

# **Aspekte der Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration**

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

vorgelegt von  
**Alexander Hörst**  
aus Miltenberg

Würzburg 2013



# **Aspekte der Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration**

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

vorgelegt von  
**Alexander Hörst**  
aus Miltenberg

Würzburg 2013

Eingereicht am.....

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter                      Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe  
2. Gutachter                      .....

der Dissertation

1. Prüfer                          Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe  
2. Prüfer                          .....

3. Prüfer                          .....

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....

*Man sollte nie so viel zu tun haben,  
dass man zum Nachdenken keine Zeit mehr hat.*

Georg Christoph Lichtenberg



# 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.

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

Herrn Dr. Bernd Reyer möchte ich für die stets schnelle Hilfe bei Hard- und Software-Problemen danken, ohne die ein Großteil der vorliegenden Arbeit nie hätte entstehen können.

Herrn Georg Walter danke ich für die Herstellung und die vielen Ideen bei der Weiterentwicklung der Ultrafiltrationszelle.

Herrn Matthias Völker danke ich für die schnelle Lösung all der kleinen Probleme mit der Elektronik.





# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1.	Grundlagen der Proteinbindung .....	2
1.1.1.	Plasmaproteine .....	2
1.1.2.	Auswirkung der Proteinbindung auf pharmakologische Parameter .....	8
1.1.3.	Quantitative Beschreibung der Proteinbindung .....	12
1.2.	Verdrängung aus der Proteinbindung .....	14
1.2.1.	Mechanismen der Verdrängung .....	14
1.2.2.	Klinische Relevanz der Verdrängung von Arzneistoffen aus der Proteinbindung .....	17
1.3.	Methoden zur Bestimmung von Proteinbindungskonstanten .....	18
1.3.1.	Gleichgewichtsdialyse, Ultrazentrifugation und Ultrafiltration .....	18
1.3.2.	Chromatographische und elektrophoretische Methoden .....	21
1.3.3.	Spektroskopische Methoden .....	24
1.3.4.	Theoretische Methoden .....	25
1.4.	Ziel der Arbeit .....	26
<b>2.</b>	<b>Aufbau der Messanlage für die kontinuierlichen Ultrafiltration</b> .....	27
2.1.	Messanlage .....	28
2.1.1.	Durchführung der Messungen .....	29
2.1.2.	Bauteile der Anlage .....	30
2.1.3.	Messzelle .....	32
2.1.3.1.	PMMA-Zellen (Standardzelle) .....	33
2.1.3.2.	PVDF-Zellen .....	36
2.1.3.3.	Zellen für Messungen bei höheren Drücken .....	36
2.1.3.4.	Alternative Membranmaterialien .....	37
2.1.3.5.	Dichtigkeitstest der Messzelle .....	38
2.1.4.	Zubehör und Kleinteile .....	41
2.2.	Steuergeräte der Messanlage .....	42
2.2.1.	Steuerung der Geräte .....	42
2.2.2.	Aufbau und Funktion der Messsoftware .....	43
<b>3.</b>	<b>Versuchsdurchführung</b> .....	47
3.1.	Verwendete Substanzen und Geräte .....	48
3.1.1.	Wirkstoffe .....	48
3.1.2.	Chemikalien .....	49
3.1.3.	Proteine und Ultrafiltrationsmembrane .....	49
3.1.4.	Pufferlösung .....	50
3.1.5.	Pufferlösungen für schlecht wasserlösliche Stoffe .....	51
3.1.6.	Wirkstofflösung .....	51
3.1.7.	Proteinlösung .....	53
3.1.8.	Wasser .....	53
3.1.9.	Geräte .....	53
3.2.	Versuchsablauf .....	54
3.2.1.	Vorversuch .....	55
3.2.2.	Hauptversuch .....	55
3.2.3.	Abbau und Pflege der Anlage .....	58
3.3.	Auswertung der Versuche .....	59
3.3.1.	Datenkonvertierung .....	59
3.3.2.	Berechnung der Titrationskurven .....	59
3.3.3.	Iterative Berechnung der Bindungskonstanten .....	60
3.3.4.	Scatchard-Plot .....	61
3.3.5.	Auswertungsprotokoll .....	62

3.3.6.	SOP .....	62
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>65</b>
4.1.	Verdrängung aus der Proteinbindung .....	66
4.1.1.	Verdrängung durch nicht-kovalent bindende Arzneistoffe .....	66
4.1.1.1.	Basischer und saurer Arzneistoff .....	69
4.1.1.2.	Zwei saure Arzneistoffe .....	79
4.1.1.3.	Zwei basische Arzneistoffe .....	82
4.1.1.4.	Diskussion .....	84
4.1.2.	Verdrängung durch kovalent an Cys34 bindende Arzneistoffe .....	90
4.1.2.1.	Verdrängung durch Acetylcystein .....	91
4.1.2.2.	Verdrängung von Dipyridamol durch Etacrynsäure .....	98
4.1.3.	Diskussion .....	100
4.2.	Proteinbindung der Ephedra-Alkaloide .....	104
4.2.1.	Allgemeines .....	104
4.2.2.	Ephedrin .....	105
4.2.3.	Pseudoephedrin .....	106
4.2.4.	Diskussion .....	108
4.3.	Proteinbindung der Bisnaphthalimide .....	112
4.3.1.	MT02 und MT02-Vorstufe .....	112
4.4.	Proteinbindung der Naphthylisochinoline .....	115
4.4.1.	GB-AP05 .....	116
4.4.2.	GB-AP143 .....	117
4.5.	Proteinbindung der Fluorchinolone .....	118
4.5.1.	Fluorchinolone mit Amid-Funktion .....	119
4.5.2.	Fluorchinolone mit saurer Funktion .....	120
4.5.3.	Fluorchinolone mit basischer Funktion .....	121
4.5.4.	GHQ168 .....	126
4.5.5.	Diskussion .....	132
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>139</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>143</b>
7.1.	Veröffentlichungen .....	144
7.2.	Abkürzungsverzeichnis .....	145
7.3.	Tabellenverzeichnis .....	145
7.4.	Abbildungsverzeichnis .....	146
7.5.	SOP M-A4-001 .....	149
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>157</b>



# **1. Einleitung**

## 1.1. Grundlagen der Proteinbindung

### 1.1.1. Plasmaproteine

Der menschliche Körper besteht aus einer Reihe von Verteilungsräumen, in denen sich endogene und exogene Stoffe, darunter auch Arzneistoffe, je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften verteilen können. Eine besondere Rolle spielt hierbei das Blut, da über dieses der Stoffaustausch und –transport zwischen den Räumen erfolgt und da es selbst einen Verteilungsraum darstellt [1].

Der Körper eines durchschnittlichen Erwachsenen enthält bezogen auf seine Körpermasse ca. 8-9 % Blut. Dieses besteht zu circa 45 % aus zellulären Bestandteilen wie Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten und zu 55 % aus Plasma. Das Plasma setzt sich aus 90 % Wasser, 6-8 % Plasmaproteine sowie eine Vielzahl gelöster niedermolekularer Stoffe zusammen [Abb. 1]. Die Plasmaproteine enthalten die Fraktionen der Globuline und des Albumins und sind für die Eigenschaften des Blutes als Verteilungsraum maßgeblich verantwortlich [2, 3].

