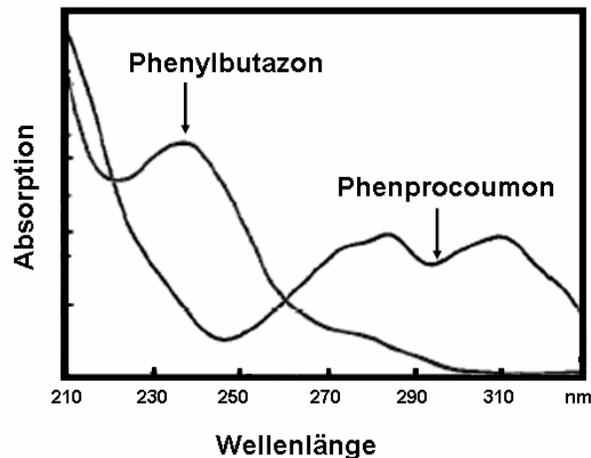


Abbildung 34: UV-Spektrum von Phenprocoumon und Phenylbutazon^[158]

Serumalbumin besitzt verschiedene Bindungsstellen für Arzneistoffe. Die Verdrängung einer Substanz aus seiner Proteinbindung ist prinzipiell nur dann möglich, wenn die interagierenden Wirkstoffe an derselben Bindungsstelle des Albumins angreifen. Allerdings ist die Bindungsstelle einer Substanz am Albumin nicht immer bekannt. Ein gezieltes Screening auf eine Interaktion dieser Art gestaltet sich daher oft schwierig. Da Phenylbutazon und Phenprocoumon an Bindungsstelle 1, die in der Subdomäne IIA des Albumins liegt, binden (s.1.1.1),

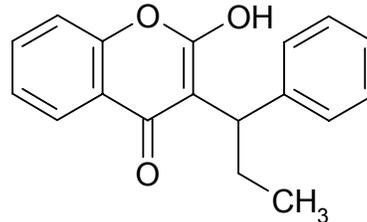
wurden diese beiden Stoffe als Testsubstanzen ausgewählt^[11,12,14] Des Weiteren bringen beide Substanzen ideale Voraussetzungen bezüglich der Lage ihrer Absorptionsmaxima mit sich. Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, liegen diese für Phenylbutazon bei 237nm bzw. bei 310nm für Phenprocoumon. Phenprocoumon wurde bei einer Wellenlänge von 330nm detektiert, so dass eine Störung durch Phenylbutazon ausgeschlossen wird.

4.3.2 Einzelmessungen

4.3.2.1 Phenprocoumon

Summenformel: C₁₈H₁₆O₃

Molare Masse: 280,3 g/mol



Messwellenlänge: 330 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 17-22 mg/l

Literaturwerte: > 99,0% ^[157] (HSA), >99,0% ^[159] (Plasma)

Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ |
| 1 | 98.5 | 4.98 | 4.19 | --- | --- |
| 2 | 98.5 | 4.97 | 4.14 | --- | --- |
| 3 | 99.3 | 5.31 | 4.46 | --- | --- |
| 4 | 99.2 | 5.16 | 4.72 | 3.76 | 2.96 |
| 5 | 99.2 | 4.99 | 4.81 | 4.64 | --- |
| 6 | 98.8 | 5.08 | 4.24 | --- | --- |
| 7 | 98.8 | 5.10 | 4.15 | --- | --- |
| 8 | 99.0 | 5.18 | 4.33 | --- | --- |
| 9 | 99.3 | 5.28 | 4.56 | 3.59 | --- |
| 10 | 99.0 | 5.16 | 4.41 | 3.11 | 2.93 |
| Mittelwert | 99.0 | 5.1 | 4.4 | 3.8 | 2.9 |
| sdv | 0.3 | 0.1 | 0.2 | 0.6 | 0.0 |
| rel sdv [%] | 0.3 | 2.3 | 5.4 | 16.9 | 0.9 |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ |
| 1 | 98.7 | 5.09 | 3.95 | --- | --- |
| 2 | 98.6 | 5.06 | 3.94 | --- | --- |
| 3 | 99.2 | 5.33 | 4.44 | --- | --- |
| 4 | 99.2 | 5.30 | 4.64 | 3.79 | --- |
| 5 | 98.7 | 5.11 | 4.94 | 4.34 | --- |
| 6 | 98.8 | 5.12 | 4.19 | --- | --- |
| 7 | 98.9 | 5.18 | 3.96 | 3.46 | --- |
| 8 | 99.2 | 5.29 | 4.05 | 3.62 | 3.44 |
| 9 | 99.3 | 5.40 | 4.47 | 3.57 | 3.32 |
| 10 | 99.1 | 5.26 | 4.34 | 3.43 | --- |
| Mittelwert | 99.0 | 5.2 | 4.3 | 3.7 | 3.4 |
| sdv | 0.3 | 0.1 | 0.3 | 0.3 | 0.1 |
| rel sdv [%] | 0.3 | 2.3 | 7.8 | 9.1 | 2.5 |

4.3.2.2 Phenylbutazon

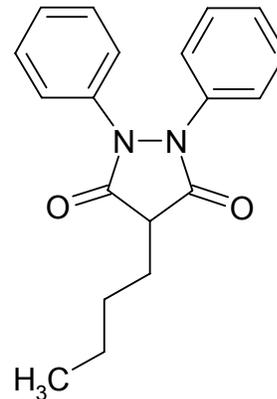
Summenformel: $C_{19}H_{20}N_2O_2$

Molare Masse: 308,4 g/mol

Messwellenlänge: 246 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 20-30 mg/l

Literaturwerte: 97,8-99,0% ^[160](HSA)



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ | pK ₅ |
| 1 | 99.4 | 5.47 | 3.90 | --- | --- | --- |
| 2 | 99.1 | 5.23 | 4.08 | --- | --- | --- |
| 3 | 99.3 | 5.10 | 4.93 | 4.07 | --- | --- |
| 4 | 99.3 | 5.13 | 4.93 | 4.05 | --- | --- |
| 5 | 99.6 | 5.55 | 5.02 | 4.12 | --- | --- |
| 6 | 99.2 | 5.16 | 4.71 | 3.59 | --- | --- |
| 7 | 99.0 | 5.15 | 4.40 | --- | --- | --- |
| 8 | 99.0 | 5.09 | 4.62 | --- | --- | --- |
| 9 | 98.9 | 5.18 | 3.40 | --- | --- | --- |
| Mittelwert | 99.2 | 5.2 | 4.4 | 4.0 | --- | --- |
| sdv | 0.2 | 0.2 | 0.6 | 0.2 | --- | --- |
| rel sdv [%] | 0.2 | 3.1 | 12.4 | 6.2 | --- | --- |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ | pK ₅ |
| 1 | 99.4 | 5.47 | 3.90 | --- | --- | --- |
| 2 | 99.2 | 5.30 | 3.87 | 3.51 | --- | --- |
| 3 | 98.8 | 5.15 | 4.97 | --- | --- | --- |
| 4 | 99.0 | 5.21 | 5.04 | --- | --- | --- |
| 5 | 99.6 | 5.64 | 5.00 | 3.91 | 3.30 | 3.11 |
| 6 | 99.0 | 5.23 | 4.74 | --- | --- | --- |
| 7 | 99.0 | 5.23 | 4.27 | 3.21 | --- | --- |
| 8 | 99.0 | 5.22 | 4.48 | --- | --- | --- |
| 9 | 98.9 | 5.18 | 3.41 | --- | --- | --- |
| Mittelwert | 99.1 | 5.3 | 4.4 | 3.5 | --- | --- |
| sdv | 0.3 | 0.2 | 0.6 | 0.3 | --- | --- |
| rel sdv [%] | 0.3 | 3.0 | 13.3 | 9.9 | --- | --- |

4.3.3 Verdrängungsexperimente

Zur Simulation der Verdrängung aus der Proteinbindung wurden zwei verschiedene Versuchsansätze ausgewählt, die im Folgenden erläutert werden.

4.3.3.1 Konkurrenz beider Arzneistoffe (Ansatz 1)

Im ersten Ansatz zur Simulation der Verdrängung aus der Proteinbindung wurde wie üblich die Elutionskurve 5 bzw. die Spülkurve 6 (s. 3.4.3.3) aufgenommen, im Anschluss das Protein injiziert und die Anlage mit Puffer gespült (Kurve 7, 3.4.3.4). Im Gegensatz zum normalen Versuchsablauf wurde danach allerdings eine Wirkstofflösung durch das System gepumpt, die zusätzlich zu dem zu messenden Wirkstoff (Phenprocoumon) noch den entsprechenden Interaktionspartner (Phenylbutazon) enthielt. Durch die Detektion des Phenprocoumon erhält man so die zweite zur Auswertung notwendige Wirkstoffkurve. Bei der UV-Detektion muss die Detektionswellenlänge so gewählt werden, dass der zweite beteiligte Wirkstoff nicht miterfasst wird, da dies die Messung entsprechend verfälschen würde. Die Absorptionsmaxima beider beteiligter Stoffe sollten folglich möglichst weit auseinander liegen, damit geeignete Wellenlängen zur Detektion vorhanden sind.

Die Einwaage von Phenprocoumon im Gemisch entsprach hierbei exakt der Menge, die in der zuvor verwendeten „einfachen“ Wirkstofflösung enthalten war. Die Konzentration der Phenylbutazonlösung lag im Bereich der Konzentrationen, die auch bei den Einzelmessungen verwendet wurden (20-30 mg/l). Die Lösung enthielt dementsprechend beide Wirkstoffe in ähnlichen Konzentrationsbereichen, die für Phenprocoumon im Bereich von ca. 60–79 $\mu\text{mol/l}$ und für Phenylbutazon bei 65–97 $\mu\text{mol/l}$ lagen.

Da beide Wirkstoffe gleichzeitig in die Ultrafiltrationszelle gepumpt werden, entsteht in diesem Versuchsansatz eine direkte Konkurrenz um die Bindungsstellen des Albumins. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen der Einzelmessungen des Phenprocoumon verglichen.

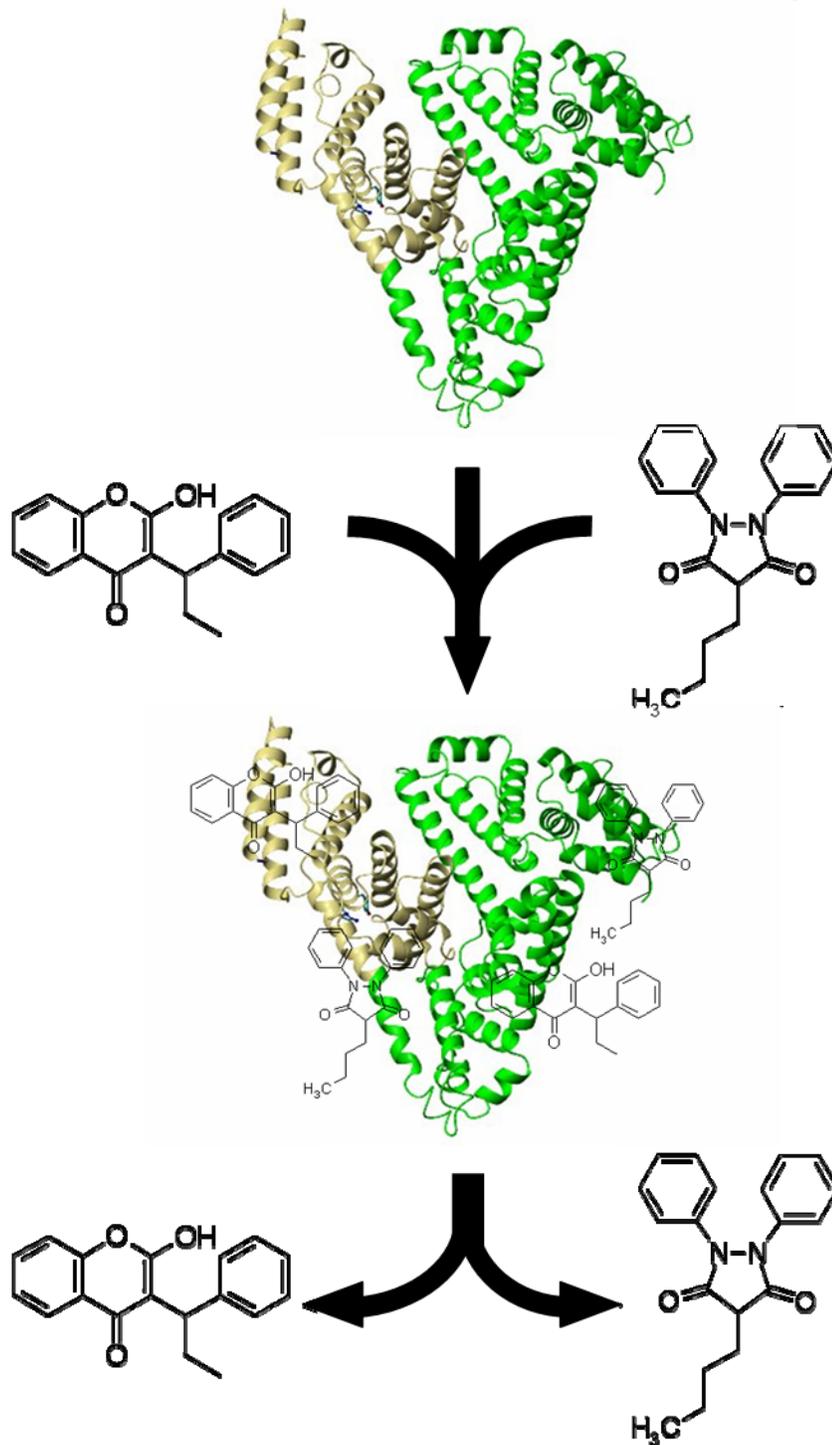


Abbildung 35: Schematische Darstellung des ersten Versuchsansatzes zur Simulation der Verdrängung aus der Proteinbindung, das Protein wird hierbei mit beiden Arzneistoffen gleichzeitig beladen.

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Experimente, die mit dem zuvor beschriebenen Versuchsansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Alle Messungen wurden mit bovinem Serumalbumin durchgeführt.

Konkurrenzversuche - Messergebnisse von Phenprocoumon:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ |
| 1 | 97,0 | 4,69 | 3,67 | --- | --- |
| 2 | 97,9 | 4,86 | 3,78 | 3,06 | --- |
| 3 | 98,8 | 5,11 | 4,19 | --- | --- |
| 4 | 97,2 | 4,73 | 3,45 | 3,07 | --- |
| 5 | 98,8 | 5,11 | 4,15 | --- | --- |
| Mittelwert | 98,0 | 4,9 | 3,8 | 3,1 | --- |
| sdv | 0,9 | 0,2 | 0,3 | 0,0 | --- |
| rel sdv [%] | 0,9 | 4,1 | 8,2 | 0,1 | --- |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ |
| 1 | 97,2 | 4,76 | --- | --- | --- |
| 2 | 97,9 | 4,90 | 3,80 | 3,30 | --- |
| 3 | 98,8 | 5,14 | 4,15 | --- | --- |
| 4 | 97,3 | 4,79 | 3,55 | --- | --- |
| 5 | 98,9 | 5,18 | 3,98 | 3,41 | 3,23 |
| Mittelwert | 98,0 | 5,0 | 3,9 | 3,4 | 3,2 |
| sdv | 0,8 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | --- |
| rel sdv [%] | 0,8 | 4,0 | 6,6 | 2,2 | --- |

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist zu erkennen, dass die Proteinbindung des Phenprocoumon mit 98,0% um 1,0% niedriger ausfällt, als in den Einzelmessungen. Der freie Anteil des Antikoagulans hätte sich diesem Ergebnis zu Folge also verdoppelt. Durch die, im Vergleich zu den Einzelmessungen des Phenprocoumon, erhöhte Standardabweichung, ist die gemessene Veränderung der Proteinbindung allerdings als nicht signifikant zu betrachten. Dennoch spiegelt die höhere Standardabweichung den Einfluss des Phenylbutazon innerhalb der Messungen wider.

4.3.3.2 Verdrängung (Ansatz 2)

In Analogie zum ersten Versuchansatz verläuft auch hier die Messung bis zur Proteininjektion nach dem Schema einer Standardmessung. Ist das Protein injiziert und der Spülschritt nach der Injektion durchgeführt, wird der Versuch angehalten und Phenylbutazon durch die Messanlage gepumpt. So erfolgt eine Bindung von Phenylbutazon an das Albumin, das sich in der Ultrafiltrationszelle befindet. Es wird solange Phenylbutazon gefördert, bis sich das übliche Absorptionsplateau eingestellt hat und die Anlage gesättigt ist. Der Absorptionsanstieg des Phenylbutazon wird über die Anzeige am Detektor überwacht. Ist das Absorptionsplateau erreicht, wird die Datenaufnahme wie üblich fortgesetzt. Es wird also Phenprocoumon in die Anlage gepumpt und so die zweite benötigte Absorptionskurve erhalten.

Im Vergleich zum ersten Modell hat das Plasmaprotein in diesem Versuchsansatz schon vor der eigentlichen Messung der zweiten Elutionskurve einen Wirkstoff gebunden. Daher beobachten wir hier keine Konkurrenz um die Bindungsstellen des Albumins wie im vorherigen Ansatz, sondern eine direkte Interaktion zwischen dem schon gebundenen und dem zweiten, zu messenden Wirkstoff.