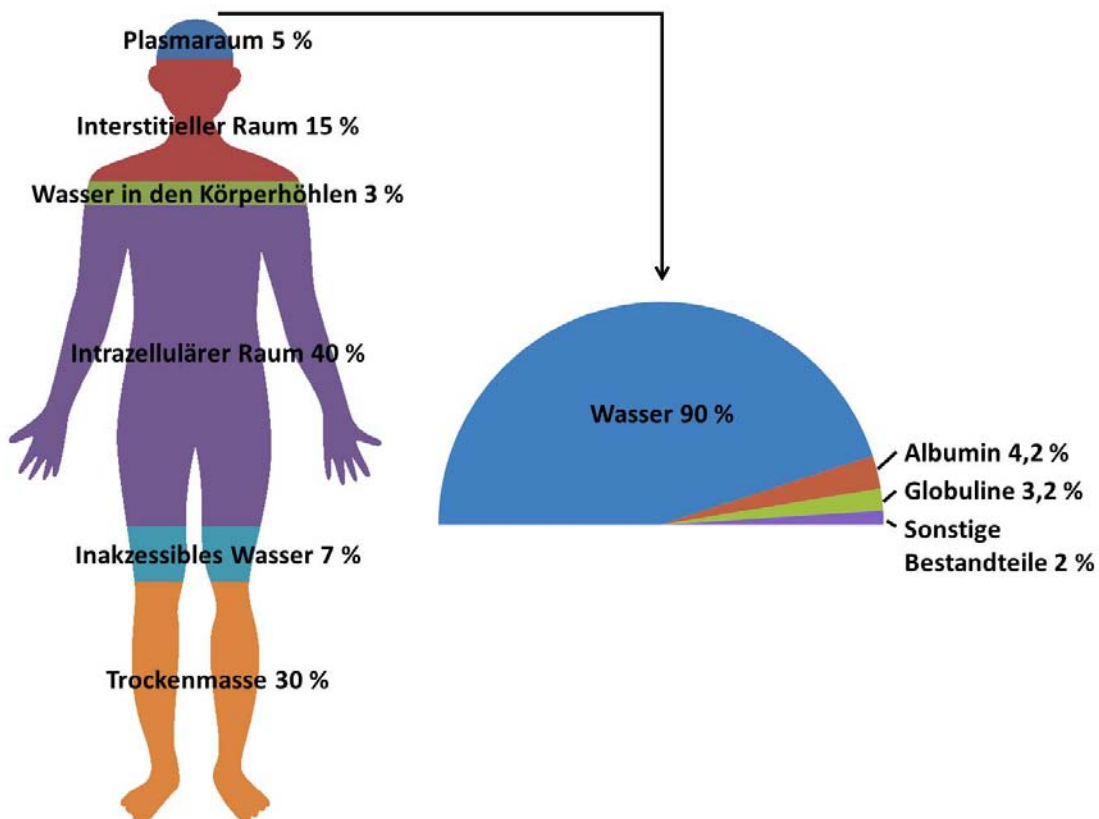


Abb. 1: Verteilungsräume des Körpers und Zusammensetzung des Plasmaraumes [1]

## Globuline

Die Globuline erfüllen sehr unterschiedliche Aufgaben im Körper und sind eine sehr heterogen zusammengesetzte Fraktion, die sich in die einzelnen Unterfraktionen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline unterteilen lässt. Sie machen ca. 40 % der Plasmaproteine aus und sind unter anderem an der Blutgerinnung, dem Hormon- und Fetttransport und der Immunabwehr beteiligt [2, 3].

Das saure  $\alpha_1$ -Glycoprotein (AGP) hat von den Globulinen den größten Anteil an der Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen. Es hat ein Molekulargewicht von 41-43 kDa und seinen isoelektrischen Punkt bei pH 3.0 [4]. Als Akutes-Phase-Protein entsteht es vor allem beim pathologischen Untergang von Gewebe [5]. Ob es darüber hinaus weitere spezifische Aufgaben im Körper erfüllt, ist nicht vollständig geklärt. AGP ist eine uneinheitliche Proteinfraction, das Protein zeigt Polymorphismus und weist unterschiedliche Glykosylierungsmuster auf. Zusätzlich hängen seine Plasmaspiegel stark von der aktuellen Stoffwechsellage des Organismus ab, was es erschwert seinen Anteil an der Plasmaproteinbindung zu beurteilen [6, 7].

AGP bindet vor allem basische Arzneistoffe wie Lidocain und Propranolol. Diese binden allerdings auch an Albumin [8-11]. Untersuchungen zum räumlichen Aufbau und zu eventuell vorhandenen Bindetaschen für AGP fehlen, weshalb eine allgemeine Aussage von Bindungspräferenzen an diese Proteine schwierig ist.

## Albumin

Im Gegensatz dazu setzt sich die Albuminfraktion nur aus einem Protein zusammen: dem Humanen-Serum-Albumin (HSA) [Abb. 2]. Dieses hat einen Anteil von 60 % an allen Plasmaproteinen und ist somit das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Protein im Blut. Seine Aufgabe besteht größtenteils im Stofftransport endogener und exogener Substanzen und im Aufrechterhalten des kolloidosmotischen Druckes im Körper. Der oftmals in der Literatur erwähnte Beitrag zur Stabilisierung des pH-Wertes des Blutes ist gering, da dieser hauptsächlich über dessen Carbonatgehalt und somit letztendlich über die Atmungskette reguliert wird [2, 3].

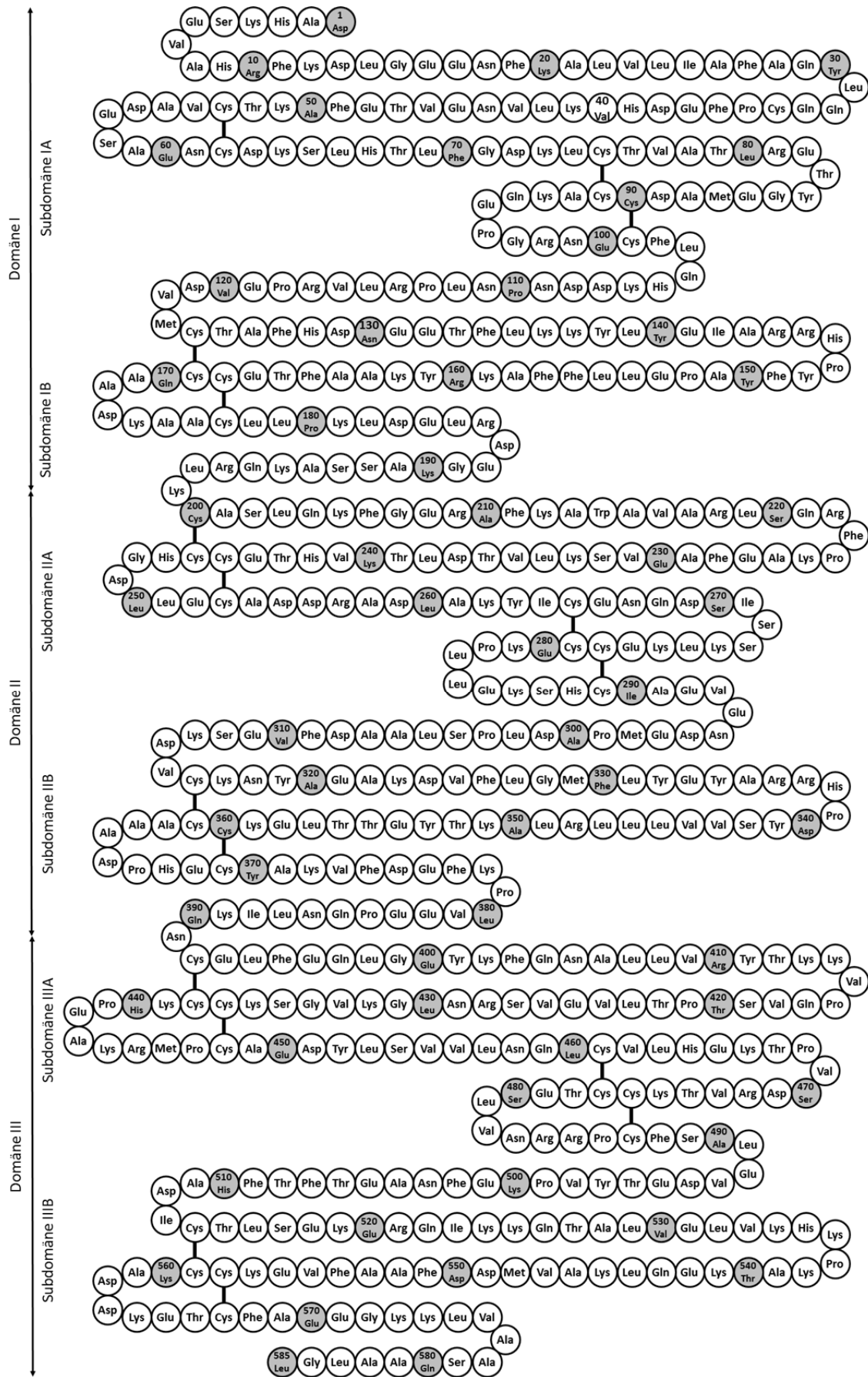


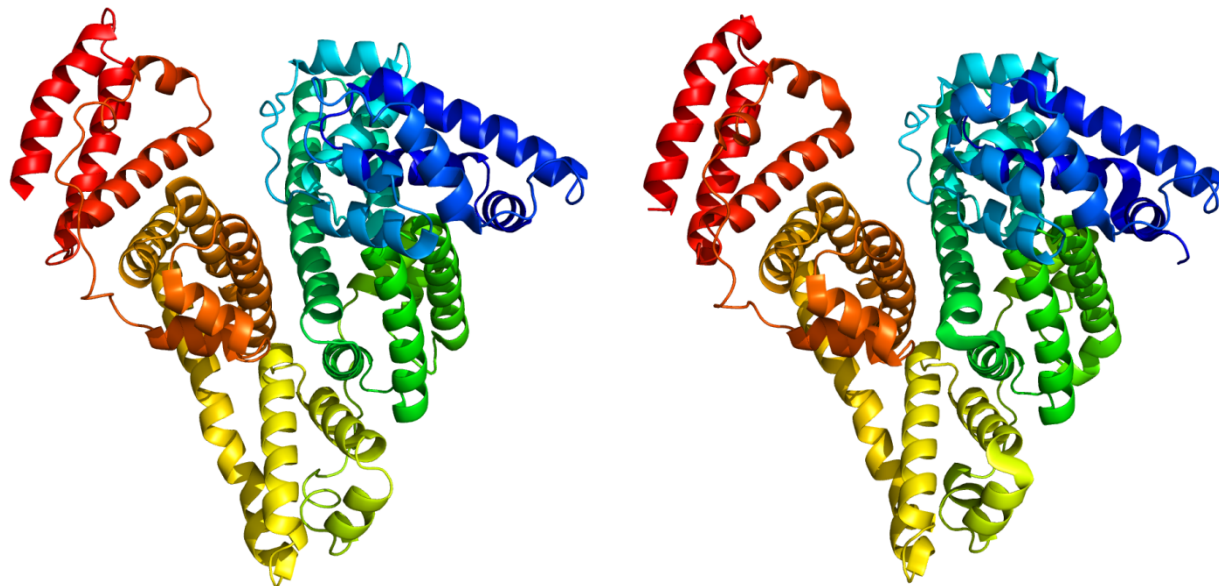
Abb. 2: Aminosäuresequenz des humanen Serumalbumins, unterteilt in drei Domänen und sechs Subdomänen [12, 13]