Eine direkte Verdrängung des Phenprocoumon durch den Einfluss des Phenylbutazon ist aus technischen Gründen auf diesem Wege nicht simulierbar, da hierfür zuerst das Phenprocoumon am Albumin gebunden sein müsste. Da das Phenylbutazon nachgewiesenermaßen das Phenprocoumon aus der Proteinbindung verdrängen kann, müsste im Umkehrschluss die Bindung von Phenprocoumon an Bindungsstellen, die von Phenylbutazon besetzt sind, erschwert sein, was sich mit diesem Modell erkennen lässt.

Die gemessenen Proteinbindungen von Phenprocoumon wurden wiederum mit den Ergebnissen aus den Einzelmessungen verglichen.

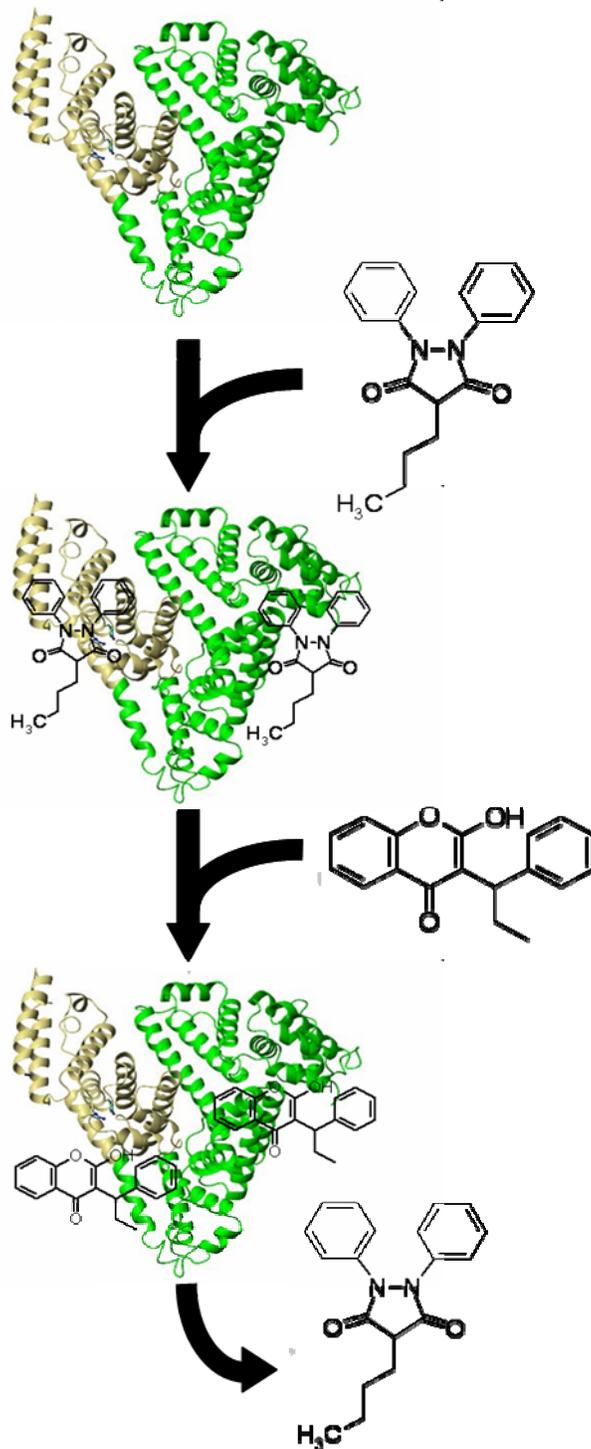


Abbildung 36: Schematische Darstellung des zweiten Versuchsansatzes zur Simulation der Verdrängung aus der Proteinbindung. Hierbei wird das Albumin zuerst mit einem Arzneistoff gesättigt, bevor der zu vermessende zweite Stoff in die Anlage gepumpt wird.

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Experimente, die mit dem zuvor beschriebenen Versuchsansatz durchgeführt wurden, dargestellt. Wie schon im ersten Versuchsansatz lagen auch hier beide Wirkstoffe in nahezu äquimolaren Konzentrationen vor. Wie in 4.3.3.1 beschrieben, lagen diese im Bereich von ca. 60-100 µmol/l. Als Protein wurde wiederum BSA verwendet.

Verdrängung - Messergebnisse von Phenprocoumon:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ |
| 1 | 97.5 | 4.51 | 4.23 | 4.06 | 3.75 |
| 2 | 96.1 | 4.34 | 4.16 | 3.66 | --- |
| 3 | 96.8 | 4.38 | 4.20 | 4.00 | --- |
| 4 | 96.7 | 4.35 | 4.17 | 3.99 | 3.23 |
| 5 | 96.4 | 4.33 | 4.16 | 3.93 | 2.84 |
| 6 | 96.1 | 4.34 | 4.16 | 3.68 | --- |
| 7 | 95.2 | 4.18 | 4.01 | 3.83 | 2.97 |
| Mittelwert | 96.4 | 4.3 | 4.2 | 3.9 | 3.2 |
| sdv | 0.7 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.4 |
| rel sdv [%] | 0.7 | 2.2 | 1.7 | 4.1 | 12.5 |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ |
| 1 | 97.1 | 4.74 | 4.48 | 3.86 | --- |
| 2 | 94.9 | 4.49 | 4.31 | --- | --- |
| 3 | 96.6 | 4.68 | 4.23 | 3.59 | 3.19 |
| 4 | 96.3 | 4.64 | 4.30 | 3.57 | 3.40 |
| 5 | 95.8 | 4.59 | 4.28 | 3.43 | 3.25 |
| 6 | 95.8 | 4.58 | 4.14 | 3.32 | --- |
| 7 | 94.4 | 4.45 | 4.16 | 3.33 | 3.15 |
| Mittelwert | 95.8 | 4.6 | 4.3 | 3.5 | 3.2 |
| sdv | 1.0 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | --- |
| rel sdv [%] | 1.0 | 2.2 | 2.7 | 5.8 | --- |

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass die Proteinbindung des Phenprocoumon mit 96,4% um 2,6% niedriger liegt als bei den Einzelmessungen (s. 4.3.2.1). Damit erhöht sich der freie Arzneistoffanteil von 1,0% auf 3,6%, es liegt also etwa 3,5mal mehr freies Phenprocoumon vor. Analog zur gesunkenen Proteinbindung ist auch der pK₁-Wert, der der ersten Bindungskonstante entspricht (pK = log (Bindungskonstante k)), von ursprünglich 5,1 auf 4,3 gefallen. Die Standardabweichungen der Messungen sind auch hier leicht erhöht, dennoch ist

der Abfall der Proteinbindung und die Interaktion mit Phenylbutazon in diesem Modell deutlich zu erkennen.

Da die mittleren Plasmakonzentrationen der beiden Wirkstoffe unter physiologischen Bedingungen bei 2-3 µg/ml für Phenprocoumon^[161] bzw. bei ca. 40 µg/ml Phenylbutazon^[162] liegen, wurden in einem zweiten Ansatz Versuche mit Lösungen durchgeführt, deren Konzentrationen diesen physiologischen Verhältnissen entsprechen. Um Phenprocoumon im üblichen Konzentrationsbereich detektieren zu können, wurde die Konzentration der Lösung nicht verändert, sie lag weiter bei ca. 20 mg/l. Die Konzentration der Phenylbutazonlösung wurde entsprechend angepasst, sie enthielt im zweiten Ansatz ca. 400 mg/l Wirkstoff. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt.

Verdrängung - Messergebnisse von Phenprocoumon bei physiologischen Konzentrationsverhältnissen:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ |
| 1 | 92.9 | 3.96 | 3.78 | 3.60 | 3.43 |
| 2 | 93.1 | 3.97 | 3.80 | 3.62 | 3.44 |
| 3 | 94.4 | 4.12 | 3.95 | 3.77 | --- |
| 4 | 94.2 | 4.06 | 3.89 | 3.71 | 3.45 |
| 5 | 92.9 | 3.96 | 3.78 | 3.61 | 3.43 |
| 6 | 92.0 | 3.90 | 3.72 | 3.55 | 3.37 |
| Mittelwert | 93.3 | 4.0 | 3.8 | 3.6 | 3.4 |
| sdv | 0.9 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.0 |
| rel sdv [%] | 1.0 | 2.1 | 2.1 | 2.3 | 0.9 |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ | pK ₄ |
| 1 | 90.2 | 4.18 | 4.01 | --- | --- |
| 2 | 89.7 | 4.16 | 3.99 | --- | --- |
| 3 | 91.0 | 4.23 | 4.05 | --- | --- |
| 4 | 90.6 | 4.21 | 4.03 | 3.86 | --- |
| 5 | 89.7 | 4.16 | 3.99 | 3.81 | --- |
| 6 | 88.6 | 3.11 | 3.94 | --- | --- |
| Mittelwert | 90.0 | 4.0 | 4.0 | 3.8 | --- |
| sdv | 0.9 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | --- |
| rel sdv [%] | 0.9 | 11.0 | 1.0 | 0.8 | --- |

Im Vergleich zu den Einzelmessungen (s. 4.3.2.1) sank die Proteinbindung des Phenprocoumon unter physiologischen Konzentrationsverhältnissen beider Interaktionspartner um 5,7% auf 93,3%. Dementsprechend vergrößerte sich der frei vorliegende Anteil des Phenprocoumon also von 1% auf 6,7%. Gegenüber den vorangegangenen Versuchen, in denen nahezu äquimolare Konzentrationen beider Interaktionspartner verwendet wurden, führte der Einfluss der hohen Phenylbutazonkonzentration also zu einer zusätzlichen Verringerung der Proteinbindung um ca. 3%. Gegenüber den Einzelmessungen ist die Standardabweichung der Versuche erneut leicht erhöht. Die stark erhöhte Phenylbutazonkonzentration zeigt diesbezüglich aber keine weiteren Auswirkungen.

Um zu überprüfen, ob auch ein Einfluss des Phenprocoumons auf die Proteinbindung des Phenylbutazon zu verzeichnen ist, wurden mit diesem Ansatz auch Messungen mit Phenylbutazon durchgeführt. Dementsprechend wurde das bovine Serumalbumin hier zuerst mit Phenprocoumon beladen, bevor der Versuch wie beschrieben mit Phenylbutazon fortgeführt wird. Die in der nachfolgenden Tabelle dargestellten Ergebnisse dieses Ansatzes zeigen, dass sich die Proteinbindung des Phenylbutazon innerhalb der Verdrängungsexperimente nur unerheblich verändert hat. Verglichen mit den Einzelmessungen (99,2%, s. 4.3.2.2), verringerte sich die Proteinbindung des Phenylbutazon nur um 0,3%. Die erhaltenen Bindungskonstanten zeigten ebenfalls keine Veränderung. Das Phenprocoumon scheint also keinen Einfluss auf die Proteinbindung des Phenylbutazon zu haben. Auch die, gegenüber den Einzelmessungen, nahezu identischen Standardabweichungen (0,2-0,3) lassen nicht darauf schließen, dass das Phenprocoumon innerhalb der Messungen eine Auswirkung auf die Proteinbindung des Phenprocoumon hatte.

Verdrängung - Messergebnisse von Phenylbutazon:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 99.0 | 5.17 | 4.27 | --- |
| 2 | 98.7 | 5.07 | 4.09 | --- |
| 3 | 99.0 | 5.15 | 4.44 | --- |
| 4 | 99.3 | 5.36 | 4.21 | --- |
| 5 | 98.7 | 5.01 | 4.31 | --- |
| 6 | 99.0 | 5.16 | 4.24 | --- |
| 7 | 98.6 | 4.95 | 4.40 | --- |
| 8 | 99.2 | 5.23 | 4.51 | --- |
| Mittelwert | 98.9 | 5.1 | 4.3 | --- |
| sdv | 0.3 | 0.1 | 0.1 | --- |
| rel sdv [%] | 0.3 | 2.5 | 3.2 | --- |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 99.0 | 5.24 | 4.09 | 3.61 |
| 2 | 98.7 | 5.12 | 4.01 | 3.18 |
| 3 | 99.0 | 5.24 | 4.28 | 3.40 |
| 4 | 99.1 | 5.27 | 4.18 | 3.39 |
| 5 | 98.7 | 5.09 | 4.23 | --- |
| 6 | 98.9 | 5.18 | 4.23 | --- |
| 7 | 98.5 | 5.03 | 4.32 | --- |
| 8 | 99.1 | 5.27 | 4.47 | --- |
| Mittelwert | 98.9 | 5.2 | 4.2 | 3.4 |
| sdv | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| rel sdv [%] | 0.2 | 1.7 | 3.4 | 5.2 |

4.3.4 Diskussion

Innerhalb der beiden Versuchsansätze sollte geklärt werden, ob es mit der vorhandenen Messanlage möglich ist, die Verdrängung eines Wirkstoffes aus der Proteinbindung zu simulieren.

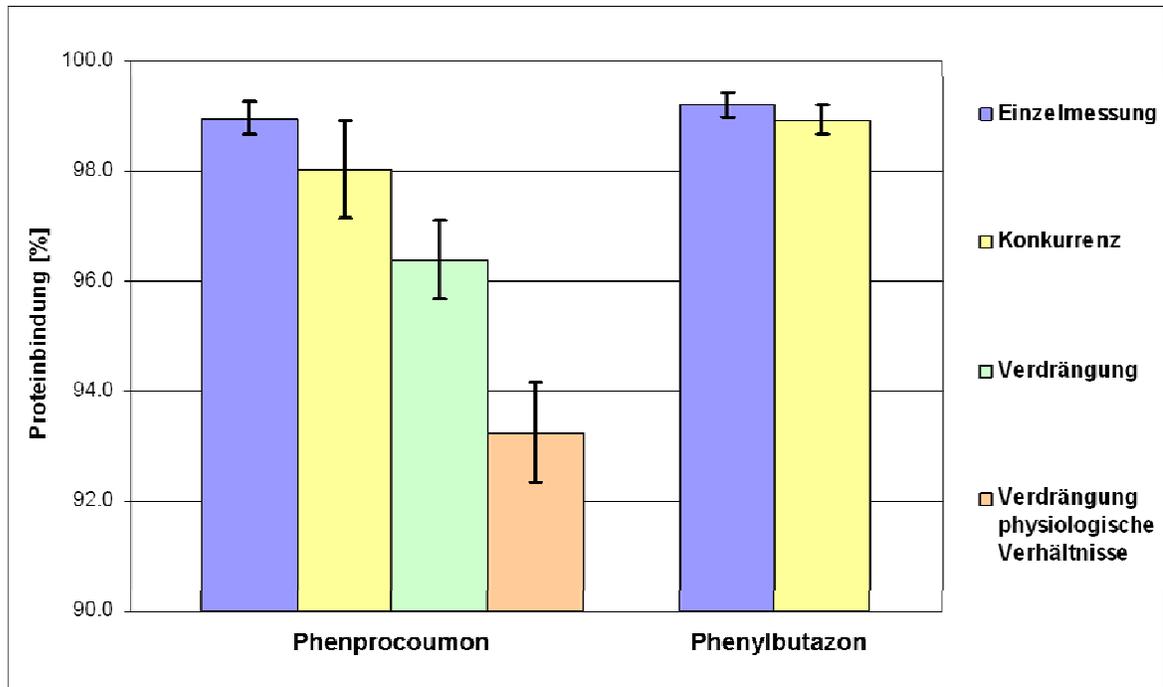


Abbildung 37: Übersicht der Ergebnisse der beiden Versuchsansätze zur Simulation der Verdrängung aus der Proteinbindung

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche sind in Abbildung 37 nochmals graphisch dargestellt. Mit der ersten Methode (Konkurrenz um die Bindungsstellen) konnte zwar eine geringe Abnahme der Proteinbindung des Phenprocoumon beobachtet werden, die Veränderung war allerdings nicht signifikant. Die Experimente des zweiten Versuchsansatzes ergaben deutlichere Ergebnisse, der freie Anteil des Phenprocoumon erhöhte sich hier um den Faktor 3,5 unter physiologischen Konzentrationsverhältnissen sogar um den Faktor 6,5. Auch die gesunkenen pK-Werte von Phenprocoumon und die Standardabweichungen der Ergebnisse, die in beiden Ansätzen leicht erhöht waren, sprechen für die vorhandene Interaktion.

Untersuchungen von *Schmidt*^[163] ergaben eine Erhöhung der freien Konzentration von Phenprocoumon um den Faktor 1,7 bei *In-vitro*- (Gleichgewichtsdialyse), bzw. um den Faktor 2,5 bis 3 bei *In-vivo*-Experimenten. Der ungebundene Anteil von Warfarin, ein dem Phenprocoumon strukturell sehr ähnliches Antikoagulans, erhöhte sich unter dem Einfluss von Phenylbutazon um den Faktor 2.^[143] In einer

weiteren Arbeit von *Diana* wurde ebenfalls die Interaktion zwischen Warfarin und Phenylbutazon *in vitro* untersucht. Hierbei erhöhte sich der freie Anteil des Warfarin von 2.5-6,0% auf 23-43%.^[147] Auch diese beiden Arbeiten wurden mittels Gleichgewichtsdialyse durchgeführt. In allen Experimenten kamen physiologische Dosen der jeweiligen Wirkstoffe zum Einsatz. Die Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten deuten darauf hin, dass die freie Konzentration, die sich aus solch einer Interaktion ergibt, offensichtlich starken Schwankungen unterliegt.