Albumin wird in der Literatur auch als Reservoirprotein bezeichnet, da es durch seine Transportfunktion als Vorratssystem für an ihm gebundene Stoffe wie Vitamin D dienen und weil es bei unzureichender Versorgung über die Nahrung als Aminosäurequelle vom Körper abgebaut werden kann. Darüber hinaus hat es protektive Effekte auf den Körper durch Bindung von Toxinen wie Alfatoxin und durch die antioxidativen Eigenschaften seiner Aminosäurereste [14].

Albumin ist ein 66.44 kDa schweres Protein und ist 585 Aminosäuren aufgebaut. Es ist nicht glykosyliert, besitzt keine prosthetische Gruppe und weist eine Plasmahalbwertszeit von 19 Tagen auf. Die Aminosäuresequenz wurde mittels chemischen und enzymatischen Abbaus vor der Entdeckung der kodierenden DNS-Sequenz bestimmt. Es besteht zu großen Teilen aus sauren und neutralen Aminosäuren, woraus ein isoelektrischer Punkt von 4.7 resultiert. Albumin besitzt bei dem physiologischen pH-Wert von 7.4 eine Nettoladung von -19. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 279 nm, was durch den niedrigen Tryptophangehalt begründet ist [12-14].

Die 35 Cysteine des HSAs liegen, bis auf das Cystein in Position 34, zu Disulfidbrücken gepaart vor. Diese sind für die Tertiärstruktur des Proteins und deren hohe Stabilität mitverantwortlich [14].



**Abb. 3: Dreidimensionale Strukturen des humanen (links) und bovinen (rechts) Serumalbumins [15, 16]**

Die Tertiärstruktur wurde 1992 mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. HSA bildet drei homologe Domänen in einer „herzförmigen“ Anordnung aus, die in jeweils zwei Subdomänen unterteilt werden [Abb. 2, Abb. 3] [17]. Diese verfügen zum Teil über hochspezifische Bindestellen für endogene Stoffe wie Bilirubin [18], Aldosteron [19] und langkettige Fettsäuren [20]. Für exogene Stoffe besitzt das Protein zwei Bin-

destellen, die nach ihrem Entdecker Sudlow benannt sind. Die Sudlow-I-Bindestelle befindet sich in der Subdomäne IIA, die Sudlow-II-Bindestelle ist in der Subdomäne IIIA lokalisiert [21, 22].

Die Spezifität dieser Bindestellen ist unterschiedlich. Typische Sudlow-I-Liganden sind sperrige anionische Moleküle, deren Ladung an einer zentralen Stelle lokalisiert ist wie z.B. bei Warfarin. Sudlow-II-Liganden sind meist aromatisch und können anionisch oder neutral sein. Ist eine Ladung vorhanden, liegt sie in der Peripherie des Moleküls, wie es beim Ibuprofen der Fall ist. Tab. 1 zeigt eine Auswahl bekannter Liganden der beiden Bindestellen.

<b>Bindestelle</b>	<b>Substanz</b>	<b>Bindung [%]</b>
Sudlow-I	Salicylsäure	84 [23]
	Sulfisoxazol	85 [24]
	Warfarin	97 [25]
	Indomethacin	99 [26]
Sudlow-II	Diazepam	99 [27]
	Ibuprofen	99 [27]
	Naproxen	99 [28]
	Clofibrat	90 [29]

Tab. 1: Bindung exogener Liganden an die Bindestellen des Albumins

Die strukturellen Unterschiede dieser Substanzen zeigen, dass es sich bei beiden Bindestellen nicht um jeweils eine diskrete Stelle handelt, sondern um Bereiche des Proteins, die sich in weitere Regionen unterteilen lassen. Für Sudlow-I sind mindestens drei sich zum Teil überlappenden Regionen beschrieben [30, 31]. Ähnliche Untersuchungen existieren auch für Sudlow-II [32].

Daneben können Stoffe auch an weitere Stellen des HSAs binden, da dieses neben den oben beschriebenen spezifischen Bindestellen eine Reihe von unspezifischen Bindestellen aufweist. An diese binden unter anderem kationische Verbindungen wie Chinidin und Chlorpromazin [27]. Darüber hinaus sind Bindungen von nukleophilen Substanzen an das freie Cys34 beschrieben [33], sowie die Bindung von Blutglucose an Lysinreste [34] und die allosterische Beeinflussung von Bindestellen durch weiter entfernt bindende Liganden [35].

Als unspezifisches Transportprotein enthält HSA eine große Anzahl von Bindetaschen, deren Besetzung unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Eine Vor-

hersage über Bindungsstelle, -affinität und –mechanismus einer Substanz ist somit praktisch nicht möglich und kann nur experimentell ermittelt werden.

Neben HSA wird im Labor oft das Bovine Serumalbumin (BSA) verwendet. Dieses ist kostengünstiger, kommerziell leichter verfügbar und birgt kein Infektionspotential in Bezug auf humanpathogene Viren wie HIV. Albumine kommen in allen höheren Wirbeltieren vor und zeigen hohe Sequenzhomologie. BSA hat eine 80 % identische Aminosäurezusammensetzung mit HSA [Tab. 2], wodurch eine ähnliche Tertiärstruktur mit ähnlichen Bindungsstellen resultiert [Abb. 3] [36]. Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit der Proteine können Liganden verschieden an diese binden. Für Screeningversuche kann BSA verwendet werden, ob dies allerdings zu den gleichen Ergebnissen führt, muss im Einzelfall nachgewiesen werden [14, 37].

Aminosäuren	Anzahl in	
	HSA	BSA
Alanin	62	46
Arginin	24	23
Asparagin	17	14
Asparaginsäure	36	40
Cystein	35	35
Glutamin	20	20
Glutaminsäure	62	59
Glycin	12	16
Histidin	16	17
Isoleucin	8	14
Leucin	61	61
Lysin	59	59
Methionin	6	4
Phenylalanin	31	27
Prolin	24	28
Serin	24	28
Threonin	28	34
Tryptophan	1	2
Tyrosin	18	20
Valin	41	36
<b>Summe</b>	<b>585</b>	<b>583</b>

Tab. 2: Unterschiedliche Zusammensetzung von HSA und BSA [14]

### 1.1.2. Auswirkung der Proteinbindung auf pharmakologische Parameter

Die Bindung eines Arzneistoffes an die Plasmaproteine hat einen direkten Einfluss auf die pharmakologischen Parameter des Stoffes. Vor allem das Verteilungsvolumen, die Clearance, der Metabolismus und die Bioverfügbarkeit werden hierbei beeinflusst.

#### Verteilungsvolumen

Das Verteilungsvolumen  $V_d$  ist definiert als der Quotient aus der im Organismus vorhandenen Menge  $M$  eines Arzneistoffes und seiner Plasmakonzentration  $c_p$ :

$$(1) \quad M = c_p \cdot V_d \Leftrightarrow V_d = \frac{M}{c_p}$$

Das Verteilungsvolumen hängt somit auch von der sich im Körper befindlichen Menge eines Pharmakons ab. Diese wiederum wird durch die Bioverfügbarkeit, die Resorptionsgeschwindigkeit und die Elimination des Stoffes bestimmt. In der Literatur wird deshalb meist  $V_d$  im Steady-State bezogen auf 1 kg Körpergewicht angegeben.

In Tab. 3 sind die Werte für einige Arzneistoffe aufgeführt. Das Verteilungsvolumen für die einzelnen Stoffe ist sehr unterschiedlich. Für Chloroquin zum Beispiel errechnet sich  $V_d$  für eine 70 kg schwere Person zu 14.000 l. Dies ist physikalisch nicht möglich. Deshalb wird meist vom „scheinbaren“ Verteilungsvolumen gesprochen, da ihm keiner der realen Verteilungsräume des Körpers entspricht [1].