Auch mit Hilfe der kontinuierlichen Ultrafiltration ist es also grundsätzlich möglich eine Interaktion, wie die Verdrängung eines Arzneistoffes aus seiner Proteinbindung, zu simulieren. Hierfür sollten die an der Interaktion beteiligten Wirkstoffe in physiologischen Verhältnissen eingesetzt werden. Grundvoraussetzung für diese Art der Simulation ist allerdings, dass die Absorptionsmaxima der beiden an der Interaktion beteiligten Wirkstoffe möglichst weit auseinander liegen, damit eine getrennte Messung überhaupt möglich ist. Da dies in vielen potentiellen Interaktionsfällen vermutlich nicht der Fall sein wird, ist der Einsatz dieser Methoden vermutlich nur selten möglich.

4.4 Wasserunlösliche Wirkstoffe

4.4.1 Allgemeines

Aufgrund der Verwendung der Albumine ist das Arbeiten in wässrigem Medium eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Proteinbindungsbestimmung. Organische Lösungsmittel könnten das Protein denaturieren und eine Messung unmöglich machen. Dementsprechend waren alle bisher gemessenen Stoffe zumindest in geringem Maß wasserlöslich.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit sollte die Proteinbindung von Protease-Inhibitoren, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Schirmeister synthetisiert wurden, vermessen werden. ^[164,165]

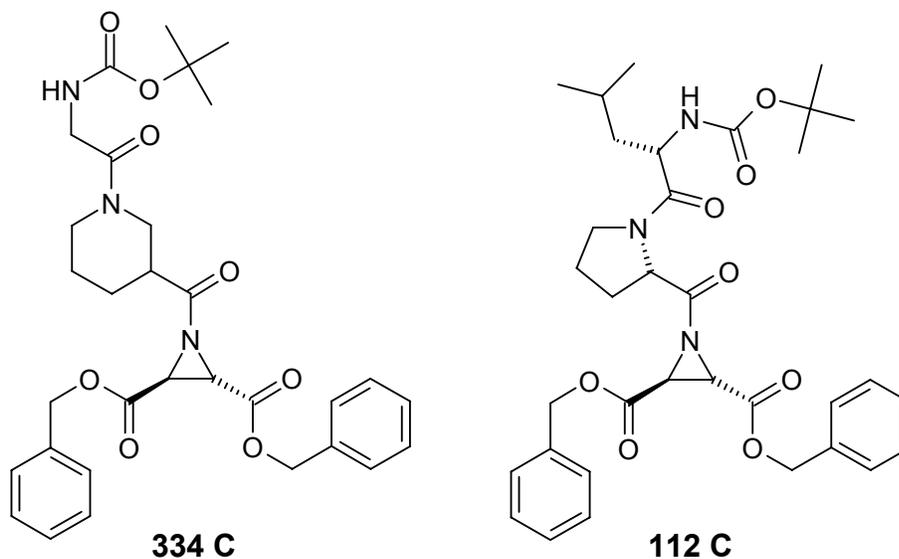


Abbildung 38: N-Acylierte Aziridin-2,3-dicarboxylate als potentielle Protease-Inhibitoren

Die Verbindungen (s. Abbildung 38) bestehen aus einem Aziridinring, der am Stickstoff acyliert und in 2- und 3-Position mit Estern substituiert ist. Je nach Art der Substitution weisen sie verschiedene Aktivitäten gegen Cystein-Proteasen aus *Trypanosoma brucei*^[166], *Leishmania major*^[167] oder *Plasmodium falciparum*^[168]

auf. Unglücklicherweise sind die Aziridine wasserunlöslich. Das einzige Lösungsmittel, in dem die Wirkstoffe gut lösbar sind, ist Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO ist ein mit Wasser mischbares, organisches Lösungsmittel, das häufig zur Lösung sonst schwerlöslicher Substanzen verwendet wird. In vielen Bereichen der Wissenschaften dient es mittlerweile als eine Art Standardlösungsmittel, das auch in Gegenwart von Proteinen verwendet werden kann. Dennoch ist zu beachten, dass DMSO unterschiedliche Effekte auf Proteine haben kann. So kann DMSO Proteine nicht nur denaturieren^[169,170,171], sondern beispielsweise auch Enzyme wie Alkoholdehydrogenasen^[172,173] inhibieren. Schon in niedrigen Konzentrationen (z.B. < 10% V/V) können Proteine vom DMSO entsprechend negativ beeinflusst werden.^[174,175]

Im Folgenden wurde getestet, ob mit der kontinuierlichen Ultrafiltration auch wasserunlösliche Stoffe wie die Aziridine zuverlässig vermessen werden können. Dazu wurden verschiedene Testsubstanzen, von denen die Proteinbindung bekannt war, in DMSO gelöst, anschließend mit Phosphatpuffer verdünnt und die Proteinbindung an BSA bestimmt. Die Wirkstoff-Pufferlösungen hatten einen DMSO-Gehalt von 1-10%. Um einen möglichen Einfluss des DMSO auf das Protein erkennen zu können, wurden die erhaltenen Ergebnisse mit den bekannten Literaturwerten verglichen. Die Testsubstanzen wurden so ausgewählt, dass sie den gesamten Proteinbindungsbereich von niedrig- bis hochbindend abdecken, um einen Überblick über den potentiellen Einfluss des DMSO zu erhalten.

Tabelle 7: Übersicht der Substanzen, die mit DMSO-Zusatz vermessen wurden

| Substanz | Proteinbindung [%] |
|---------------|---------------------------------------------------------------------|
| Candesartan | 98,9% (BSA, s.4.1.2) |
| Cinoxacin | 66,9% ± 4,2 ^[122] ; 66,9% ^[141] (jeweils BSA) |
| Ofloxacin | 55,5% ± 7,8 ^[122] ; 56,8% ^[141] (jeweils BSA) |
| Levofloxacin | 48,8% ± 8,0 ^[122] ; 38,9% ^[141] (jeweils BSA) |
| Ciprofloxacin | 18,7% ^[141] (BSA); 21,9% ± 4,1 ^[176] (Plasma) |

Im Anschluss wurde mit Hilfe von DMSO die Proteinbindung von vier Aziridinen bestimmt. Der Übersichtlichkeit halber sind im nachfolgenden Ergebnisteil nur die Resultate für das unabhängige Bindungsmodell angegeben. Alle Ergebnisse sind wiederum auf ein Wirkstoff-Protein-Verhältnis von 0,001 bezogen.

4.4.2 Candesartan

Struktur, allgemeine Angaben etc. s. 4.1.2

Proteinbindung ohne DMSO: 98,9% (BSA)

Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Proteinbindung Candesartan | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | | | |
| Lauf | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 10 |
| 1 | 98.6 | 97.9 | 97.2 | 96.9 | 96.4 | 93.7 |
| 2 | 98.3 | 98.3 | 97.4 | 97.2 | 96.1 | 92.1 |
| 3 | 98.7 | 97.6 | 96.8 | 96.6 | 96.5 | 94.5 |
| 4 | 98.5 | 97.8 | 97.2 | 96.7 | 96.2 | 94.2 |
| 5 | 98.6 | 98.1 | 96.7 | 96.8 | 96.7 | 93.0 |
| 6 | --- | --- | --- | --- | --- | 94.4 |
| Durchschnitt | 98.5 | 97.9 | 97.1 | 96.9 | 96.4 | 93.6 |
| sdv | 0.17 | 0.28 | 0.27 | 0.23 | 0.21 | 0.96 |
| rel sdv [%] | 0.17 | 0.29 | 0.28 | 0.24 | 0.22 | 1.02 |

| Durchschnittliche Bindungskonstanten | | | | | | |
|---------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 10 |
| pK₁ | 5.0 ± 0.1 | 4.8 ± 0.2 | 4.7 ± 0.3 | 4.6 ± 0.2 | 4.6 ± 0.2 | 4.1 ± 0.2 |
| pK₂ | 4.5 ± 0.1 | 4.4 ± 0.2 | 4.3 ± 0.2 | 4.3 ± 0.3 | 4.2 ± 0.4 | 3.9 ± 0.4 |
| pK₃ | 3.7 ± 0.2 | 3.5 ± 0.4 | 3.6 ± 0.1 | 3.5 ± 0.6 | 3.6 ± 0.3 | 3.5 ± 0.5 |

Die oben dargestellten Ergebnisse aus den Experimenten mit Candesartan zeigen eine gute Korrelation zwischen der DMSO-Konzentration der Wirkstofflösung und dem Abfall der ermittelten Proteinbindung. Die Standardabweichungen blieben innerhalb der unterschiedlichen Versuchsansätze auf einem einheitlichen Niveau. Einzig beim Zusatz von 10% DMSO ist die Standardabweichung der Messungen erhöht.

In Abbildung 39 sind die erhaltenen Ergebnisse nochmals graphisch dargestellt. Durch lineare Regression erhält man einen „0%-Wert“ von 99,0%. Dieser Wert zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Messergebnis ohne den Zusatz von DMSO (■ = 98,9%).

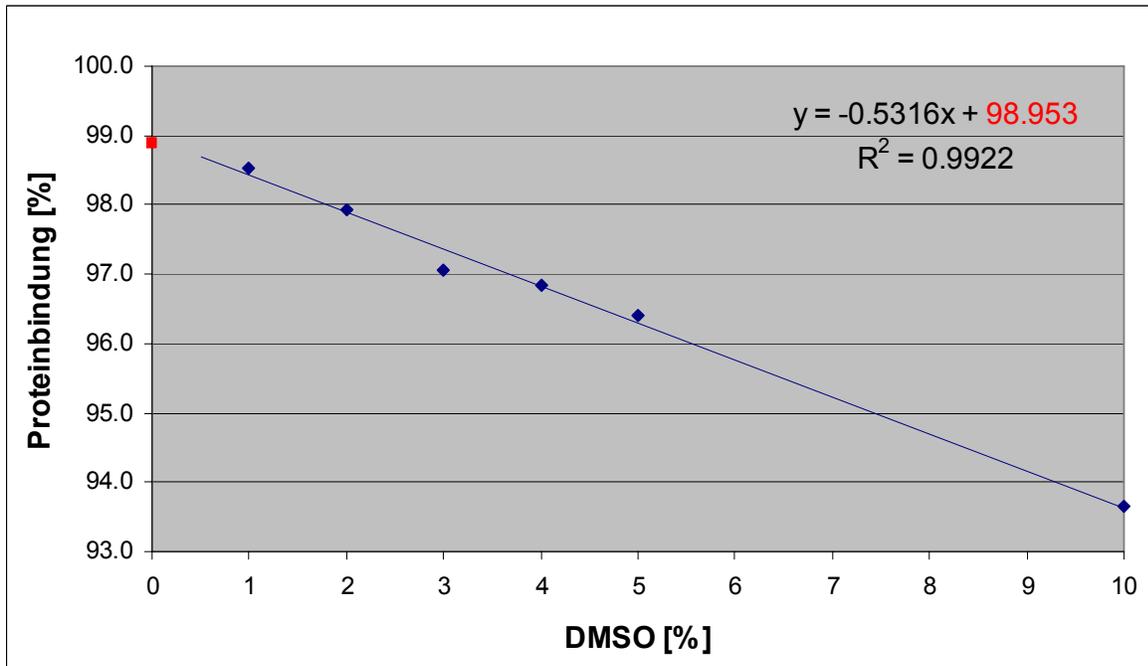


Abbildung 39: Proteinbindung von Candesartan in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration; ■ = Proteinbindungswert ohne DMSO (s.4.1.2)

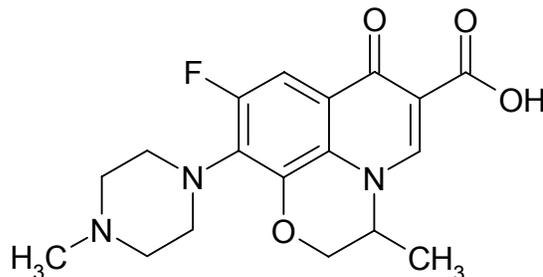
4.4.3 Ofloxacin

Summenformel: $C_{18}H_{20}FN_3O_4$

Molare Masse: 361,4 g/mol

Messwellenlänge: 335 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 18 -22 mg/l



Proteinbindung ohne DMSO: $55,5\% \pm 7,8$ ^[122]; $56,8\%$ ^[141] (jeweils BSA)

Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Proteinbindung Ofloxacin | | | | | | |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | | | |
| Lauf | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 10 |
| 1 | 56.4 | 38.9 | 43.3 | 41.7 | 52.3 | 54.1 |
| 2 | 46.4 | 34.8 | 48.7 | 69.6 | 55.3 | 52.6 |
| 3 | 65.2 | 61.9 | 32.0 | 51.6 | 55.9 | 39.0 |
| 4 | 52.8 | 50.6 | 39.5 | 58.7 | 58.3 | 40.6 |
| 5 | 53.9 | 39.3 | 31.6 | 56.2 | 68.4 | 50.0 |
| Durchschnitt | 54.9 | 45.1 | 39.0 | 55.6 | 58.0 | 47.2 |
| sdv | 6.85 | 11.04 | 7.38 | 10.19 | 6.18 | 7.02 |
| rel sdv [%] | 12.48 | 24.47 | 18.90 | 18.34 | 10.66 | 14.85 |

| Durchschnittliche Bindungskonstanten | | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 10 |
| pK₁ | 3.3 ± 0.1 | 3.3 ± 0.1 | 3.0 ± 0.3 | 2.9 ± 0.1 | 3.3 ± 0.3 | 3.3 ± 0.1 |
| pK₂ | 2.6 ± 0.2 | 2.6 ± 0.3 | 2.6 ± 0.1 | 2.5 ± 0.2 | 2.2 ± 0.7 | 2.5 ± 0.8 |

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Messungen mit Candesearten konnte bei den Experimenten mit Ofloxacin keine Korrelation zwischen DMSO-Gehalt und Proteinbindung festgestellt werden. Bei einem DMSO-Anteil von 1-3% sinkt die Proteinbindung zwar kontinuierlich, allerdings konnte diese Tendenz bei den Ansätzen mit 4, 5 und 10% DMSO nicht bestätigt werden. Im Vergleich zu den anderen Ansätzen, bei denen die Standardabweichungen in einem normalen Bereich liegen, sind diese bei 2 und 4% DMSO-Zusatz leicht erhöht.

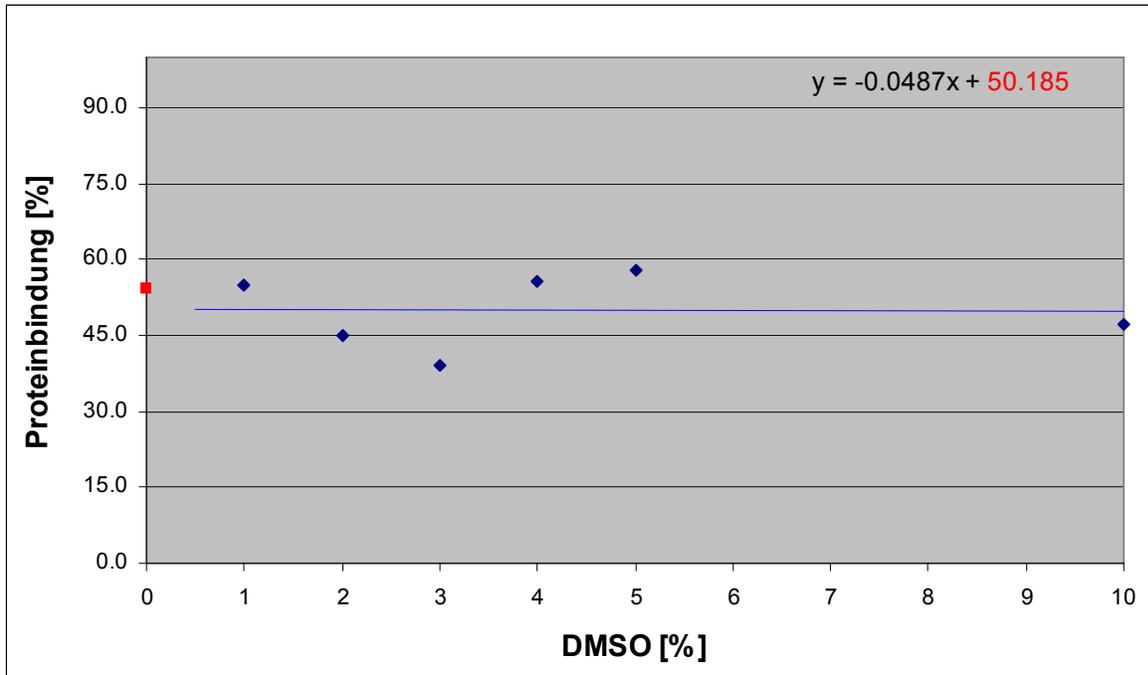


Abbildung 40: Proteinbindung von Ofloxacin in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration; ■ = Proteinbindungswert ohne DMSO (s.4.5.3)

Die Mittelwerte liegen, bis auf den Ansatz mit 3% DMSO, alle im Bereich des angegebenen Literaturwertes. Dementsprechend ergibt die Extrapolation durch die Mittelwerte, mit einem Wert von 50,2%, auch hier eine relativ gute Übereinstimmung mit dem Messwert ohne DMSO.

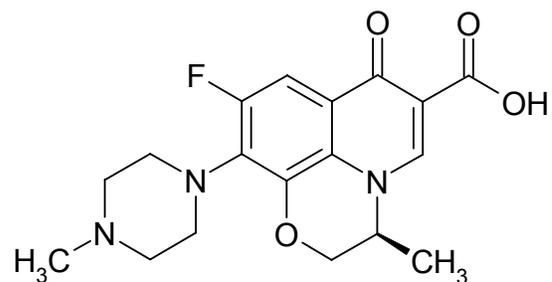
4.4.4 Levofloxacin

Summenformel: $C_{18}H_{20}FN_3O_4$

Molare Masse: 361,4 g/mol

Messwellenlänge: 335 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 16 -24 mg/l



Proteinbindung ohne DMSO: 49,0% \pm 8,2 ^[122]; 38,9% ^[141](jeweils BSA)

Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Proteinbindung Levofloxacin | | | | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | | | |
| Lauf | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 10 |
| 1 | 54.4 | 44.5 | 55.8 | 63.9 | 31.9 | 61.8 |
| 2 | 48.7 | 37.7 | 38.2 | 43.5 | 48.0 | 61.4 |
| 3 | 68.8 | 45.6 | 40.5 | 53.6 | 47.7 | 61.4 |
| 4 | 61.7 | 36.6 | 61.4 | 38.5 | 52.1 | 44.1 |
| 5 | 61.0 | 45.7 | 49.0 | 52.1 | 52.2 | 67.7 |
| Durchschnitt | 58.9 | 42.0 | 49.0 | 50.3 | 46.4 | 59.3 |
| sdv | 7.67 | 4.49 | 9.88 | 9.82 | 8.37 | 8.90 |
| rel sdv [%] | 13.02 | 10.70 | 20.18 | 19.51 | 18.05 | 15.02 |

| Durchschnittliche Bindungskonstanten | | | | | | |
|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 10 |
| pK₁ | 3.4 \pm 0.2 | 3.0 \pm 0.1 | 3.2 \pm 0.2 | 3.1 \pm 0.1 | 3.0 \pm 0.1 | 3.3 \pm 0.3 |
| pK₂ | 1.6 | 2.0 \pm 0.5 | 2.2 \pm 0.1 | 2.8 \pm 0.3 | 2.6 \pm 0.2 | 2.7 \pm 0.3 |

Wie zu erwarten spielt die Chiralität der Substanzen hier keine Rolle, dementsprechend war auch bei Levofloxacin kein Zusammenhang zwischen Proteinbindung und DMSO-Konzentration der Wirkstofflösung zu erkennen. Die Mittelwerte schwanken hier zwischen 42,0% (2% DMSO) und 59,3% (10% DMSO). Somit liegen auch hier die meisten erhaltenen Ergebnisse in einem Bereich, der dem Literaturwert entspricht. Der „0%-Wert“ aus der Extrapolation durch die

Mittelwerte (s. Abbildung 41) ergibt sich zu 47,6%, was dem Literaturwert von 49,0% erneut sehr nahe kommt.

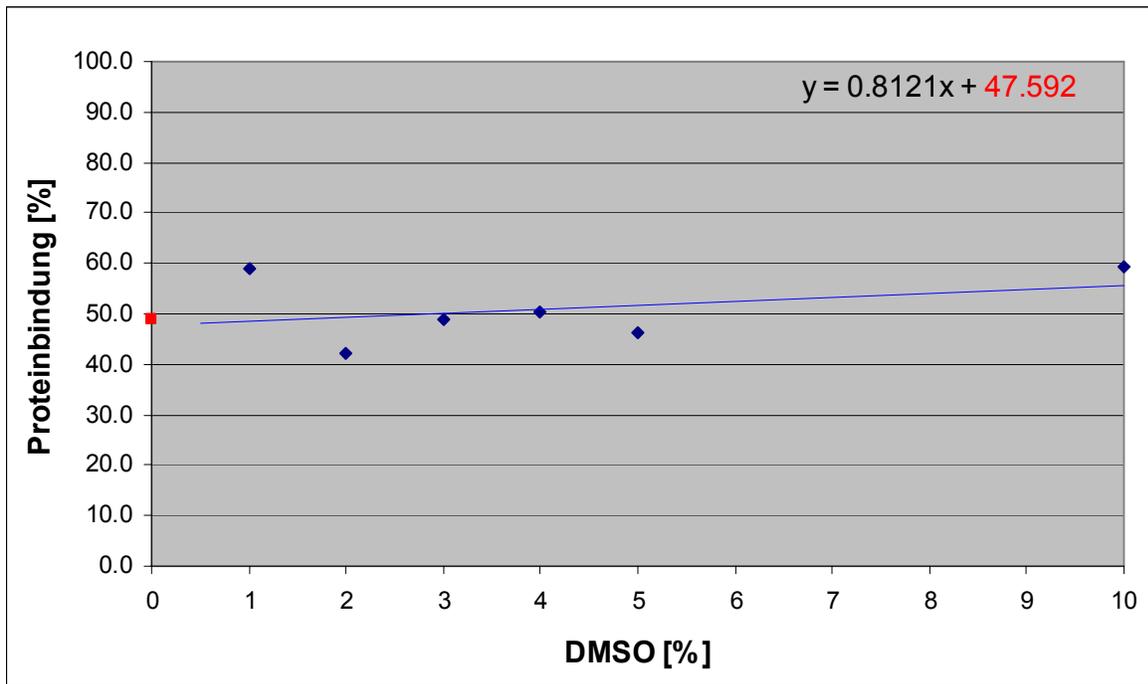


Abbildung 41: Proteinbindung von Levofloxacin in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration; ■ = Proteinbindungswert ohne DMSO (49,0% s. [122])

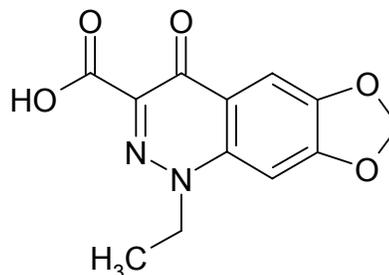
4.4.5 Cinoxacin

Summenformel: $C_{12}H_{10}N_2O_5$

Molare Masse: 262,2 g/mol

Messwellenlänge: 340 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 18 -20 mg/l



Proteinbindung ohne DMSO: 66,9% \pm 4,2 ^[122] (BSA); 65% - 71 ^[177] (Plasma)

Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Proteinbindung Cinoxacin | | | | |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | |
| Lauf | 1 | 3 | 5 | 10 |
| 1 | 70.2 | 64.7 | 71.3 | 75.7 |
| 2 | 72.8 | 64.4 | 52.3 | 52.8 |
| 3 | 80.7 | 63.9 | 52.4 | 71.5 |
| 4 | 78.3 | 52.7 | 52.8 | 74.6 |
| 5 | 56.5 | 53.0 | 52.8 | 75.3 |
| 6 | 77.8 | 74.4 | 63.0 | 74.5 |
| 7 | 79.7 | 73.8 | 52.2 | 65.1 |
| 8 | 74.7 | 53.8 | 69.4 | 58.2 |
| Durchschnitt | 73.8 | 62.6 | 58.3 | 68.5 |
| sdv | 7.87 | 8.80 | 8.31 | 8.84 |
| rel sdv [%] | 10.66 | 14.06 | 14.26 | 12.91 |

| Durchschnittliche Bindungskonstanten | | | | |
|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | |
| | 1 | 3 | 5 | 10 |
| pK₁ | 3.7 \pm 0.2 | 3.5 \pm 0.3 | 3.3 \pm 0.2 | 3.5 \pm 0.2 |
| pK₂ | 3.1 \pm 0.2 | 2.6 \pm 0.3 | 2.1 \pm 0.4 | 3.3 \pm 0.0 |

Da die Veränderung der Proteinbindung in den Experimenten mit Ofloxacin und Levofloxacin keine durchgängige Tendenz zeigte, wurden bei den Messungen mit Cinoxacin und Ciprofloxacin (s. 4.4.6) nur noch die Versuchsansätze mit 1, 3, 5 und 10% DMSO durchgeführt.

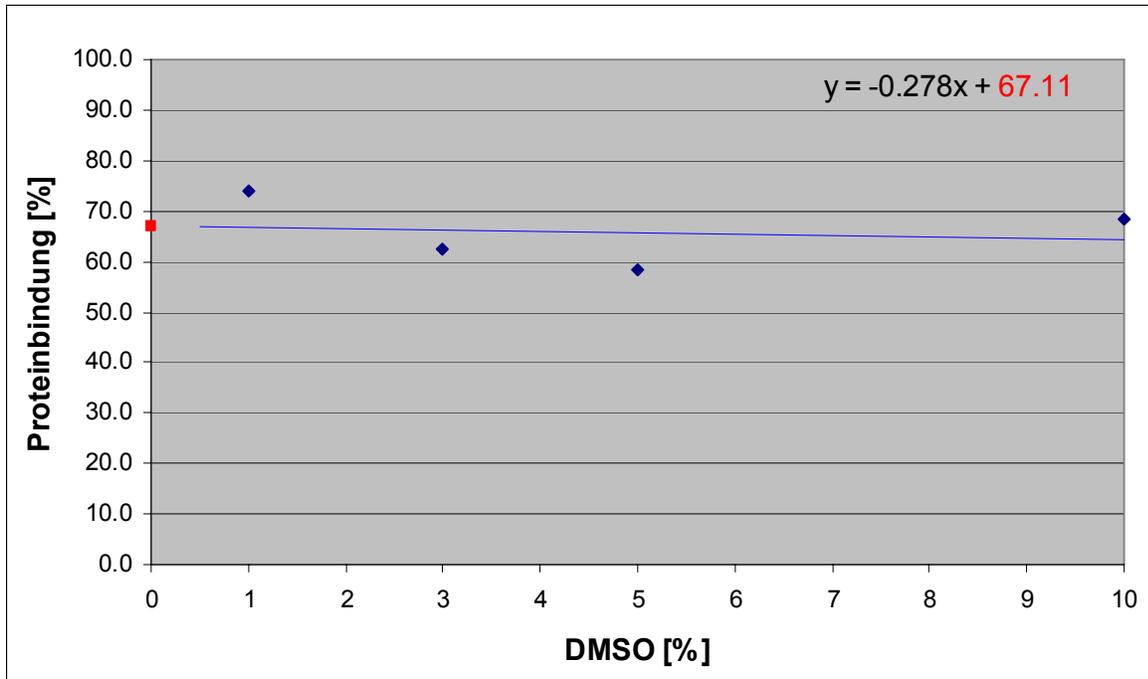


Abbildung 42: Proteinbindung von Cinoxacin in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration;
■ = Proteinbindungswert ohne DMSO (66,9% s. [122])

Von 1-5% DMSO-Gehalt wurde hier eine stetig abfallende Proteinbindung vermessen. Der Wert, der aus den Ansätzen mit 10% DMSO erhalten wurde, konnte diese Tendenz allerdings nicht bestätigen. Die Standardabweichungen der einzelnen Ansätze lagen im normalen Bereich. Die lineare Regression ergab den Schnittpunkt mit der y-Achse zu 67,1%, was dem Proteinbindungswert ohne den Zusatz von DMSO (66,9%) entspricht.

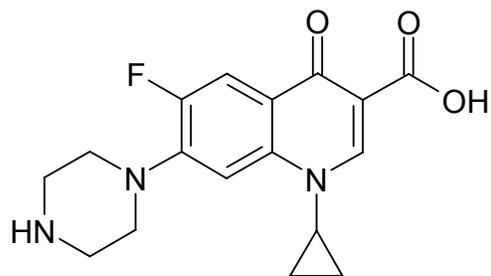
4.4.6 Ciprofloxacin

Summenformel: $C_{17}H_{18}FN_3O_3$

Molare Masse: 331,4 g/mol

Messwellenlänge: 325 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 18 -22 mg/l



Proteinbindung ohne DMSO: 18,7% ^[141](BSA); 21,9% ± 4,1 ^[176](Plasma)

Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| Proteinbindung Ciprofloxacin | | | | |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | |
| Lauf | 1 | 3 | 5 | 10 |
| 1 | 20.4 | 32.3 | 37.9 | 32.7 |
| 2 | 38.6 | 30.2 | 37.0 | 32.7 |
| 3 | 15.4 | 38.3 | 29.1 | 31.7 |
| 4 | 14.3 | 40.2 | 28.0 | 30.5 |
| 5 | 15.6 | 32.6 | 12.5 | 22.4 |
| 6 | 27.1 | 32.7 | 12.9 | 24.2 |
| 7 | 27.4 | 42.6 | 17.2 | 37.4 |
| 8 | --- | 27.7 | 17.4 | --- |
| Durchschnitt | 22.7 | 34.6 | 24.0 | 30.2 |
| sdv | 8.88 | 5.20 | 10.35 | 5.22 |
| rel sdv [%] | 39.12 | 15.04 | 43.12 | 17.28 |

| Durchschnittliche Bindungskonstanten | | | | |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Gehalt DMSO [%] | | | | |
| | 1 | 3 | 5 | 10 |
| pK₁ | 2.4 ± 0.3 | 2.8 ± 0.1 | 2.5 ± 0.3 | 2.6 ± 0.2 |
| pK₂ | 2.1 ± 0.2 | 2.5 ± 0.2 | 2.1 ± 0.1 | 2.4 ± 0.1 |
| pK₃ | 1.8 ± 0.1 | 2.0 | --- | 2.0 |

Im Gegensatz zu allen anderen vermessenen Stoffen wurden bei den Messungen mit Ciprofloxacin in allen vier Ansätzen Proteinbindungswerte erhalten, die den Literaturwert übertreffen. Bei den anderen Stoffen war die erhaltene Proteinbindung nach dem DMSO-Zusatz meist erniedrigt. Unabhängig davon

waren die Ergebnisse der einzelnen Ansätze relativ schwankend, die Mittelwerte bewegten sich zwischen 22,7% (1% DMSO) und 34,6% (3% DMSO). Dennoch ergab die Extrapolation mit 25,8% bei 0% DMSO wiederum eine relativ gute Näherung zu den Literaturwerten, die mit 18,7% bzw. 21,9% notiert sind.

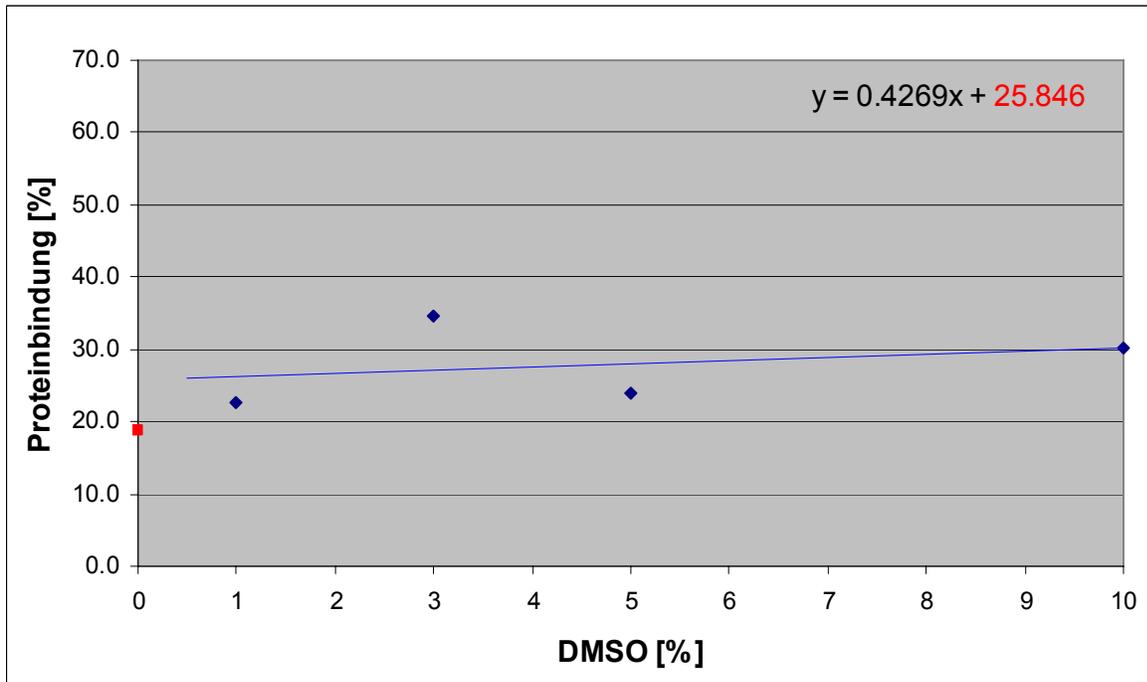


Abbildung 43: Proteinbindung von Ciprofloxacin in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration; ■ = Proteinbindungswert ohne DMSO (18,7% s. [141])

4.4.7 Aziridine

4.4.7.1 112 C

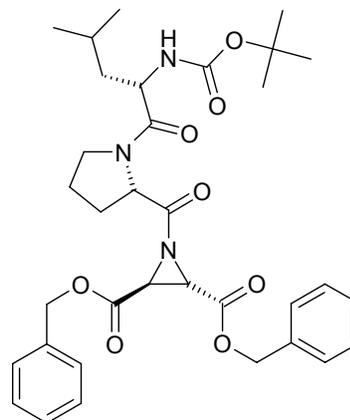
Summenformel: $C_{34}H_{43}N_3O_8$

Molare Masse: 621,7 g/mol

Messwellenlänge: 242 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 20-25 mg/l