Arzneistoff	$V_d$ [l/kg]
Chloroquin	200
Imipramin	15
Paracetamol	1.0
Ethanol	0.65
Warfarin	0.2

Tab. 3: Scheinbare Verteilungsvolumina einiger Arzneistoffe [1]

Das hohe Verteilungsvolumen des Chloroquins kommt dadurch zustande, dass sich nur ein geringer Anteil davon im Plasma befindet. Ein größerer Teil hält sich in einem anderen Kompartiment, in diesem Fall dem Fettgewebe, auf.

Formell lässt sich dieser Sachverhalt folgendermaßen beschreiben:

$$(2) \quad M = c_P \cdot V_d = c_P \cdot V_P + c_R \cdot V_R$$

Die Menge  $M$  eines Arzneistoffes entspricht nach Formel (1)  $c_P \cdot V_d$  und ist die Summe der Konzentration im Plasma ( $c_P$ ) multipliziert mit dem Plasmavolumen ( $V_P$ ) und der Konzentration in den restlichen Verteilungsräumen ( $c_R$ ) multipliziert mit deren Volumen ( $V_R$ ). Im Steady-State ist die Konzentration an freiem Arzneistoff im Plasma gleich der freien Konzentration in den restlichen Verteilungsräumen, wodurch gilt:

$$(3) \quad f_{u(P)} = \frac{c_{u(P)}}{c_P} \wedge f_{u(R)} = \frac{c_{u(R)}}{c_R} \wedge c_{u(P)} = c_{u(R)}$$

$$(4) \quad \Rightarrow \frac{f_{u(P)}}{f_{u(R)}} = \frac{c_R}{c_P}$$

Wobei  $f_{u(P)}$  dem Anteil des im Plasma ungebunden vorliegenden Arzneistoffes und  $f_{u(R)}$  dem Anteil des in den restlichen Verteilungsräumen ungebunden vorliegenden Arzneistoffes entsprechen.  $c_{u(P)}$  und  $c_{u(R)}$  sind die Konzentrationen an ungebundenem Arzneistoff in den jeweiligen Verteilungsräumen.

Mit Formel (2) ergibt sich:

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

Formel (5) gibt nur eine stark vereinfachte Sicht des scheinbaren Verteilungsvolumens wider, da der Körper nur in zwei Kompartimente, nämlich das Plasma und die restlichen Verteilungsräume, unterteilt wird. Besonders letztere sind sehr heterogen zusammengesetzt und zeigen daher oft schwankende Affinität zu den Arzneistoffen. Des Weiteren gilt Formel (5) nur unter der in (3) getroffenen Bedingung, dass der ungebundene Stoff ungehindert zwischen den Kompartimenten diffundieren kann und somit  $c_{u(P)} = c_{u(R)}$  ist [38, 39].

## Clearance, Metabolismus und Bioverfügbarkeit

Clearance und Metabolismus werden ebenfalls stark von der Proteinbindung eines Arzneistoffes beeinflusst, da jeweils nur der freie Arzneistoffanteil ausgeschieden und/oder metabolisiert werden kann. Der Großteil der Arzneistoffe wird über die Nieren und die Leber ausgeschieden. Daneben gibt es noch einige Stoffe, deren Elimination über die Lunge oder die Haut erfolgt.

Die Clearance ist das Blutvolumen, das pro Zeiteinheit von einem Arzneistoff vollständig und irreversibel befreit wird. Erfolgt diese ausschließlich über die Nieren, lässt sie sich durch folgende Formel beschreiben:

$$(6) \quad CL_R = \frac{(1-F_R) \cdot (\text{Filtrationsrate} + \text{Sekretionsrate})}{c_P}$$

$CL_R$  ist hierbei die renale Clearance,  $F_R$  der Arzneistoffanteil, der tubulär rückresorbiert wird,  $(\text{Filtrationsrate} + \text{Sekretionsrate})$  die in einer bestimmten Zeit filtrierte und sezernierte Wirkstoffmenge und  $c_P$  die Plasmakonzentration.

Die renale Clearance ist demzufolge größtenteils unabhängig von der Plasmaproteinbindung. Sinkt diese, nimmt zwar  $c_P$  zu, aber gleichzeitig steigt auch der pro Zeit ausgeschiedene Anteil, wodurch  $CL_R$  annähernd unverändert bleibt.

Wird ein Arzneistoff hingegen vorwiegend hepatisch eliminiert, gilt folgender Zusammenhang:

$$(7) \quad CL_H = \frac{Q_H \cdot f_{uB} \cdot CL_{u_{int}}}{Q_H + f_{uB} \cdot CL_{u_{int}}}$$

bei dem  $CL_H$  die hepatische Clearance,  $Q_H$  der Blutfluss durch die Leber,  $f_{uB}$  der Anteil des im Blut ungebunden vorliegenden Arzneistoffes, und  $CL_{u_{int}}$  die intrinsische Clearance ist. Letztere ist ein Maß für die maximale Eliminationsleistung der Leber und gibt die Abhängigkeit der hepatischen Clearance von der Proteinbindung wider.

Arzneistoffe lassen sich bezüglich ihres Extraktionskoeffizienten  $\varepsilon$  in folgende drei Gruppen unterteilen: „Low-, Intermediate- und High-extraction drugs“.  $\varepsilon$  ist dabei das Verhältnis des Arzneistoffanteils, der von der Leber aus dem Organismus entfernt wurde, zu demjenigen Anteil, der in die Leber eintritt. Praktisch lassen sich alle Arz-

neistoffe in „Low-extraction drugs“ mit  $\varepsilon < 0.3$  und die „High-extraction drugs“ mit  $\varepsilon > 0.7$  einteilen.

Für „Low-extraction drugs“ gilt:

$$(8) \quad Q_H \gg f_{uB} \cdot CL_{u_{int}},$$

daher vereinfacht sich Formel (2) zu:

$$(9) \quad CL_H = f_{uB} \cdot CL_{u_{int}}$$

Für „High-extraction drugs“ gilt das Gegenteil:

$$(10) \quad Q_H \ll f_{uB} \cdot CL_{u_{int}},$$

daher vereinfacht sich Formel (2) zu:

$$(11) \quad CL_H = Q_H$$

Daraus folgt, dass für „Low-extraction drugs“ die Clearance neben der intrinsischen Clearance stark von der Proteinbindung abhängt, da diese einen großen Einfluss auf den freien Anteil des Arzneistoffes hat. Für „High-extraction drugs“ ist die Clearance dagegen weitestgehend unabhängig vom freien Arzneistoffanteil, da hier vor allem die Leberdurchblutung eine wichtige Rolle spielt.

Die Proteinbindung hat somit auch Einfluss auf die orale Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen. Diese durchlaufen nach ihrer Resorption im Darm vor der systemischen Verteilung zuerst die Leber. Bei dieser ersten Leberpassage wird bereits ein Teil der Stoffe metabolisiert, was als First-Pass-Effekt bezeichnet wird. Da es sich hierbei um eine einmalige Leberpassage handelt, ist  $Q_H$  sehr viel geringer als bei den oben beschriebenen Vorgängen.

Dadurch ist der Effekt auf die Bioverfügbarkeit von „Low-extraction drugs“ gering. Auch bei einem höheren freien Anteil wird nur ein kleiner Teil des Stoffes bei der einmaligen Passage entfernt. Bei „High-extraction drugs“ verhält es sich umgekehrt. Hat ein Arzneistoff einen hohen Extraktionskoeffizienten und eine niedrige Proteinbindung, wird in der Leber ein Großteil dieses Arzneistoffes entfernt, bevor dieser den systemischen Kreislauf erreichen kann; dies gilt allerdings nur, wenn der

First-Pass-Effekt der Substanz vorwiegend durch die Leber bestimmt wird. Findet dieser größtenteils in Dünndarmepithel statt, ist der Effekt auf die Bioverfügbarkeit gering.

Die Proteinbindung hat folglich einen starken Einfluss auf die pharmakokinetischen Parameter von Arzneistoffen. Hiervon besonders betroffen sind Substanzen, deren Elimination vorwiegend über der Leber stattfindet [38, 39].

### 1.1.3. Quantitative Beschreibung der Proteinbindung

Das Ausmaß der Proteinbindung eines Arzneistoffes lässt sich sowohl durch die Assoziationskonstanten als auch durch Angabe des gebundenen Anteils in Prozent beschreiben.

Durch den hohen Gehalt des Blutes an Plasmaproteinen sind diese in Relation zum Arzneistoff meist im Überschuss vorhanden. Zusätzlich kann ein Mol Protein oft mehrere Mol Arzneistoff binden; z.B. bindet ein Albuminmolekül zwei Moleküle Etacrynsäure [40]. Durch Überschuss an Proteinbindestellen ist der gebundene Anteil im therapeutischen Bereich einer Substanz meist konstant und für praktische Zwecke genügt meist die prozentuale Angabe des gebundenen Anteils [1].

Für kinetische Betrachtungen ist diese allerdings nicht ausreichend, da sie weder eine genaue Aussage über die Affinität einer Substanz zum dem Protein noch über Anzahl der Bindungsstellen macht. Hierfür müssen die Assoziationskonstanten betrachtet werden.