DMSO-Konzentration der Wirkstofflösung: 4%



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 23.8 | 2.72 | --- | --- |
| 2 | 31.4 | 2.67 | 2.47 | --- |
| 3 | 42.6 | 3.09 | --- | --- |
| 4 | 24.3 | 2.40 | 2.23 | 2.05 |
| Mittelwert | 30.5 | 2.7 | 2.3 | 2.1 |
| sdv | 8.7 | 0.3 | 0.2 | --- |
| rel sdv [%] | 28.6 | 10.4 | 7.2 | --- |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ | pK ₃ |
| 1 | 24.5 | 2.7327 | --- | --- |
| 2 | 27.5 | 2.8008 | --- | --- |
| 3 | 41.4 | 3.071 | --- | --- |
| 4 | 19.6 | 2.6099 | --- | --- |
| Mittelwert | 28.2 | 2.8 | --- | --- |
| sdv | 9.3 | 0.2 | --- | --- |
| rel sdv [%] | 33.1 | 7.0 | --- | --- |

4.4.7.2 334 C

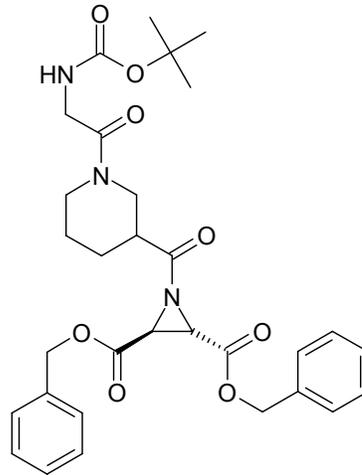
Summenformel: C₃₁H₃₇N₃O₈

Molare Masse: 579,7 g/mol

Messwellenlänge: 254 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 20-25 mg/l

DMSO-Konzentration der Wirkstofflösung: 4%



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 19.8 | 2.39 | 2.22 |
| 2 | 33.2 | 2.92 | --- |
| 3 | 46.6 | 3.16 | --- |
| 4 | 22.5 | 2.46 | 2.29 |
| Mittelwert | 30.5 | 2.7 | 2.3 |
| sdv | 12.2 | 0.4 | 0.1 |
| rel sdv [%] | 40.0 | 13.5 | 2.2 |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 18.8 | 2.59 | --- |
| 2 | 33.2 | 2.92 | --- |
| 3 | 46.0 | 3.15 | --- |
| 4 | 18.9 | 2.59 | --- |
| Mittelwert | 29.2 | 2.8 | --- |
| sdv | 13.1 | 0.3 | --- |
| rel sdv [%] | 44.7 | 9.8 | --- |

4.4.8 Diskussion

Obwohl bekannt ist, dass DMSO Proteine denaturieren kann, wird DMSO in vielen Bereichen der Naturwissenschaften als eine Art Standardlösungsmittel verwendet. DMSO kann allerdings nicht nur in hohen Konzentrationen Auswirkungen auf Proteine haben. Wie *Yang* zeigen konnte, hatten schon 2,5% (V/V) DMSO einen Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften der NAD^+ -Synthetase sowie auf deren Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer.^[174] *Tjernberg* konnte ähnliche Effekte auf das Enzym PFKFB1 (6-Phosphofructo-2-kinase/Fruktose-2,6-bisphosphatase 1) bzw. auf den Rezeptor des menschlichen Wachstumshormons Somatotropin (hGHpb) bei DMSO-Konzentrationen von 0,5-2% (V/V) feststellen. Auch die Bindungsaffinität von Liganden an hGHpb wurde durch niedrige DMSO-Anteile herabgesetzt.^[175] *Papadopoulou* untersuchte innerhalb ihrer fluoreszenzspektroskopischen Versuche den Einfluss von DMSO auf BSA. Bei einem DMSO-Gehalt der Substanzlösungen von 10% konnte keine Effekte auf das Protein festgestellt werden.^[178]

Im Vergleich hierzu, führte der Zusatz von DMSO zu den Substanzlösungen bei der Bestimmung der Proteinbindung zu unterschiedlich stark schwankenden Mittelwerten innerhalb der einzelnen Ansätze. Abgesehen von den Versuchen mit Candesartan konnte keine lineare Korrelation zwischen DMSO-Gehalt und erhaltener Proteinbindung festgestellt werden. Bei allen anderen Messserien war keine kontinuierliche Tendenz bezüglich der Veränderung der Proteinbindung festzustellen. Die erhaltenen Mittelwerte der einzelnen Ansätze schwankten unabhängig von der DMSO-Konzentration in unterschiedlichem Ausmaß um die Referenzwerte. In den meisten Fällen lagen die erhaltenen Mittelwerte aber in einem Bereich, der den Werten ohne DMSO-Zusatz entsprach. Trotz der schwankenden Mittelwerte, zeigten die Standardabweichungen, die in allen Fällen im akzeptablen Bereich lagen, eine gute Reproduzierbarkeit. Betrachtet man die Ergebnisse über den gesamten Bereich der DMSO-Konzentrationen von 1-10%, ergibt eine Extrapolation auf den 0%-Wert in allen Fällen eine sehr gute

Übereinstimmung mit den Literaturwerten. Dementsprechend kann also die Proteinbindung von wasserunlöslichen Substanzen trotz des Einflusses des DMSO mit relativ hoher Genauigkeit bestimmt werden. Da der Einfluss des DMSO auf das verwendete Albumin aber auch bei niedrigen DMSO-Anteilen nicht auszuschließen ist, sollten nach Möglichkeit Messungen mit verschiedenen DMSO-Anteilen durchgeführt werden, um den Bereich der Proteinbindung des jeweiligen Stoffes am besten bestimmen zu können.

Die Proteinbindungen der vermessenen Aziridine lagen beide im mittleren Bereich von etwa 30%.

4.5 NMR-Diffusions- und Relaxationsexperimente zur Bestimmung der Proteinbindung im Vergleich mit der kontinuierlichen Ultrafiltration

4.5.1 Allgemeines

Neben den klassischen Methoden, die zur Bestimmung der Proteinbindung verwendet werden, kann auch die NMR-Spektroskopie zur Beschreibung von Wirkstoff-Protein-Interaktionen herangezogen werden. Da sich der Diffusionskoeffizient eines Wirkstoffes bei der Bindung an ein Makromolekül, wie beispielsweise Albumin, verändert, können Diffusionsmessungen zur Ermittlung der Dissoziationskoeffizienten verwendet werden.^[107,108] Neben den Diffusionsmessungen kann die Bestimmung der Relaxationszeit T_1 ebenfalls zur Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Protein eingesetzt werden.^[109]

In diesem Zusammenhang wurden in unserer Arbeitsgruppe mittels NMR-Spektroskopie Proteinbindungsstudien mit drei Gyrasehemmern, Nalidixinsäure, Ofloxacin und Gatifloxacin durchgeführt.^[112] Die Dissoziationskonstanten K_D bezüglich BSA wurden mit T_1 -Relaxationsmessungen und Diffusionsmessungen bestimmt. Zusätzlich wurden mit den Relaxationsmessungen noch die Affinitätsindices der Substanzen bestimmt. Um die so erhaltenen Daten mit einer zweiten Methode zu vergleichen, wurde die Proteinbindung der drei Wirkstoffe ebenfalls mit der kontinuierlichen Ultrafiltration bestimmt, die Gegenstand dieser Arbeit ist.

4.5.2 Nalidixinsäure

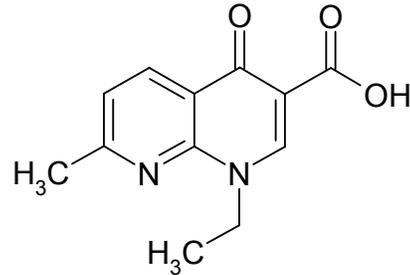
Summenformel: $C_{12}H_{12}N_2O_3$

Molare Masse: 232,2 g/mol

Messwellenlänge: 334 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 13-16 mg/l

Literaturwerte: $94,4\% \pm 2,7$ ^[122] (BSA), $93,0 - 96,0\%$ ^[177] (Plasma)



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 94.3 | 4.43 | 2.83 |
| 2 | 96.5 | 4.63 | 3.46 |
| 3 | 97.3 | 4.77 | 3.26 |
| 4 | 98.2 | 4.96 | --- |
| 5 | 96.2 | 4.62 | 2.89 |
| 6 | 99.1 | 5.25 | --- |
| 7 | 97.7 | 4.85 | --- |
| 8 | 94.2 | 4.40 | 3.27 |
| 9 | 93.3 | 4.35 | 3.01 |
| Mittelwert | 96.3 | 4.7 | 3.1 |
| sdv | 2.0 | 0.3 | 0.2 |
| rel sdv [%] | 2.1 | 6.3 | 7.9 |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 94.0 | 4.42 | 3.05 |
| 2 | 96.2 | 4.62 | 3.58 |
| 3 | 97.5 | 4.82 | --- |
| 4 | 98.1 | 4.93 | --- |
| 5 | 95.2 | 4.63 | 2.87 |
| 6 | 98.2 | 4.95 | --- |
| 7 | 97.3 | 4.78 | --- |
| 8 | 94.8 | 4.48 | --- |
| 9 | 92.8 | 4.33 | 3.22 |
| Mittelwert | 96.0 | 4.7 | 3.2 |
| sdv | 1.9 | 0.2 | 0.3 |
| rel sdv [%] | 2.0 | 4.8 | 9.5 |

4.5.3 Ofloxacin

Struktur, allgemeine Angaben etc. s 4.4.3

Proteinbindung ohne DMSO: $55,5\% \pm 7,8$ ^[122]; $56,8\%$ ^[141](jeweils BSA)

Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 49.0 | 3.20 | --- |
| 2 | 59.5 | 3.39 | --- |
| 3 | 55.6 | 3.20 | 2.71 |
| 4 | 60.1 | 3.18 | 3.00 |
| 5 | 47.6 | 3.07 | 2.53 |
| 6 | 47.1 | 2.95 | 2.77 |
| 7 | 46.4 | 3.14 | 1.84 |
| 8 | 61.4 | 3.40 | 2.13 |
| 9 | 61.1 | 3.39 | 2.25 |
| Mittelwert | 54.2 | 3.2 | 2.5 |
| sdv | 6.6 | 0.2 | 0.4 |
| rel sdv [%] | 12.1 | 4.8 | 16.5 |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 48.7 | 3.20 | --- |
| 2 | 58.8 | 3.38 | --- |
| 3 | 55.6 | 3.26 | --- |
| 4 | 60.7 | 3.41 | --- |
| 5 | 46.6 | 3.16 | --- |
| 6 | 45.6 | 3.15 | --- |
| 7 | 46.6 | 3.16 | --- |
| 8 | 61.4 | 3.42 | --- |
| 9 | 61.2 | 3.42 | --- |
| Mittelwert | 53.9 | 3.3 | --- |
| sdv | 6.9 | 0.1 | --- |
| rel sdv [%] | 12.8 | 3.7 | --- |

4.5.4 Gatifloxacin

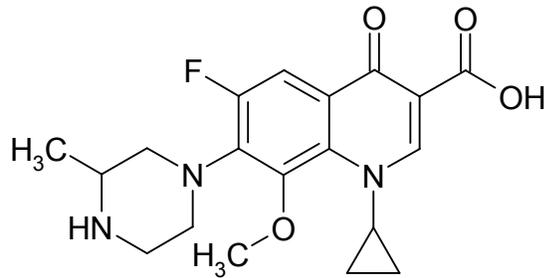
Summenformel: $C_{19}H_{22}FN_3O_4$

Molare Masse: 375,4 g/mol

Messwellenlänge: 290 nm

Eingesetzte Konzentrationen: 15-20 mg/l

Literaturwerte: $13,9\% \pm 5,4$ ^[122] (BSA), $20\% \pm 5$ ^[179] (Plasma)



Messungen mit bovinem Serumalbumin:

| UNABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 38.0 | 2.79 | 2.61 |
| 2 | 29.3 | 2.63 | 2.43 |
| 3 | 27.1 | 2.79 | --- |
| 4 | 40.2 | 2.88 | 2.56 |
| 5 | 48.2 | 2.97 | 2.79 |
| 6 | 36.8 | 2.99 | --- |
| 7 | 22.1 | 2.67 | --- |
| 8 | 25.6 | 2.76 | --- |
| Mittelwert | 33.4 | 2.8 | 2.6 |
| sdv | 8.8 | 0.1 | 0.1 |
| rel sdv [%] | 26.3 | 4.6 | 5.8 |

| ABHÄNGIGE BINDUNGSSTELLEN | | | |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lauf | Proteinbindung | pK ₁ | pK ₂ |
| 1 | 35.6 | 2.96 | --- |
| 2 | 26.1 | 2.77 | --- |
| 3 | 15.6 | 2.49 | --- |
| 4 | 37.2 | 2.99 | --- |
| 5 | 37.2 | 3.00 | --- |
| 6 | 36.9 | 2.99 | --- |
| 7 | 22.0 | 2.67 | --- |
| 8 | 26.3 | 2.77 | --- |
| Mittelwert | 29.6 | 2.8 | --- |
| sdv | 8.3 | 0.2 | --- |
| rel sdv [%] | 28.0 | 6.6 | --- |

4.5.5 Diskussion

Wie in Tabelle 8 zu sehen ist, ergaben die NMR-Experimente von Nalidixinsäure über Ofloxacin zu Gatifloxacin ansteigende k_D -Werte. Da eine kleine Dissoziationskonstante im Umkehrschluss einer hohen Affinität zum Protein entspricht, wurde für die Nalidixinsäure dementsprechend der höchste Affinitätsindex ermittelt. Der geringste Affinitätsindex wurde folglich für Gatifloxacin erhalten. Obwohl sich die absoluten Werte je nach Messmethode unterscheiden, konnte dieser Trend durch die Messungen mittels kontinuierlicher Ultrafiltration bestätigt werden. In Übereinstimmung mit den Literaturwerten wurde für Nalidixinsäure eine sehr hohe Proteinbindung von 96,2% gemessen. Ofloxacin lag mit 54,2% im mittleren Bindungsbereich, während Gatifloxacin mit 33,4% den Substanzen mit niedriger Proteinbindung zuzuordnen ist. Die zugehörigen pK-Werte bestätigen ebenfalls die Ergebnisse aus den NMR-Experimenten.

Tabelle 8: Vergleich der k_D -Werte aus den NMR-Messungen^[12] und den Ergebnissen der kontinuierlichen Ultrafiltration

| | | Nalidixinsäure | Ofloxacin | Gatifloxacin |
|------------------------------------|--------------------------------------------|----------------|------------|---------------------|
| kontinuierliche Ultrafiltration | Proteinbindung [%] | 96.2 ± 2.0 | 54.2 ± 6.6 | 33.4 ± 8.8 |
| | pK | 4.7 ± 0.3 | 3.2 ± 0.2 | 2.8 ± 0.1 |
| NMR-Spektroskopie | K_D -Werte [mM] Diffusionsexperimente | 0.40 | 2.56 | 13.88 |
| | K_D -Werte [mM] Relaxationsmessungen | 1.11 | 3.16 | nicht bestimmbar |
| | Affinitätsindices | ~ 33600 | ~ 14800 | ~ 13900 |

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ausmaß der Proteinbindung eines Arzneistoffs wirkt sich auf viele unterschiedliche pharmakokinetische Parameter aus. So wird beispielsweise das Verteilungsvolumen, die Metabolisierung oder die Elimination des entsprechenden Stoffes durch die Höhe seiner Proteinbindung beeinflusst. Da nur der im Plasma frei vorliegende Anteil eines Arzneistoffs in der Lage ist biologische Membranen zu überwinden, können auch nur die freien Arzneistoffmoleküle eine pharmakologische Wirkung an Rezeptoren oder Enzymen auslösen. Dementsprechend ist auch die Intensität der hervorgerufenen Wirkung von der Größe des ungebundenen Anteils eines Arzneistoffs abhängig. Aufgrund dieser Zusammenhänge ist klar, dass die Proteinbindung eines Arzneistoffes letztendlich Einfluss auf die Dosisfindung hat.

Zur Ermittlung der Proteinbindung stehen viele unterschiedliche Methoden, wie beispielsweise die HPLC, Kapillarelektrophorese, Ultrazentrifugation, Gleichgewichtsdialyse und Ultrafiltration zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde die kontinuierliche Ultrafiltration zur Ermittlung der Proteinbindung von Arzneistoffen angewendet. Hier wird die Proteinbindung nicht nur anhand einer bestimmten Arzneistoff- bzw. Albuminkonzentration gemessen, sondern über einen weiteren Bereich von Wirkstoff-Protein-Verhältnissen beobachtet. Des Weiteren ist der apparative Aufwand im Vergleich zu vielen anderen Methoden als geringer einzustufen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, die auf der von *Heinze*^[122] entwickelte Messanlage weiter optimiert und eine zweite Anlage mit einem Diodenarraydetektor aufgebaut. Für letztere musste eine Software-Anpassung vorgenommen werden.

Folgende Projekte wurden durchgeführt:

- 1) Um den *In-vivo*-Bedingungen nahe zu kommen, wurde bei der Bestimmung der Proteinbindung der Sartane nicht nur BSA und HSA verwendet, sondern erstmals auch humanes Plasma. Die Plasmamessungen der Sartane verliefen insgesamt problemlos, allerdings ist eine erfolgreiche Messung stark von der Qualität des eingesetzten Plasmas abhängig, wie Messungen der Naphthylisochinoline gezeigt haben. Im Vergleich mit HSA und Plasma ergaben die Messungen der Sartane mit

bovinem Serumalbumin geringfügig erniedrigte Proteinbindungswerte. Insgesamt sind alle Ergebnisse sehr gut mit den Literaturwerten vergleichbar.

2) Das Ausmaß der Proteinbindung von Naphthylisochinolinen war bislang unbekannt und lag im Bereich von ca. 30-70%. Erneut waren die Resultate aus den Messungen von BSA und HSA nahezu gleich.

3) Am Beispiel der Interaktion zwischen Phenprocoumon und Phenylbutazon wurden zwei unterschiedliche Ansätze getestet, um die Verdrängung aus der Proteinbindung zu simulieren. Die erste Methode entsprach hierbei einer Konkurrenz der beiden interagierenden Stoffe um die Proteinbindungsstellen. Durch den Einfluss des Phenylbutazon verringerte sich die Proteinbindung des Phenprocoumon um 1%, was allerdings als statistisch nicht signifikant betrachtet werden kann. Im zweiten Ansatz, der eine direktere Verdrängung aus der Proteinbindung simulieren sollte, fiel die Proteinbindung des Phenprocoumon gegenüber den Einzelmessungen um 2,5% ab. Unter physiologischen Konzentrationsverhältnissen sank sich die Proteinbindung des Phenprocoumon auf 93,3%. Der freie Anteil erhöhte sich dementsprechend von 1% auf 6,7%. Somit konnte der Einfluss des Phenylbutazon auf die Proteinbindung des Phenprocoumon erfolgreich nachgewiesen werden. Die unveränderte Proteinbindung des Phenylbutazon im inversen Ansatz und die ermittelten pK-Werte bestätigen diese Interaktion. Grundsätzlich ist es also möglich mit der kontinuierlichen Ultrafiltration solche Interaktionen zu simulieren.

4) Zuletzt sollte der Frage nachgegangen werden, ob es mit der kontinuierlichen Ultrafiltration auch möglich ist die Proteinbindung von wasserunlöslichen Stoffen, nämlich den Aziridinen, in Gegenwart steigender Mengen DMSO, zu bestimmen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit Literaturwerten ohne DMSO-Zusatz verglichen. Abgesehen von Candesartan, das eine lineare Korrelation zwischen DMSO-Gehalt der Wirkstofflösung und Absinken der Proteinbindung zeigte, konnte kein Zusammenhang zwischen der DMSO-Konzentration und der gemessenen Proteinbindung festgestellt werden. Die Mittelwerte lagen im Bereich der Literaturwerte.

Insgesamt zeigten alle Versuchsreihen, dass die kontinuierliche Ultrafiltration eine ausgezeichnete, schnelle und robuste Screeningmethode zur Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung bekannter und neuer Wirkstoffe darstellt.

6 SUMMARY

The extent of protein binding has an impact on many pharmacokinetic parameters, e.g. absorption, distribution volume, metabolism or elimination of a drug. Since only the unbound fraction of a drug can penetrate through biological membranes, only the free drug molecules can induce a pharmacological effect on receptors or enzymes. According to that, the intensity of the effect depends also on the extent of the free drug fraction. Finally, knowledge about the extent of protein binding of a drug is important for the dosage finding.

There are many different methods described for the evaluation of the extent of protein binding of a drug, like HPLC, capillary electrophoresis, ultracentrifugation, equilibrium dialysis and ultrafiltration. In this study the continuous ultrafiltration was used to determine the extent of protein binding of drugs. Compared to the discontinuous ultrafiltration, the extent of protein binding was assessed over a wide range of drug-protein-ratios and not only with one defined drug respectively albumin concentration.

Here the ultrafiltration instrument described by *Heinze*^[122], was modified and a second system with a multiwavelength detector was established. In this context the software was adapted in a few details.

The following experiments were performed:

1) To get close to *in vivo* conditions, the extent of protein binding of the sartans was determined for the first time by means of human plasma in addition to experiments with HSA and BSA. In general, the evaluation of the protein binding was not problematic. Nevertheless the experiments with the naphthylisoquinolines showed, that a successful experiment with human plasma depends on the quality of the plasma. Compared to the measurements with human serum albumin and plasma, the determination of the protein binding of the sartans with bovine serum albumin showed slightly lower protein binding values. However, the extent of the protein binding of the sartans with BSA, HSA and plasma was in good accordance to values reported in the literature.

2) The extent of the protein binding of the naphthylisoquinolines was unknown so far, and was found to be in the range between 30-70%. Once more, the results of the experiments using BSA were confirmed by the measurements with HSA.

3) To simulate the displacement from the albumin, two different methods have been developed. Due to their well known interaction, phenprocoumon and phenylbutazone were used as test substances. In the first method, the two substances compete for the protein binding sites. Due to the influence of phenylbutazone, the extent of protein binding of phenprocoumon decreased by 1%. However, this decrease is statistically not significant. The second method simulated a direct displacement out of the protein binding. Compared with the single measurements, in this experiments the extent of protein binding of phenprocoumon decreased by 2.5%. With use of a physiological concentration ratio, the protein binding of phenprocoumon decreased from 99.0 to 93.3%. Indicating, that the free fraction of phenprocoumon increased from 1% to 6.7%. Thus, the interaction between the two substances was demonstrated by this method. The constant protein binding of phenylbutazone in the inverse approach and the determined pK-values support this result.

4) Last, the question should be answered, if it is possible to determine the extent of protein binding of water insoluble substances, namely the aziridines, by means of continuous ultrafiltration. For this purpose, five test substances were dissolved in a buffer solution with 1-10% DMSO. The results of the experiments were compared to literature values without DMSO. Candesartan showed a linear correlation between the DMSO-concentration and the extent of protein binding. The results of the other four substances indicated no correlation between the content of DMSO in the solution and the protein binding values. However, in all cases the average values were in accordance to the literature data.

Overall, every project showed, that the continuous ultrafiltration is an excellent, fast and robust screening method for the evaluation of the extent of protein binding of known as well as new substances.

7 ANHANG

7.1 Veröffentlichungen

Ponte-Sucre, A., Gulder, T., Wegehaupt, A., Albert, C., Rikanovic, C., Schaefflein, L., Frank, A., Schultheis, M., Unger, M., Holzgrabe, U., Bringmann, G., Moll, H., *Structure-Activity Relationship and Studies on the Molecular Mechanism of Leishmanicidal N,C-Coupled Arylisoquinolinium Salts*, J. Med. Chem, **2009**, 52 (3), 626-636

Waibel, B., Albert, C., Holzgrabe, U., *Evaluation of the extent of protein binding by means of NMR diffusion and relaxation experiments, and automated continuous ultrafiltration*, Eur. J. Pharm. Sci., **2009**, in press

7.2 Posterpräsentationen – Abstracta

Albert C., Büttner C., Holzgrabe, U., *Determination of the Extent of protein binding of sartans using automated continuous ultrafiltration*, DPhG-Jahrestagung 2005 in Mainz

Albert C., Holzgrabe, U., *Simulation of the Displacement of drugs out of the protein binding using continous ultrafiltration*, DPhG-Jahrestagung 2006 in Marburg

Albert C., Holzgrabe U., *Determination of the Extent of protein binding by means of automated continous ultrafiltration*, Doktorandentagung der DPhG 2006 in Heroldsberg

C. Albert, T. Gulder, G. Bringmann, U. Holzgrabe, *Determination of the extent of protein binding of new substances: N,C-coupled naphthylisoquinolines*, DPhG-Jahrestagung 2007 in Erlangen

C. Albert, T. Gulder, G. Bringmann, U. Holzgrabe, *The extent of protein binding of N,C-coupled naphthylisoquinolines*, DPhG-Jahrestagung 2008 in Bonn

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ Schmidt, R. F., Lang, F., *Physiologie des Menschen*, **2007**, 30. Auflage, Springer, Berlin
- ² Meloun, B., Morávek, L., Kostka, V., *Complete amino acid sequence of human serum albumin*, FEBS Lett., **1975**, 58(1), 134-7
- ³ Dugaiczky, A., Law, S. W., Dennison, O. E., *Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA*, Proc. Natl. Acad. Sci., **1982**, 79, 71-75
- ⁴ He, X.M., Carter, D.C. *Atomic-structure and chemistry of human serum albumin*, Nature, **1992**, 358, 209-215
- ⁵ Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K., *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*, Protein Eng. **1999**, 12, 439-446
- ⁶ Dockal, M., Carter, D.C., Rüker, F., *The three recombinant domains of human serum albumin*, J. Biol. Chem. **1999**, 274, 29303-29310
- ⁷ Bhattacharya, A.A., Curry, S., Franks, N.P., *Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin: High resolution crystal structure*, J. Biol. Chem. **2000**, 275, 38731-38738
- ⁸ Peters, T., *Serum Albumin*, J. Adv. Prot. Chem., **1985**, 37, 161-245
- ⁹ Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., Franks, N., *Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites*, Nat. Struct. Biol., **1998**, 5, 827 - 835

-
- ¹⁰ Jacobsen, J., *Binding of bilirubin to human serum albumin - determination of the dissociation constants*, FEBS Lett., **1969**, 5(2), 112-114
- ¹¹ Sudlow, G., Birkett, D.J., Wade, D.N., *The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin*, Mol. Pharmacol. **1975**, 11, 824-832
- ¹² Sudlow, G., Birkett, D.J., Wade, D.N., *Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin*, Mol. Pharmacol. **1976**, 12, 1052-1061
- ¹³ Sjöholm, I., Ekman, B., Kober, A., Ljungstedt-Påhlman, I., Seiving, B., Sjödin, T., *Binding of Drugs to Human Serum Albumin: XI. The Specificity of Three Binding Sites as Studied with Albumin Immobilized in Microparticles*, Mol. Pharm., **1979**, 16(3), 767-777
- ¹⁴ Fehske, K. J., Schlafer, U., Wollert, U., Muller, W. E., *Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone*, **1982**, 21(2), 387-393
- ¹⁵ Yamasaki, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M., *Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site*, Biochim. Biophys. Act., **1996**, 1295, 147-157
- ¹⁶ Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., Curry, S., *Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin*, J. Mol. Biol., **2005**, 353, 38-52
- ¹⁷ Zhu, L., Yang, F., Chen, L., Meehan, E., Huang, M., *A new drug binding subsite on human serum albumin and drug-drug interaction studied by X-ray crystallography*, J. Struct. Biol., **2008**, 162, 40-49

- ¹⁸ Maruyama, K., Nishigori, H., Iwatsuru, M., *Characterization of the Benzodiazepine Binding Site (Diazepam Site) on Human Serum Albumin*, Chem. Pharm. Bull., **1985**, 33 (11), 5002-5012
- ¹⁹ Yamasaki, K., Maruyama, T., Yoshimoto, K., Tsutsumi, Y., Narazaki, R., Fukuhara, A., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M., *Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect on the neutral-to-base- transition*, Biochim. Biophys. Acta, **1999**, 1432, 313-323
- ²⁰ Dockal, M., Chang, M., Carter, D.C., Rüker, F., *Five recombinant fragments of human serum albumin - tools for the characterization of the warfarin binding site*, Prot. Sci., **2008**, 9 (8), 1455-1465
- ²¹ Kosa, T., Maruyama, T., Otagiri, M., *Species Differences of Serum Albumins: I. Drug Binding Sites*, Pharm. Res., **1997**, 14 (11), 1607-1612
- ²² Schmid, K., *Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma*, J. Am. Chem. Soc., **1950**, 72, 2816
- ²³ Fournier, T., Medjoubi, N., Porquet, D., *Alpha-1-acid glycoprotein*, Biochim. Biophys. Acta, **2000**, 1482, 157-171
- ²⁴ Hocheplied, T., Berger, F. G., Baumann, H., Libert, C., *α_1 -Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties*, Cyt. Grow. Fact. Rev., **2003**, 14, 25-34
- ²⁵ Eap, C. B., Cuendet, C., Baumann, P., *Orosomuroid (alpha-1 acid glycoprotein) phenotyping by use of immobilized pH gradients with 8M urea and immunoblotting*, Hum. Gen., **1988**, 80, 183-185

-
- ²⁶ Tomei, L., Eap, C. B., Baumann, P., Dente, L., *Use of transgenic mice for the characterization of human alpha 1 acid-glycoprotein (orosomuroid) variants*, Hum. Genet., **1989**, 84, 89-91
- ²⁷ Kremer, J. M. H., Wilting, J., Janssen, L. H. M., *Drug Binding to Human Alpha-1-acid Glycoprotein in Health and Disease*, Pharm. Rev., **1988**, 40 (1), 1-47
- ²⁸ Hervé, F., Duché, J.-C., d'Athis, P., Marché, C., Barré, J., Tillement, J.-P., *Binding of disopyramide, methadone, dipyridamole, chlorpromazine, lignocaine and progesterone to the two main genetic variants of human α_1 -acid glycoprotein: evidence for drug-binding differences between the variants and for the presence of two separate drug-binding sites on α_1 -acid glycoprotein*, Pharmacogen., **1996**, 6, 403-415
- ²⁹ Fitos, I., Visy, J., Zsila, F., Bikádi, Z., Mády, G., Simonyi, M., *Specific ligand binding on genetic variants of human α_1 -acid glycoprotein studied by circular dichroism spectroscopy*, Biochem. Pharm., **2004**, 67 (4), 679-688
- ³⁰ Zsila, F., Visy, J., Mády, G., Fitos, I., *Selective plasma protein binding of antimalarial drugs to α_1 -acid glycoprotein*, Bioorg. Med. Chem., **2008**, 16, 3759-3772
- ³¹ Nix, D. E., Matthias, K. R., Ferguson, E. C., *Effect of Ertapenem Protein Binding on Killing of Bacteria*, Antimicrob. Agents Chemother., **2004**, 48 (9), 3419-3424
- ³² Zeitlinger, M., Sauermann, R., Fille, M., Hausdorfer, J., Leitner, I., Müller, M., *Plasma protein binding of fluoroquinolones affects antimicrobial activity*, J., Antimicrob. Chem., **2008**, 61, 561-567

- ³³ Schmidt, S., Röck, K., Sahre, M., Burkhardt, O., Brunner, M., Lobmeyer, M. T., Derendorf, H., *Effect of Protein Binding on the Pharmacological Activity of Highly Bound Antibiotics*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2008**, 52 (11), 3994-4000
- ³⁴ Derendorf, H., Gramatté, T., Schäfer, H.G., *Pharmakokinetik – Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie*. **2002**, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- ³⁵ Rolan, P.E., *Plasma protein binding displacement interactions – why are they still regarded as clinically important?* *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, 37, 125-128
- ³⁶ Benet, L. Z., Hoener, B., *Changes in plasma protein binding have little clinical relevance*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2002**, 71 (3), 115-121
- ³⁷ Scatchard, G., *The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1949**, 51, 660-672
- ³⁸ Oravcova, J., Böhs, B., Lindner, W., *Drug-protein binding studies: New trends in analytical and experimental methodology*, *J. Chromatogr. B*. **1996**, 677, 1-28
- ³⁹ Wright, J.D., Boudinot, F.D., Ujhelyi, M.R., *Measurement and analysis of unbound drug concentrations*, *Clin. Pharmacol.* **1996**, 30, 445-462
- ⁴⁰ Elmquist, W. F., Sawchuk, R. J., *Application of Microdialysis in Pharmacokinetic Studies*, *Pharm. Res.*, **1997**, 14 (3), 267-288
- ⁴¹ Tsai, T.H., *Assaying protein unbound drugs using microdialysis techniques*. *J. Chromatogr. B*. **2003**, 797, 161-173

-
- ⁴² Ping, L., Müller, M., Grant, M., Obermann, B., Derendorf, H., *Tissue penetration of cefpodoxime and cefixime in healthy subjects*, J. Clin. Pharm., **2005**, 45, 564-569
- ⁴³ Höcht, C., Opezso J. A. P., Taira, C. A., *Validation of a new intraarterial microdialysis shunt probe for the estimation of pharmacokinetic parameters*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2003**, 31 (6), 1109-1117
- ⁴⁴ Huang, Y., Zhang, Z., *Binding study of drug with bovine serum album using a combined technique of microdialysis with flow-injection chemiluminescent detection*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2004**, 35 (5), 1293-1299
- ⁴⁵ Qian, Z., Wen, X., Li, H., Liu, Y. Qin, S., Li, P., *Analysis of interaction property of bioactive components in Flos Lonicerae Japonicae with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS*, Biol. Pharm. Bull, **2008**, 31 (1), 126-130
- ⁴⁶ Wang, Hailin; Wang, Zhixin; Lu, Meiling; Zou, Hanfa, *Microdialysis Sampling Method for Evaluation of Binding Kinetics of Small Molecules to Macromolecules*, Anal. Chem., **2008**, 80 (8), 2993-2999
- ⁴⁷ Mahesha, H. G., Singh, S. A., Srinivasan, N., Appu Rao, A. G., *A spectroscopic study of the interaction of isoflavones with human serum albumin*, FEBS J., **2006**, 273, 451-467
- ⁴⁸ Clarke, H. J., Gregoire, F., Ma, F., Martin, R., Zhao, S., Lavan, B. E., *Cross-Species Differential Plasma Protein Binding of MBX-102/JNJ39659100: A Novel PPAR- γ Agonist*, PPAR Res., **2008**, Vol. 2008