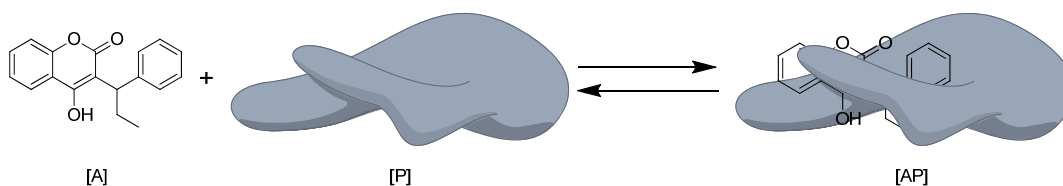


Abb. 4: Reaktionsgleichung der Proteinbindung

Wie für jede chemische Gleichgewichtsreaktion, lässt sich auch für die Proteinbindung eine Gleichgewichtskonstante berechnen:

$$(12) \quad [A] + [P] \rightleftharpoons [AP]$$

$$(13) \quad K_a = \frac{[AP]}{[A] \cdot [P]} \Leftrightarrow [AP] = K_a \cdot [A] \cdot [P]$$



Ausgehend davon, dass nur eine Bindungsstelle im Protein vorhanden ist, kann das Verhältnis  $r$  von gebundenem Arzneistoff  $AP$  zu der Gesamtproteinmenge  $P_{ges}$  wie folgt errechnet werden:

$$(14) \quad r = \frac{[AP]}{P_{ges}} = \frac{[AP]}{[AP] + [P]}$$

Wird die Umformung aus (13)  $[AP] = K_a \cdot [A] \cdot [P]$  in (14) eingesetzt ergibt sich:

$$(15) \quad r = \frac{K_a \cdot [A]}{K_a \cdot [A] + 1}$$

und für mehrere Bindungsstellen  $n$

$$(16) \quad r = n * \frac{K_a \cdot [A]}{K_a \cdot [A] + 1}$$

Ist  $r$  durch experimentelle Bestimmung bekannt, können nach Umformung der Gleichung  $K_a$  und  $n$  graphisch bestimmt werden:

$$(17) \quad \frac{r}{[A]} = n \cdot K_a - r \cdot K_a$$

Wird anschließend  $r$  gegen  $r/[A]$  aufgetragen, wird der so genannten Scatchard-Plot erhalten, wobei für  $n = 1$  eine Gerade entsteht, deren Steigung  $-K_a$  entspricht. Für  $n > 1$  ergeben sich komplexere Kurven. Werden an deren annähernd linearen Abschnitten die jeweiligen Asymptoten angelegt, entsprechen deren Steigungen ebenfalls den jeweiligen negativen Bindungskonstanten. Die Anzahl der linearen Abschnitte entspricht der Anzahl der Bindungskonstanten  $n$  [Abb. 5] [41].

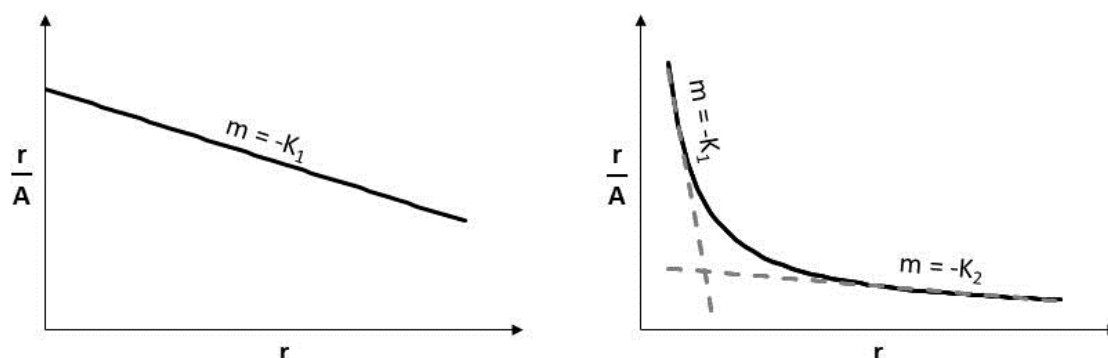


Abb. 5: Scatchard-Plot für eine Bindungsstelle (links) und zwei Bindungsstellen (rechts), die Steigungen  $m$  entsprechen den negativen Bindungskonstanten

## 1.2. Verdrängung aus der Proteinbindung

### 1.2.1. Mechanismen der Verdrängung

Binden zwei Arzneistoffe an dasselbe Protein, können sich die Bindungen gegenseitig beeinflussen. Hierbei sind mehrere Fälle möglich:

- a) Zwei Stoffe, die an dieselbe Stelle binden, treten in direkte Konkurrenz miteinander.
- b) Ein Stoff verändert durch seine Bindung an das Protein dessen Konformation und sorgt für eine geänderte Bindungsaffinität des anderen Stoffes durch allosterische Modulation des Proteins.
- c) Ein Stoff blockiert durch seine Bindung an das Protein den Zugang eines anderen Stoffes zu seiner Bindungsstelle.

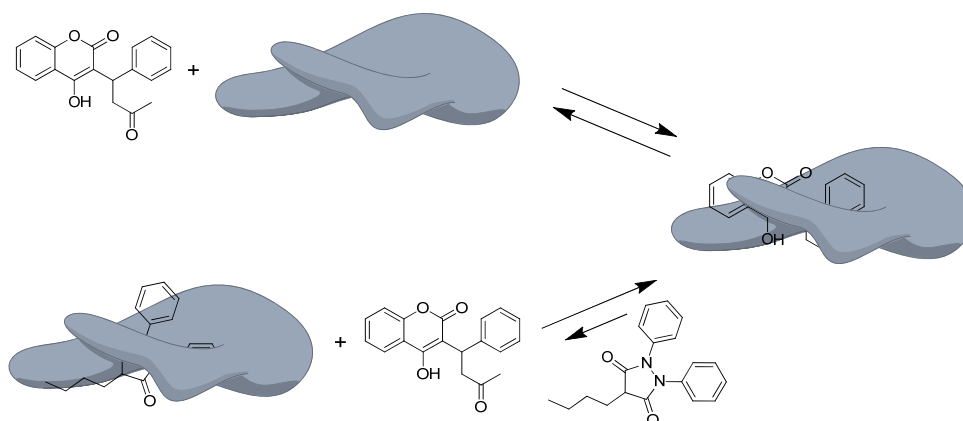
Für Fall a) sind die Möglichkeiten denkbar, dass ein Arzneistoff zusätzlich zu einer schon bestehenden Medikation verabreicht wird, oder dass zwei Arzneistoffe gleichzeitig verabreicht werden.

Erhält ein Patient zu seiner Medikation einen zweiten Arzneistoff und hat dieser eine höhere Affinität zur Bindungsstelle, kann dieser den ersten aus seiner Bindung verdrängen und somit dessen Plasmaspiegel erhöhen. Ist seine Affinität dagegen niedriger, wird er selbst nicht so stark an das Protein gebunden und seine Blutspiegel steigen.

Da bei der Bindung allerdings ein dynamischer Vorgang zugrunde liegt, bei dem ein steter Wechsel zwischen gebundener und freier Form stattfindet, handelt es sich auch hier eher um eine Konkurrenz als um eine direkte Verdrängung.

Werden beide Arzneistoffe gleichzeitig verabreicht, treten sie unmittelbar in Konkurrenz um die Bindestelle. Hierbei kann der Stoff mit der niedrigeren Affinität zur Bindestelle weniger stark binden, als es ohne Konkurrenz der Fall wäre. Das Resultat ist somit in beiden Fällen annähernd gleich.

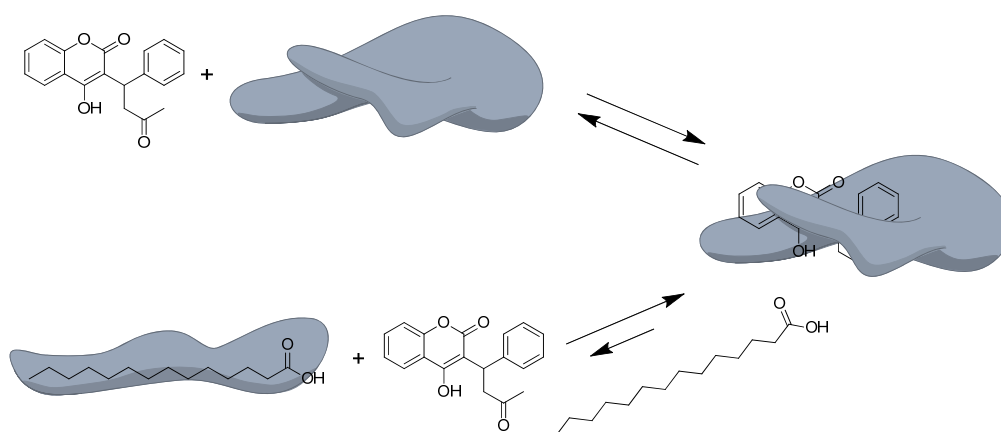
Eine bekanntes Beispiel hierfür sind die Arzneistoffe Warfarin und Phenylbutazon, die beide an die Sudlow-I-Bindestelle des HSAs binden und bei denen Warfarin aufgrund seiner schwächeren Affinität verdrängt wird [21, 22, 42, 43] [Abb. 6].