- ⁴⁹ Vidya Sagar, J., Srinivas, M., Nagulu, M., Venkatesham, A., Uday Kiran, V., Krishna, D. R., *Protein Binding Studies of Gossypin by Equilibrium Dialysis*, Curr. Tr. Biotech. Pharm., **2008**, 2 (3), 396-401
- ⁵⁰ Zhu, C. J., Zhang, J. T., *Stereoselektive Plasma Protein Binding and Target Tissue Distribution of Clausenamide Enantiomers in Rats*, Chirality, **2009**, 21, 402-406
- ⁵¹ Fuchs, H., Tillement, J. P., Urien, S., Greischel, A., Roth, W., *Concentration dependent plasma protein binding of the novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor BI 1356 due to saturable binding to its target in plasma of mice, rat and humans*, J. Pharm. Pharmacol., **2009**, 61, 55-62
- ⁵² Wan, H., Rehngren, M., *High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectroscopy*, J. Chrom. A, **2006**, 1102, 125-135
- ⁵³ Waters, N. J., Jones, R., Williams, G., Sohal, B., *Validation of a Rapid Equilibrium Dialysis Approach for the Measurement of Plasma Protein Binding*, J. Pharm. Sci., **2008**, 97 (10), 4586-4595
- ⁵⁴ Kochansky, C. J., McMasters, D. R., Lu, P., Koeplinger, K. A., Kerr, H. H., Shou, M., Korzewka, K., *Impact of pH on Plasma protein Binding in Equilibrium Dialysis*, Mol. Pharm., **2008**, 5 (3), 438-448
- ⁵⁵ Trtić-Petrović, T., Liu, J., Jönsson, J. A., *Equilibrium sampling through membrane based on a single hollow fibre for determination of drug-protein binding and free drug concentration in plasma*, J. Chromatogr. B, **2005**, 826, 169-176

-
- ⁵⁶ Fu, H., Guan, J., Bao, J. J., *A Hollow Fiber Solvent Microextraction Approach to Measure Drug-Protein Binding*, *Anal. Sci.*, **2006**, 22, 1565-1569
- ⁵⁷ Barri, T., Trtić-Petrović, T., Karlsson, M., Jönsson, J. A., *Characterization of drug-protein binding process employing equilibrium sampling through hollow-fiber supported liquid membrane and Bjerrum and Scatchard plots*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 48, 49-56
- ⁵⁸ Barrail, A., Le Tiec, C., Paci-Bonaventure, S., Furlan, V., Vincent, I., Taburet, A.-M., *Determination of Amprenavir Total and Unbound Concentrations in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography and Ultrafiltration*, *Ther. Drug Monit.*, **2006**, 28 (1), 89-94
- ⁵⁹ Gerskowitch, V. P., Hodge, J., Hull, R. A. D., Shankley, N. P., Kalindjian, S. B., McEwen, J., Black, J. W., *Unexpected relationship between plasma protein binding and pharmacodynamics of 2-NAP, a CCK1-receptor antagonist*, *Br. J. Clin. Pharm.*, **2006**, 63 (5), 618-622
- ⁶⁰ Weiss, M., Pfaar, U., Schweitzer, A., Wiegand, H., Skerjanec, A., Schran, H., *Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid*, *Drug Metab. Dispos.*, **2008**, 36 (10), 2043-2049
- ⁶¹ Qian, Z.-M., Qin, S.-J., Yi, L., Li, H.-J., Li, P., Wen, X.-D., *Binding study of Flos Lonicerae Japonicae with bovine serum albumin using centrifugal ultrafiltration and liquid chromatography*, *Biomed. Chromatogr.*, **2008**, 22, 202-206
- ⁶² Whitaker, G., Lillquist, A., Pasas, S. A., O'Connor, R., Regan, F., Lunte, C. E., Smyth, M. R., *CE-LIF method for the separation of anthracyclines: Application to protein binding analysis in plasma using ultrafiltration*, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1828-1833

- ⁶³ Quevedoa, M. A., Ribonea, S. R., Moronia, G. N., Briñón, M. C., *Binding to human serum albumin of zidovudine (AZT) and novel AZT derivatives. Experimental and theoretical analyses*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16 (6), 2779-2790
- ⁶⁴ Visy, J., Fitos, I., Mády, G., Üрге, L., Krajcsi, P., Simonyi, M., *Enantioselective Plasma Protein Binding of Bimoclomol*, *Chirality*, **2002**, 14, 638-642
- ⁶⁵ Jin, Y.-X., Tang, Y.-H., Zeng, S., *Analysis of flurbiprofen, ketoprofen and etodolac enantiomers by pre-column derivatization RP-HPLC and application to drug-protein binding in human plasma*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 46, 953-958
- ⁶⁶ Olsen, H., Andersen, A., Nordbø, A., Kongsgaard, U. E., Børmer, O. P., *Pharmaceutical grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro*, *BMC Clin. Pharmacol.*, **2004**, 4, 4
- ⁶⁷ Singh, S. S., Mehta, J., *Measurement of drug-protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration*, *J. Chromatogr. B.*, **2006**, 834, 108-116
- ⁶⁸ Chen, Y., Ho, E., Subramanyam, B., Tseng, J.-L., *Measurements of drug-protein binding by using immobilized human serum albumin liquid chromatography-mass spectroscopy*, *J. Chromatogr. B.*, **2004**, 809, 67-73
- ⁶⁹ Ermondi, G., Lorenti, M., Caron, G., *Contribution of Ionization and Lipophilicity to Drug Binding to Albumin: A preliminary Step towards Biodistribution Prediction*, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47 (16), 3949-3961

-
- ⁷⁰ Nakai, D., Kumamoto, K., Sakikawa, C., Kosaka, T., Tokui, T., *Evaluation of the protein binding ratio of drugs by a micro-scale ultracentrifugation method*. J. Pharm. Sci. **2004**, 93, 847-854
- ⁷¹ Chen, J., Hage, D. S., *Quantitative Studies of Allosteric Effects by Biointeraction Chromatography: Analysis of Protein Binding for Low-Solubility Drugs*, Anal. Chem., **2006**, 78 (8), 2672-2683
- ⁷² Hollsy, F., Valk, K., Hersey, A., Nunhuck, S., Kri, G., Bevan, C., *Estimation of Volume Distribution in Humans from High Throughput HPLC-Based Measurements of Human Serum Albumin Binding and Immobilized Artificial Membrane Partitioning*, J. Med. Chem., **2006**, 49 (24), 6958-6971
- ⁷³ Chen, J., Hage, D. S., *Quantitative Studies of Allosteric Effects by Biointeraction Chromatography: Analysis of Protein Binding for Low-Solubility Drugs*, Anal. Chem., **2006**, 78, 2672-2683
- ⁷⁴ Kim, H. S., Hage, D. S., *Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin*, J. Chromatogr. B, **2005**, 816, 57-66
- ⁷⁵ Kim, H. S., Wainer, I. W., *Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC)*, J. Chromatogr. B, **2008**, 870, 22-26
- ⁷⁶ Mallik, R., Yoo, M. J., Chen, S., Hage, D. S., *Studies of verapamil binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography*, J. Chromatogr. B, **2008**, 876, 69-75
- ⁷⁷ Hummel, J. P., Dreyer, W.J., *Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration*, Biochim. Biophys. Acta, **1962**, 63 (3), 530-532

- ⁷⁸ Berger, G., Girault, G., *Macromolecule-ligand binding studied by the Hummel and Dreyer method: current state of methodology*, J. Chromatogr. B, **2003**, 797, 51-61
- ⁷⁹ Šoltés, L., *The Hummel-Dreyer method: impact in pharmacology*, Biomed. Chromatogr., **2004**, 18, 259-271
- ⁸⁰ Oravcova, J., Sojkova, D., Lindner, W., *Comparison of the Hummel-Dreyer method in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis conditions for the study of interaction of (RS)-, (R)- and (S)-carvedilol with isolated plasma proteins*, J. Chromatogr. B, **1996**, 682, 349-357
- ⁸¹ Harshadrai, M., R., Meidtner, K., Kroll, J., *Binding of selected phenolic compounds to proteins*, J. Agric. Food Chem., **2005**, 53 (10), 4228-4235
- ⁸² Sebille, B., Thuaud, N., Tillement, J. P., *Equilibrium saturation chromatographic method for studying the binding of ligands to human serum albumin by high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr., **1979**, 180, 103-110
- ⁸³ Musteata, F. M., Pawliszyn, J., Qian, M. G., Wu, J.-T., Miwa, G. T., *Determination of Drug Plasma Protein Binding by Solid Phase Microextraction*, J. Pharm. Sci., **2006**, 95 (8), 1712-1722
- ⁸⁴ Yuan, H., Pawliszyn, J., *Application of Solid-Phase Microextraction in the Determination of Diazepam Binding to Human Serum Albumin*, Anal. Chem., **2001**, 73 (18), 4410-4416
- ⁸⁵ Koster, E. H. M., Wemes, C., Morsink, J. B., de Jong, G. J., *Determination of lidocaine in plasma by direct solid-phase microextraction combined with gas chromatography*, J. Chrom. B, **2000**, 739 (1), 175-182

-
- ⁸⁶ Kraak, J. C., Busch, S., Poppe, H., *Study of protein-drug binding using capillary zone electrophoresis*, J. Chrom., **1992**, 608, 257-264
- ⁸⁷ Zhou, D., Li, F., *Protein binding study of clozapine by capillary electrophoresis in the frontal analysis mode*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2004**, 35 (4), 879-885
- ⁸⁸ Wan, H., Östlund, Å., Jönsson, S., Lindberg, W., *Single run measurements of drug-protein binding by high-performance frontal analysis capillary electrophoresis and mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., **2005**, 19, 1603-1610
- ⁸⁹ Fu, S. P., Zhang, X. Z., Zhang, F., Xu, Q., Xiao, H. B., Liang, X. M., *Study on the interaction between strychnine and bovine serum albumin by capillary electrophoretic frontal analysis*, Chin. Chem. Lett., **2005**, 16 (9), 1233-1236
- ⁹⁰ Xiaojun, L., Aiye, L., Zheng, S., Xin, L., Yu, Z., Zhongpeng, D., Bohui, X., Bingchen, L., *Studying drug-plasma protein interactions by two-injector microchip electrophoresis frontal analysis*, Electrophoresis, **2006**, 27, 5128-5131
- ⁹¹ Martínez-Gómez, M. A., Carril-Avilés, M. M., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M., Medina-Hernández, M. J., *Characterization of antihistamine-human serum protein interactions by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A, **2007**, 1147 (2), 261-269
- ⁹² Hanwen, S., Pan, H., *Characterization of Interactions Between Fluoroquinolones and Human Serum Albumin by CE-Frontal Analysis*, Chromatographia, **2008**, 68 (11/12), 969-975

- ⁹³ Zhou, N., Liang, Y.-Z., Wang, B., Wang, P., Chen, X., Zeng, M.-M., *Interaction of glycyrrhetic acid, furosemide and hydrochlorothiazide with bovine serum albumin and their displacement interactions: capillary electrophoresis and fluorescence quenching study*, Biomed. Chromatogr., **2008**, 22, 223-231
- ⁹⁴ Guo, M., Yu, Q. S., Yan., J. W., Tan, F., Ma, G. Z., *Characterization of the Interaction between Bovine Serum Albumin and Lomefloxacin by Capillary Zone Electrophoresis*, Chin. Chem. Lett., **2004**, 15 (11), 1331-1334
- ⁹⁵ Rudnev, Alexander V.; Aleksenko, Svetlana S.; Semenova, Olga; Hartinger, Christian G.; Timerbaev, Andrei R.; Keppler, Bernhard K., *Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method*, J. Sep. Sci., **2005**, 28 (2), 212-127
- ⁹⁶ Aleksenko, S. S., Hartinger, C. G., Semenova, O., Meelich, K., Timerbaev, A. R., Keppler, B. K., *Characterization of interactions between human serum albumin and tumor-inhibiting amino alcohol platinum(II) complexes using capillary electrophoresis*, J. Chrom. A, **2007**, 1155 (2), 218-221
- ⁹⁷ Shufang, L., Hailin, W., Maoyong, S., Junfa, Y., Guibin, J., *Study of protein binding and micellar partition of highly hydrophobic molecules in a single system using capillary electrophoresis*, Electrophoresis, **2008**, 29 (14), 3038-3046
- ⁹⁸ Sulkowska, A., *Interaction of drugs with bovine and human serum albumin*, J. Mol. Struct., **2002**, 614, 227-232

-
- ⁹⁹ Zhou, B., Qi, Z.-D., Xiao, Q., Dong, J.-X., Zhang, Y.-Z., Liu, Y., *Interaction of loratadine with serum albumins studied by fluorescence quenching method*, J. Biochem. Biophys. Meth., **2007**, 70, 743-747
- ¹⁰⁰ Khan, S. N., Islam, B., Rajeswari, M. R., Usmani, H., Khan, A. U., *Interaction of anesthetic supplement thiopental with human serum albumin*, Acta Biochim. Polon., **2008**, 55 (2), 399-409
- ¹⁰¹ Subramanyam, R., Gollapudi, A., Bonigala, P., Chinnaboina, M., Amooru, D. G., *Betulinic acid binding to human serum albumin: A study of protein conformation and binding affinity*, J. Photochem. Photobiol. B, **2009**, 94, 8-12
- ¹⁰² Yu, Z., Li, D., Ji, B., Chen, J., *Characterization of the binding of nevadensin to bovine serum albumin by optical spectroscopic technique*, J. Mol. Struct., **2008**, 889, 422-428
- ¹⁰³ Tang, J., Lian, N., He, X., Zhang, G., *Investigation of the interaction between sophoricoside and human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling methods*, J. Mol. Struct., **2008**, 889, 408-414
- ¹⁰⁴ Kathiravan, A., Chandramohan, M., Renganathan, R., Sekar, S., *Spectroscopic studies on the interaction between phycocyanin and bovine serum albumin*, J. Mol. Struct., **2009**, 919, 210-214
- ¹⁰⁵ Kandagal, P. B., Kalanur, S. S., Manjunatha, D. H., Seetharamappa, J., *Mechanism of interaction between human serum albumin and N-alkyl phenothiazines studied using spectroscopic methods*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2008**, 47, 260-267

- ¹⁰⁶ Seedher, N., Bhatia, S., *Reversible binding of celecoxib and valdecoxib with human serum albumin using fluorescence spectroscopic technique*, Pharm. Res., **2006**, 54, 77-84
- ¹⁰⁷ Liu, M., Nicholson, J.K., Lindon, J.C., *Analysis of drug-protein binding using nuclear magnetic resonance based molecular diffusion measurements*, Anal. Commun., **1997**, 34, 225-228.
- ¹⁰⁸ Luo, R.S., Liu, M.L., Mao, X.A., *NMR diffusion and relaxation study of drug-protein interaction*, Spectrochimica Acta., **1999**, A 55, 1897-1901
- ¹⁰⁹ Cui, Y. F., Bai, G. Y., Li, C. G., Ye C. H., Liu, M. L., *Analysis of competitive binding of ligands to human serum albumin using NMR relaxation measurements*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2004**, 34, 247-254.
- ¹¹⁰ Delfini, M., Bianchetti, C., Di Cocco, M. E., Pescosolido, N., Porcelli, F., Rosa, R., Rugo, G., *A NMR spectroscopy study of bendaline-albumin interactions*, Bioorg. Chem., **2003**, 31, 378-388
- ¹¹¹ Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C., *Interaction of Quercetin and Its Coniugate Quercetin 3-O- β -d-Glucopyranoside with Albumin as Determined by NMR Relaxation Data*, J. Nat. Prod., **2008**, 71 (2), 175-178
- ¹¹² Waibel, B., Albert, C., Holzgrabe, U., *Evaluation of the extent of protein binding by means of NMR diffusion and relaxation experiments, and automated continuous ultrafiltration*, Eur. J. Pharm. Sci., **2009**, in press
- ¹¹³ Rich, R. L., Day, Y. S. N., Morton, T. A., Myszka, D. G., *High-Resolution and High-Throughput Protocols for Measuring Drug/Human Serum Albumin Interactions Using BIACORE*, Anal. Biochem., **2001**, 296, 197-207

-
- ¹¹⁴ Day, Y. S. N., Myszka, D. G., *Characterizing a Drug's Primary Binding Site on Albumin*, J. Pharm. Sci., **2003**, 92 (3), 333-343
- ¹¹⁵ Kuroda, Y., Saito, M., Sakai, H., Yamaoka, T., *Rapid Characterization of Drug-drug Interaction in Plasma Protein binding Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor*, Drug. Metab. Pharmacokinet., **2008**, 23 (2), 120-127
- ¹¹⁶ Banères-Roquet, F., Gualtieri, M., Villain-Guillot, P., Pugnère, M., Leonetti, J.-P., *Use of a Surface Plasmon Resonance Method To Investigate Antibiotic and Plasma Protein Interactions*, Antimicrob. Agents. Chemother., **2009**, 53 (4), 1528-1531
- ¹¹⁷ Hall, L. M., Hall, L. H, Kier, L. B., *Modelling Drug Albumin Binding Affinity with E-State Topological Structure Representation*, J. Chem. Inf. Comput. Sci., **2003**, 43 (6), 2120-2128
- ¹¹⁸ Hall, L. M., Hall, L. H, Kier, L. B., *QSAR modeling of β -lactam binding to human serum proteins*, J. Com. Mol. Des., **2003**, 17, 103-118
- ¹¹⁹ Gunturia, S. B., Narayanana, R., Khandelwal, A., *In silico ADME modelling 2: Computational models to predict human serum albumin binding affinity using ant colony systems*, Bioorg. Med. Chem., **2006**, 14 (12), 4118-4129
- ¹²⁰ Votano, J. R., Parham, M., Hall, L. M., Hall, L. H., Kier, L. B., Oloff, S., Tropsha, A., *QSAR Modeling of Human Serum Protein Binding with Several Modeling Techniques Utilizing Structure-Information Representation*, J. Med. Chem., **2006**, 49 (24), 7169-7181
- ¹²¹ Rusnak, D. W., Lai, Z., Lansing, T. j., Rhodes, N., Gilmer, T. M., Copeland, R. A., *A simple method for predicting serum protein binding of compounds from*

- IC₅₀ shift analysis for in vitro assays*, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2004**, 14, 2309-2312
- ¹²² Heinze, A., *Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung von Arzneistoffen mittels automatisierter kontinuierlicher Ultrafiltration*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2004**
- ¹²³ Illy, H.J.J., *Optimierung eines rechnergesteuerten Verfahrens zur Bestimmung der Protein-Bindung von Arzneistoffen*, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **1991**
- ¹²⁴ Oehlmann, M., *Bestimmung der Blut-Eiweißbindung von Suramin und Analogen*, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **1996**
- ¹²⁵ <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/pf1401en00>, Data Sheet Ultracel PLC Membranes
- ¹²⁶ Gulder, T., *Neuartige Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten: N,C-gekoppelte Naphthylisochinolin-Alkaloide*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2008**
- ¹²⁷ Burnier, M., Brunner, H.R., *Angiotensin II receptor antagonists*, Lancet, **2000**, 355, 637-645
- ¹²⁸ Israili, Z.H., *Clinical Pharmacokinetics of angiotensin II (AT₁) receptor blockers in hypertension*, J. Hum. Hypertens., **2000**, 14, 73-86
- ¹²⁹ Morsing, P., Adler, G., Brandt-Eliasson, U., Karp, L., Ohlson, K., Renberg, L., Sjöquist, P.-O., Abrahamsson, T., *Mechanistic Differences of Various AT₁-Receptor Blockers in Isolated Vessels of Different Origin*, Hypertension, **1999**, 33, 1406-1413

-
- ¹³⁰ Pfister, M., Schaedeli, F., Frey, F.J., Uehlinger, D.E., *Pharmacokinetics and haemodynamics of candesartan cilexetil in hypertensive patients on regular haemodialysis*, Br. J. Clin.Pharmacol., **1999**, 47, 645-651
- ¹³¹ Martin, D.E., Chapelsky, M.C., Ilson, B., Tenero, D., Boike, S.C., Zariffa, N., Jorkasky, D.K., *Pharmacokinetics and protein binding of eprosartan in healthy volunteers and in patients with varying degrees of renal impairment*, J. Clin. Pharmacol., **1998**, 38, 129-137
- ¹³² Powell, J.R., Reeves, R.A., Marino, M.R., Cazaubon, C., Nisato, D., *A Review of the New Angiotensin II-Receptor Antagonist Irbesartan*, Cardiovascular Drug Reviews, **1998**, 16 (3), 169-194
- ¹³³ Stangier, J., Schmid, J., Turck, D., Switek, H., Verhagen, A., Peeters, P.A., van Marle, S.P., Tamminga, W.J., Sollie, F.A., Jonkman, J.H., *Absorption, metabolism, and excretion of intravenously and orally administered [14C]telmisartan in healthy volunteers*, J. Clin. Pharmacol., **2000**, 40, 1312-1322
- ¹³⁴ Colussi, D.M., Parisot, C., Rossolino M.L., Brunner, L.A., Lefevre, G.Y., *Protein binding in plasma of valsartan, a new angiotensin II receptor antagonist*, J. Clin. Pharmacol., **1997**, 37, 214-221
- ¹³⁵ François, G., Timperman, G., Holenz, J., Aké Assi, L., Geuder, T., Maes, L., Dubois, J., Hanocq, M., Bringmann, G., *Naphthylisoquinoline Alkaloids Exhibit Strong Growth-inhibiting Activities Against Plasmodium falciparum and P. berghei in vitro, Structure-activity Relationships of Dioncophylline C*; Ann. Trop. Med. Parasitol., **1996**, 90, 115-123

- ¹³⁶ François, G., Timperman, G., Eling, W., Aké Assi, L., Holenz, J., Bringmann, G., *Naphthylisoquinoline Alkaloids against Malaria: Evaluation of the Curative Potentials of Dioncophylline C and Dioncopeltine A against Plasmodium berghei in vivo*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, 41, 2533-2539
- ¹³⁷ Yang, L.-K., Glover, R.P., Yonganathan, K., Sarnaik, J. P., Godbole, A. J., Soejarto, D. D., Buss, A. D., Butler, M. S., *Ancisheynin, a novel Naphthylisoquinolinium Alkaloid from Ancistrocladus heyneanus*, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 5827-5829
- ¹³⁸ Ponte-Sucre, A., Gulder, T., Wegehaupt, A., Albert, C., Rikanovic, C., Schaefflein, L., Frank, A., Schultheis, M., Unger, M., Holzgrabe, U., Bringmann, G., Moll, H., *Structure-Activity Relationship and Studies on the Molecular Mechanism of Leishmanicidal N,C-Coupled Arylisoquinolinium Salts*, *J. Med. Chem.*, **2009**, 52 (3), 626-636
- ¹³⁹ Bringmann, G., Gulder, T., Hentschel, U., Meyer, F., Moll, H., Morschhäuser, J., Ponte-Sucre, A., Ziebuhr, W., Stich, A., Brun, R., Müller, W. E. G., Mudogo, V., *Biofilm-hemmende Wirkung sowie anti-infektive Aktivität N,C-verknüpfter Arylisoquinoline, deren pharmazeutische Zusammensetzung und deren Verwendung*, *Patentschrift*, **2007**, DE 10 2006 046 922B3
- ¹⁴⁰ Ponte-Sucre, A., Faber, J. H., Gulder, T., Kajahn, I., Pedersen, S. E. H., Schultheis, M., Bringmann, G., Moll, H., *Activities of Naphthylisoquinoline Alkaloids and Synthetic Analogs against Leishmania major*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, 51, 188-194
- ¹⁴¹ Zlotos, G., Oehlmann, M., Nickel, P., Holzgrabe, U., *Determination of protein binding of gyrase inhibitors by means of continuous ultrafiltration*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, 18, 847-858

- ¹⁴² Aggeler, P.M., O'Reilly, R.A., Leong, L., Kowitz, P.E., *Potential of anticoagulant effect of warfarin by phenylbutazone*, New Engl. J. Med. **1967**, 276, 496-501
- ¹⁴³ Banfield, C., O'Reilly, R., Chan, E., Rowland, M., *Phenylbutazone-Warfarin interaction in man: further stereochemical and metabolic considerations*, Br. J. Clin. Pharmacol., **1983**, 16, 669-675
- ¹⁴⁴ Miners, J.O., Birkett, D.J., *Cytochrome P450 2C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism*, Br. J. Clin. Pharmacol., **1998**, 45 (6), 525-538
- ¹⁴⁵ Henry, R.A., Wosilait, W.D., *Drug Displacement of Warfarin from Human Serum Albumin: A Fluorometric Assay*, Tox. Appl. Pharmacol., **1975**, 33, 267-275
- ¹⁴⁶ Zini, R., D'Athis, P., Barre, J., Tillement, J.P., *Binding of indomethacin to human serum albumin. Its non displacement by various agents, influence of free fatty acids and the unexpected effect of indomethacin on warfarin binding*, Biochem Pharmacol., **1979**, 28, 2661-2665
- ¹⁴⁷ Diana, F., Veronich, K., Kapoor, A. L., *Binding of nonsteroidal anti-inflammatory agents and their effect on binding of racemic warfarin and its enantiomers to human serum albumin*, J. Pharm. Sci., **1989**, 78 (3), 195-199
- ¹⁴⁸ McNamara, P., Trueb, V., Stoeckel, K., *Ceftriaxone binding to human serum albumin – Indirect displacement by probenecid and diazepam*, Biochem. Pharmacol., **1990**, 40 (6), 1247-1253

- ¹⁴⁹ Krishna, R., Yao, M., Kaczor, D., Vachharajani, N., Srinivas, N.R., *In vitro protein Binding Studies with BMS-204352: Lack of Protein Binding Displacement Interaction in Human Serum*, *Biopharm. Drug Dispos.*, **2001**, 22, 41-44
- ¹⁵⁰ George, S., McBurney, A., Cole, A., *Possible protein binding displacement interaction between glibenclamid and metolazone*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1990**, 38, 93-95
- ¹⁵¹ Sulkowska, A., Maciazek-Jurczyk, M., Bojko, B., Równicka, J., Zubik-Skupień, I., Temba, E., Pentak, D., Sułkowski, W. W., *Competitive binding of phenylbutazone and colchicine to serum albumin in multidrug therapy: A spectroscopic study*, *J. Mol. Struc.*, 2008, 881, 97-106
- ¹⁵² Dasgupta, A., Timmerman, T. G., *In Vitro Displacement of Phenytoin from Protein Binding by Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Tolmetin, Ibuprofen, and Naproxen in Normal and Uremic Sera*, *Ther. Drug Monit.*, **1996**, 18 (1), 97-99
- ¹⁵³ Dasgupta, A., Volk, A., *Displacement of Valproic Acid and Carbamazepine from Protein Binding in Normal and Uremic Sera by Tolmetin, Ibuprofen, and Naproxen: Presence of Inhibitor in Uremic Serum That Blocks Valproic Acid-Naproxen Interactions*, *Ther. Drug Monit.*, **1996**, 18 (3), 284-287
- ¹⁵⁴ Motoya, T., Thevanayagam, L. N., Blaschke, T.F., Au, S., Stone, J.A., Jayewardene, A. L., Chi, J., Aweeka, F. T., *Characterization of nelfinavir binding to plasma proteins and the lack of drug displacement interactions*, *HIV Medicine*, **2006**, 7, 122-128

-
- ¹⁵⁵ Rezaei, Z., Khabnadideh, S., Hemmateenejad, B., Dehghani, Z., *In vitro enantioselective displacement of propranolol from protein binding sites by acetyl salicylic acid and salicylic acid*, Int. J. Pharm., **2007**, 342, 78-81
- ¹⁵⁶ Campion, D. S., Olsen, R., *Measurement of Drug Displacement by Continuous Ultrafiltration*, J. Pharm. Sci., **1974**, 63 (2), 249-252
- ¹⁵⁷ Rehse, K., Ehlert, K., *In vitro Quantifizierung der Interaktion von Phenprocoumon, Warfarin und Methylsulfinylwarfarin mit Phenylbutazon am Humanserumalbumin*, Arch. Pharm., **1986**, 319, 271-274
- ¹⁵⁸ Bogusz, M., Erkens, M., *Reversed-phase high-performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use*, J. Chromatogr. A, **1994**, 674, 97-126
- ¹⁵⁹ De Vries, J. X., Völker, U., *Determination of the plasma protein binding of the coumarin anticoagulants phenprocoumon and its metabolites, warfarin and acenocoumarol, by ultrafiltration and high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. B, **1990**, 529, 479-485
- ¹⁶⁰ Ishihama, Y., Miwa, T., Asakawa, N., *Drug-plasma protein binding assay by electrokinetic chromatography-frontal analysis*, Electrophoresis, **2002**, 23, 951-955
- ¹⁶¹ Veraart, J. R., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N. H., Brinkman, U. A. Th., *Determination of phenprocoumon in plasma and urine by at-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis*, J. Pharm. Biomed. Anal., **1998**, 17, 1161-1166

- ¹⁶² Sioufi, A., Colussi, D., Caudal, F., Schoeller, J. P., Massias, P., *Pharmacokinetics of phenylbutazone in healthy subjects after oral administration of single and multiple doses*, J. Pharm. Sci., **1980**, 69 (12), 1413-1416
- ¹⁶³ Schmidt, W., Jähnchen, E., *Interaction of Phenylbutazone with Racemic Phenprocoumon and its Enantiomers in Rats*, J. Pharm. Biopharm., **1979**, 7(6), 643-663
- ¹⁶⁴ Vičík, R., *Synthese und Eigenschaften N-acylierter Aziridin-2,3-dicarboxylate als selektive, peptidomimetische Inhibitoren von Cystein-Proteasen der Cathepsin-L-Subfamilie*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2004**
- ¹⁶⁵ Schirmeister, T., Peric, M., *Aziridinyl Peptides as Inhibitors of Cysteine Proteases: Effect of a Free Carboxylic Acid Function on Inhibition*, Bioorg. Med. Chem., **2000**, 8, 1281-1291
- ¹⁶⁶ Vicik, R., Hoerr, V., Glaser, M., Schultheis, M., Hansell, E., McKerrow, J. H., Holzgrabe, U., Caffrey, C. R., Ponte-Sucre, A., Moll, H., Stich, A., Schirmeister, T., *Aziridine-2,3-dicarboxylate inhibitors targeting the major cysteine protease of Trypanosoma brucei as lead trypanocidal agents*, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2006**, 16, 2753-2757
- ¹⁶⁷ Ponte-Sucre, A., Vicik, R., Schultheis, M., Schirmeister, T., Moll, H., *Aziridine-2,3-Dicarboxylates, Peptidomimetic Cysteine Protease Inhibitors with Antileishmanial Activity*, Antimicrob. Agents. Chemother., **2006**, 50 (7), 2439-2447

-
- ¹⁶⁸ Schulz, F., Gelhaus, C., Degel, B., Vicik, R., Heppner, S., Breuning, A., Leippe, M., Gut, J., Rosenthal, P. J., Schirmeister, T., *Screening of Protease Inhibitors as Antiplasmodial Agents. Part I: Aziridines and Epoxides*, Chem. Med. Chem., **2007**, 2 (8), 1214-1224
- ¹⁶⁹ Bhattacharjya, S., Balaram, P., *Effects of organic solvents on protein structures: observation of a structured helical core in hen egg-white lysozyme in aqueous dimethylsulfoxide*, Proteins: Structure, Function and Genetic, **1997**, 29, 492-507
- ¹⁷⁰ Knubovets, T., Osterhout, J. J., Klibanov, A. M., *Structure of Lysozyme Dissolved in Neat Organic Solvents as Assessed by NMR and CD Spectroscopies*, Biotech. Bioengin., **1999**, 63(2), 242-248
- ¹⁷¹ Arakawa, T., Kita, Y., Timasheff, S. N., *Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide*, Biophys. Chem., **2007**, 131, 62-70
- ¹⁷² Perlman, R. L., Wolff, J., *Dimethyl sulfoxide: an inhibitor of liver alcohol dehydrogenase*, Science, **1968**, 160, 317-319
- ¹⁷³ Kleifeld, O., Frenkel, A., Bogin, O., Eisenstein, M., Brumfeld, V., Burstein, Y., Sagi, I., *Spectroscopic Studies of Inhibited Alcohol Dehydrogenase from Thermoanaerobacter brockii: Proposed Structure for the Catalytic Intermediate State*, Biochem., **2000**, 39, 7702-7711
- ¹⁷⁴ Yang, Z. W., Tendian, S. W., Carson, W. M., Brouillette, W. J., Delucas, L. J., Brouillette, C. G., *Dimethyl sulfoxide at 2.5% (v/v) alters the structural cooperativity and unfolding mechanism of dimeric bacterial NAD⁺ synthetase* Protein Sci., **2004**, 13, 830-841

- ¹⁷⁵ Tjernberg, A., Markova, N., Griffiths, W. J., Hallén, D., *DMSO-Related Effects in Protein Characterization*, J. Biomol. Screening, **2006**, 11(2), 131-137
- ¹⁷⁶ Joos, B., Ledergerber, B., Flepp, M., Bettex, J. D., Lüthy, R., Siegenthaler, W., *Comparison of high-pressure liquid chromatography and bioassay for determination of ciprofloxacin in serum and urine*, Antimicrob. Agents Chemother., **1985**, 27, 353-356
- ¹⁷⁷ Izumi, T., Kitagawa, T., *Protein binding of quinolonecarboxylic acids*, Chem. Pharm. Bull., **1989**, 37, 742-745
- ¹⁷⁸ Papadopoulou, A., Green, R. J., Frazier, R. A., *Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study*, J. Agric. Food Chem., **2005**, 53, 158-163
- ¹⁷⁹ Nakashima, M., Uematsu, T., Kosuge, K., Kusajima, H., Ooie, T., Masuda, Y., Ishida, R., Uchida, H., *Single- and multiple-dose pharmacokinetics of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone, in humans*, Antimicrob. Agents Chemother., **1995**, 39, 2635-2640