**Abb. 6: Verdrängung von Warfarin aus der Bindung zu HSA durch Phenylbutazon**

In Fall b) sind ebenfalls zwei mögliche Beeinflussungen der Bindung denkbar. Nachdem ein erster Arzneistoff, der eine Konformationsänderung des Proteins hervorruft, an einer von der Bindestelle des zweiten Arzneistoffes entfernten Bindestelle gebunden hat, kann dessen Bindungsstelle eine erhöhte oder eine verminderte Affinität für den zweiten Arzneistoff ausweisen.

So wird zum Beispiel die Sudlow-I-Stelle durch langkettige Fettsäuren alloster moduliert, wodurch in deren Anwesenheit Liganden mit Affinität zu Sudlow-I eine niedrigere Bindung haben. Auf die Häm-Bindungsstelle hat die Anwesenheit von Fettsäuren den gegenteiligen Effekt, sie wird so verändert, dass sie eine höhere Affinität für Häm aufweist. Unabhängig davon beeinflusst die Bindung von Häm Sudlow-I, wodurch diese ihre Liganden Isoniazid und Rifampicin schwächer bindet [35, 44] [Abb. 7].



**Abb. 7: Reduktion der Bindung von Warfarin an HAS durch Modulation mit Myristinsäure**

In Fall c) wird durch sterische Blockade der Bindungsstelle eines Proteins der Zugang zu dieser erschwert oder vollständig verhindert. Ein Beispiel hierfür wäre die Blockade des aktiven Zentrums der Enzyme COX-I und COX-II durch Acetylsalicylsäure. Diese

acetyliert einen Serinrest dieser Proteine, wodurch der Zugang für das eigentliche Substrat Arachidonsäure nicht mehr möglich ist [Abb. 8] [45].

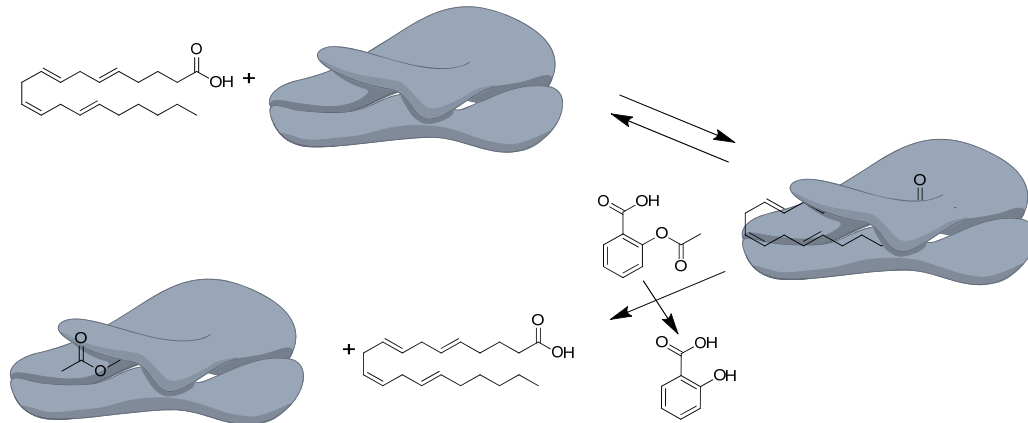


Abb. 8: Blockade des aktiven Zentrums der COX durch Acetylsalicylsäure

Die Verdrängung von Arzneistoffen kann somit auf unterschiedlichem Wege erfolgen. Inwieweit hierbei im Einzelfall Konkurrenz und/oder allosterische Modulation eine Rolle spielen, muss jeweils untersucht werden und kann nicht aus den Strukturen abgeleitet werden, da gleiche Moleküle auch unterschiedliche Effekte haben können. Zum Beispiel modulieren Fettsäuren nicht nur die Warfarinbindestelle, sondern treten auch in Konkurrenz mit Warfarin um diese [46, 47].

## 1.2.2. Klinische Relevanz der Verdrängung von Arzneistoffen aus der Proteinbindung

Die klinische Relevanz der Verdrängung von Arzneistoffen aus ihrer Proteinbindung ist stark umstritten. Auch wenn es eine Reihe von Fällen gibt, bei denen eine solche Verdrängung mit erhöhten unerwünschten Arzneimittelwirkungen verbunden ist, ist diese so gut wie nie alleine hierfür verantwortlich [Tab. 4]. Lediglich im Falle der Kombination Chloralhydrat und Warfarin scheint einzig die Verdrängung für die dabei auftretende Erhöhung der Warfarin-Plasmaspiegel verantwortlich zu sein [38].

Verdrängter AS	Verdrängender AS	Zusätzlicher Pathomechanismus
Warfarin	Phenylbutazon	Inhibition des Metabolismus [42, 48-50]
	Sulfamethoxazol	Inhibition des Metabolismus [51]
	Chloralhydrat	Wahrscheinlich nur Verdrängung [52, 53]
Tolbutamid	Sulfonamide	Inhibition des Metabolismus [54, 55]
Methotrexat	Salicylsäure	Hemmung der renalen Clearance [56, 57]
Phenytoin	Valproinsäure	Inhibition des Metabolismus [58]

Tab. 4: Beispiele klinisch relevanter Wechselwirkungen bei denen eine Verdrängungen auftritt [59]

Wie unter 1.1.2 erklärt, wird die renale Clearance kaum von der Proteinbindung beeinflusst. Vorwiegend renal eliminierte Arzneistoffe werden bei einer Verdrängung aus der Bindung somit vermehrt ausgeschieden und der Plasmaspiegel bleibt weitestgehend konstant. Die Halbwertszeit des Stoffes wird dadurch zwar leicht verkürzt, aber dies ist in der Praxis meist kaum relevant.

Kommt es bei einem Wirkstoff wie Methotrexat (MTX), der größtenteils unverändert über die Nieren ausgeschieden wird, zu einem Anstieg der Plasmakonzentration aufgrund von Verdrängung, muss dieses in einem weiteren Mechanismus begründet liegen. Dies ist hierbei auch der Fall. Wird MTX in Kombination mit Acetylsalicylsäure gegeben, inhibiert deren Metabolit Salicylsäure die renale Clearance des MTXs, wodurch der Ausgleichsmechanismus, der normalerweise die Konzentration konstant halten würde, inhibiert ist [56, 57].

Arzneistoffe, deren Elimination vorwiegend über die Leber erfolgt werden bei der Verdrängung aus der Bindung schneller metabolisiert, wodurch ihre Plasmaspiegel ebenfalls konstant bleiben. Analog zur renalen Elimination kommt es hier auch nur dann zu

einer Erhöhung der Spiegel, wenn zusätzlich der Abbau der Substanz gehemmt wird, wie es bei dem Beispiel Warfarin/Phenylbutazon der Fall ist [42, 48-50].

Klinisch relevant wird die Verdrängung allerdings erst, wenn der Arzneistoff eine hohe Proteinbindung, eine geringe therapeutische Breite hat und die Erhöhung der freien Plasmakonzentration über einen längeren Zeitraum anhält bzw. der Stoff schon bei kurzfristiger Überdosierung unerwünschte Wirkungen verursachen kann.

So ist bei Warfarin nicht mit einer erhöhten Blutungsneigung zu rechnen, wenn ein Patient einmalig Chloralhydrat zusätzlich einnimmt, da der Plasmaspiegel nur kurzzeitig erhöht wird und dies bei einem Arzneistoff mit einer langen Halbwertszeit nur einen geringen Einfluss auf den Steady-State-Spiegel hat [53].

Die klinische Relevanz der Verdrängung alleine ist somit gering. Nur wenn andere Faktoren dazu kommen, kann sie zu relevanten Interaktionen führen.[38, 60]

### **1.3. Methoden zur Bestimmung von Proteinbindungskonstanten**

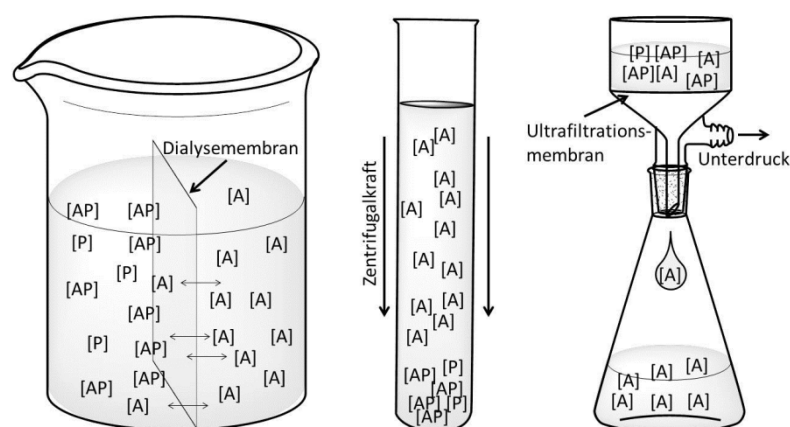
Das Ausmaß der Proteinbindung an die Plasmaproteine und die Bindungskonstanten lassen sich auf unterschiedliche Art und Weise bestimmen. Die im Folgenden erläuterten Methoden unterscheiden sich hierbei sowohl in den zugrunde liegenden kinetischen Prinzipien, als auch in Bezug auf die Ähnlichkeit der Versuchsbedingungen zu den physiologischen Verhältnissen.

#### **1.3.1. Gleichgewichtsdialyse, Ultrazentrifugation und Ultrafiltration**

##### **Gleichgewichtsdialyse**

Die wohl einfachste und am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung ist die Gleichgewichtsdialyse. Der schematische Aufbau einer solchen Bestimmung ist in Abb. 9 dargestellt. Es wird eine Kammer verwendet, die durch eine semipermeable Dialysemembran in zwei getrennte Räume unterteilt ist. Zu Beginn der Messung befinden sich in einem Raum Protein und Arzneistoff, der andere Raum enthält nur Puffer. Die Membran kann nur von niedermolekularen Substanzen, wie den Pufferbestandteilen und dem zu bestimmenden Arzneistoff ungehindert pas-

siert werden. Auf diese Weise stellt sich je nach Bindungsaffinität zum Protein ein Gleichgewicht zwischen den beiden Räumen ein. Nach erfolgter Gleichgewichtseinstellung wird die Konzentration des Arzneistoffes in beiden Kammer bestimmt.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Gleichgewichtsdialyse (links), der Ultrazentrifugation (Mitte) und der Ultrafiltration (rechts), [A]: Arzneistoff, [P]: Protein, [AP]: Arzneistoff-Protein-Komplex

Die Methode kann durch Verwendung von Plasma, Temperierung der Kammer und Wahl eines dem Plasma ähnlichen Puffers sehr nahe an die im Körper herrschenden Bedingungen angepasst werden. Bei der Verwendung von Plasmaproben muss bei der Auswertung berücksichtigt werden, dass diese sich bereits in Körper in einem Gleichgewichtszustand befunden haben. Dieser kann sich während der Dialyse durch Verdünnungseffekte des Puffers und durch pH-Wert-Änderungen aufgrund der Diffusion der Pufferbestandteile ändern [61, 62]. Durch die Verwendung von sackförmigen Dialysemembrane, die mit Protein- und Wirkstofflösung befüllt und anschließend in ein Puffergefäß getaucht werden, ist eine solche Bestimmung apparativ sehr einfach durchführbar.

Die einfache Anwendung und die hohe Anpassungsfähigkeit dieser Bestimmungsmethode erklären ihre weite Verbreitung und die Vielzahl von Untersuchungen, die mit ihr durchgeführt werden [63-65].

Eine Sonderform der Gleichgewichtsform ist die Mikrodialyse, bei der eine mit Puffer durchspülte Dialysesonde in die Untersuchungslösung getaucht wird. Diese Sonde kann aufgrund ihrer Größe auch in die Blutbahn oder ein Organ eingebracht werden, wodurch *In-vivo*-Messungen möglich sind. Da die Dialyse nicht in ruhender Lösung sondern in Strömung bestimmt wird, muss dies für die Berechnung der Proteinbindung berücksichtigt werden [66]. Wegen des hohen apparativen Aufwands wird diese Methode seltener angewendet.

## Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation ist ebenfalls eine sehr einfache Bestimmungsmethode. Wirkstoff- und Proteinlösung werden in Puffer bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert. Anschließend lassen sich die wesentlich schwereren Proteinmoleküle und der Proteinwirkstoffkomplex durch Zentrifugation sedimentieren und der Wirkstoffgehalt im Überstand bestimmen [Abb. 9]. Die Ultrazentrifugation wird meist in Kombination mit anderen Verfahren wie der Ultrafiltration angewandt.

Durch geeignete Versuchsbedingungen und die Möglichkeit mit Vollblut oder Plasma inkubieren zu können, kann dieses Verfahren ebenfalls sehr nahe an die Verhältnisse im Organismus angepasst werden [67, 68].

## Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration wird zwischen der diskontinuierlichen und der kontinuierlichen Versuchsdurchführung unterschieden. Da sich die Kapitel 2 und 3 intensiv mit letzterer beschäftigen, wird im Folgenden nur auf die diskontinuierliche Variante eingegangen.

Wie bei der Ultrafiltration werden zunächst Protein- und Arzneistofflösung bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert. Anschließend erfolgt die Trennung des freien Arzneistoffes von dem ungebundenen Protein und dem Protein-Arzneistoff-Komplex mit Hilfe einer Ultrafiltrationsmembran. Diese Membran hat eine molekulare Durchlassgrenze unterhalb des Molekulargewichts des Proteins. Da die Kraft des Schwerfeldes meist nicht für eine schnelle und vollständige Filtration ausreicht, wird diese durch Anlegen von Druck oder durch Zentrifugieren beschleunigt. Anschließend wird der Arzneistoffgehalt im Filtrat bestimmt.

Auch bei diesem Verfahren können Vollblut oder Plasma verwendet und die Parameter Temperatur und Pufferzusammensetzung den physiologischen weitestgehend angepasst werden [69-71].

Alle drei Methoden sind reine Trennmethode zur Separation des freien Wirkstoffs von freiem Protein und dem Protein-Arzneistoffkomplex. Die Bestimmungen der Substanzkonzentrationen müssen in separaten Versuchsteilen mit geeigneten Methoden wie Absorptionsspektroskopie im ultravioletten oder sichtbaren Lichtbereich



(UV/Vis-Spektroskopie), Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), Kapillarelektrophorese (CE) oder Massenspektrometrie (MS) erfolgen [72].

### **1.3.2. Chromatographische und elektroforetische Methoden**

Die verwendeten Bestimmungsmethoden der Proteinbindung mittels HPLC und CE sind weitestgehend identisch, weshalb sie im folgenden Abschnitt zusammen betrachtet werden. Wichtig ist hierbei, dass auch wenn das zugrunde liegende Prinzip jeweils identisch ist, sich beide Verfahren in ihren Trennprinzipien deutlich unterscheiden. Während bei der HPLC vor allem Verteilungsvorgänge zwischen einer stationären und einer mobilen Phase eine Rolle spielen, wird bei der CE mittels der Mobilität von Stoffen im elektrischen Feld getrennt [73].

#### **Affinitätschromatographie**

Die zu bestimmende Substanz wird hierbei auf einer mit immobilisiertem Protein gepackten Säule retiniert. Je höher hierbei die Affinität zum Protein ist, desto größer ist die Retentionszeit. Die Bestimmung der Bindungskonstanten erfolgt über eine Kalibrierung mit Substanzen bekannter Bindung [74, 75].

Bei der kapillarelektrophoretischen Variante des Verfahrens enthält der Trennpuffer das gelöste Protein. Die Migrationszeit des Stoffes nähert sich so mit steigender Affinität zum Protein an die des Proteins an [76, 77].

#### **Frontalanalyse**

Für die Frontalanalyse in der HPLC sind zwei Varianten beschrieben. Bei der ersten wird über eine Säule mit einem geeigneten Säulenmaterial eine Probe, die das Protein und den Wirkstoff gelöst in Puffer enthält, so aufgetrennt, dass ein Chromatogramm wie in Abb. 10 A erhalten wird. Aus den Höhen der drei Plateaus kann so mit Hilfe der Probenkonzentration das Verhältnis von gebundenem und ungebundenem Arzneistoff berechnet werden [78, 79].

Die zweite Variante verwendet - wie bei der Affinitätschromatographie - eine mit immobilisiertem Protein gepackte Säule. Diese wird mit Wirkstofflösungen verschiedener

Konzentration beladen, bis die Säule gesättigt ist. Auf diese Weise wird für jede Konzentration eine so genannte Durchbruchkurve erhalten. Werden diese wie in Abb. 10 B übereinander gelegt, lässt sich aus der Wirkstoffkonzentration und der mittleren Lage des Durchbruchs die Proteinbindungskonstante und der gebunden Wirkstoffanteil berechnen [80, 81].

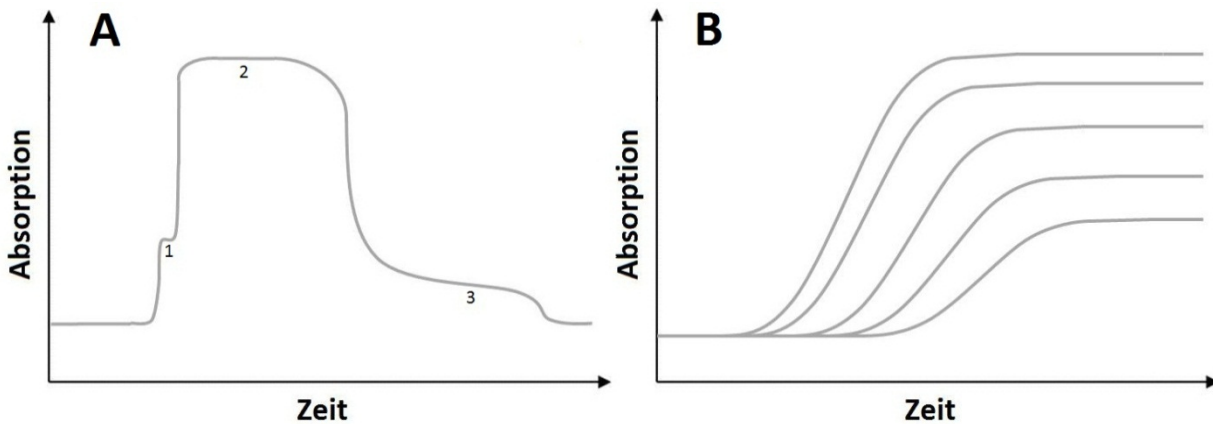


Abb. 10: Chromatogramme der Frontalanalyse mit mobilem (A) und immobilisiertem (B) Protein; 1: freies Protein, 2: Protein-Wirkstoffkomplex, 3: freier Wirkstoff

Die kapillarelektrophoretische Frontalanalyse wird analog zur ersten Variante in der HPLC durchgeführt. Nach Injektion des Protein-Wirkstoffgemisches kommt es zu einer Auftrennung in die drei Plateaus 1, 2 und 3 ähnlich wie dem Chromatogramm in Abb. 10 B, allerdings ist deren Anordnung abhängig von der Ladung der Arzneistoffe im Puffer. So migriert eine kationische Substanz bei kathodenseitiger Detektion am schnellsten, gefolgt vom Protein-Wirkstoffkomplex. Das ungebundene Protein migriert am langsamsten. Für anionische verhält es sich anders herum [Abb. 11]. Die Berechnung der Bindungskonstanten erfolgt analog zur HPLC-Methode [82, 83].

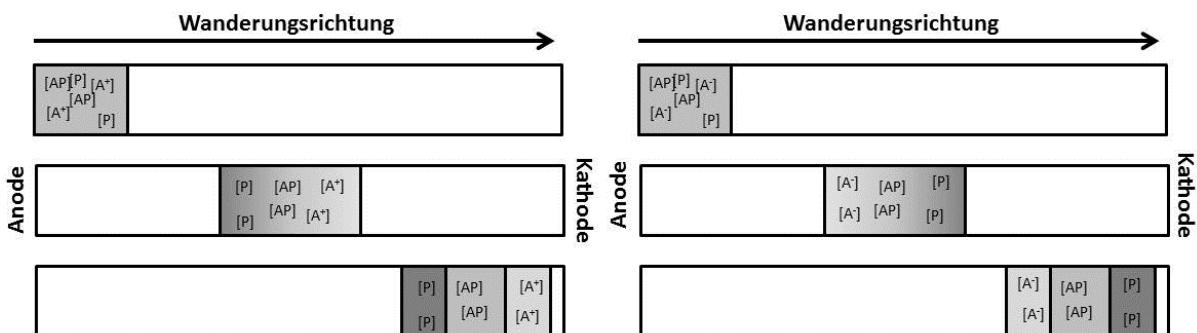


Abb. 11: Migrationsreihenfolge bei der Frontalanalyse eines kationisch (links) und eines anionisch (rechts) vorliegenden Arzneistoffes [A<sup>+</sup>: Arzneistoff kationisch, [A<sup>-</sup>: Arzneistoff anionisch, [AP]: Arzneistoff-Proteinkomplex, [P]: freies Protein

## Hummel-Dreyer- und Vacancy-Peak-Methode

Beiden Methoden liegt das gleiche Prinzip zu Grunde. Es wird jeweils eine Größenausschluss- oder Ionenaustauscher-Säule eingesetzt. Nach Hummel-Dreyer wird ein wirkstoffhaltiger Puffer als mobile Phase verwendet und als Probe Protein injiziert. Es resultiert ein Chromatogramm mit einem positiven und einem negativen Peak. Der positive ist der Komplex aus Protein und Wirkstoff, der negative die „fehlende“ Wirkstoffmenge, die in dem Komplex gebunden und an der der Puffer an dieser Stelle verarmt ist [Abb. 12] [84, 85].

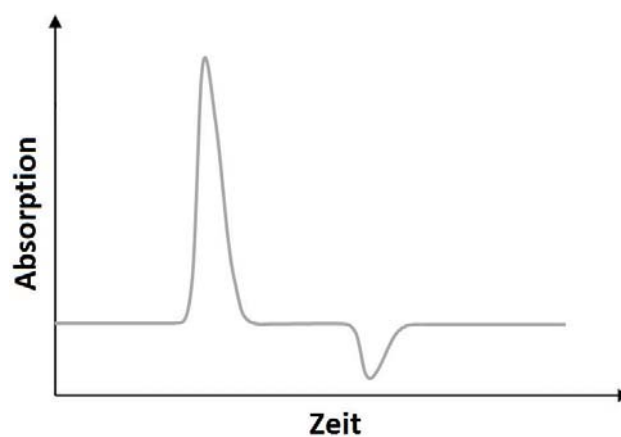


Abb. 12: Chromatogramm der Bestimmung mittels Hummel-Dreyer-Methode

Wird der mobilen Phase sowohl der Arzneistoff als auch das Protein zugegeben und nur Puffer als Probe injiziert, erscheinen beide Signale als negative Peaks. Diese Methode nennt sich „Vacancy Peak“ [86].

Beide Methoden können analog in der CE angewendet werden. Die Bindungskonstanten werden jeweils über die Verhältnisse der beiden Peakflächen zueinander berechnet [87].

Ein Vorteil dieser Methoden ist, dass sie im Gegensatz zu den unter 1.3.1 beschriebenen sehr schnell und automatisiert durchgeführt werden können. Von Nachteil ist, dass sie durchaus unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zu dem Dialyse- und Ultrafiltrationsmethoden liefern. Im Fall der HPLC kann dies zum einen in der Verwendung von gebundenem Protein begründet sein, da sich dieses in seinen Eigenschaften von freiem unterscheidet. Bei der Verwendung von ungebundenem Protein kann die Affinität der Arzneistoffe zum Säulenmaterial stören, da dann ein weiterer Bindungspartner anwesend ist. Bei den CE-Verfahren wird neben der freien Diffusion

der Teilchen eine Migration durch das elektrische Feld aufgezwungen, was ebenfalls die Wechselwirkung zwischen Protein und Arzneistoff verändern kann.

### 1.3.3. Spektroskopische Methoden

#### Fluoreszenzspektroskopie

Die Proteinbindungsbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie basiert auf dem Vorhandensein eines Tryptophanrestes in der Domäne IIA der Sudlow-I-Bindestelle des HSAs. Dieser fluoresziert selektiv, wenn eine Anregungswellenlänge zwischen 295 und 305 nm gewählt wird. Wird unter 295 nm angeregt, emittieren zusätzlich die Tyrosinreste und stören dadurch die Bestimmung. Da Emissionswellenlänge und -intensität von der chemischen Umgebung des Indolrings abhängen und sich bei der Bindung von Liganden ändern, können Veränderungen beider Parameter für die Bestimmung der Proteinbindung herangezogen werden.

BSA hingegen enthält zwei Tryptophanreste, einen in einer der Sudlow-I-Bindestelle analogen Position des Proteins und einen auf der Oberfläche des Proteins. Letzterer ist daher wenig an der Proteinbindung beteiligt, weshalb im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass Änderungen der Fluoreszenz des Proteins nur auf den ersten Rest zurückzuführen sind und BSA und HSA vergleichbare Ergebnisse liefern.

Allerdings liegt im HSA im Gegensatz zum BSA der Trp-Rest aufgrund seiner Umgebung bereits teilweise gequenchet vor. Hierdurch kann eine Veränderung seiner Umgebung durch das Binden eines Liganden einen anderen Effekt auf das Fluorophor haben, als es beim ungequenchten Rest des BSAs der Fall ist. Wie stark dieser Unterschied ist, muss daher im Einzelfall zunächst untersucht werden [14].

Aufgrund der schnellen Durchführung, des einfachen apparativen Aufwands und des geringen Substanzbedarfs ist die Bestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie eine der am häufigsten angewandten Methoden. Wie unter 1.3.1 beschrieben, lassen sich auch hier Parameter wie z.B. Pufferzusammensetzung und Temperatur sehr nahe den physiologischen Verhältnissen anpassen, weshalb vergleichbare Ergebnisse zu den Dialyse-, Ultrazentrifugations- und Ultrafiltrationsmethoden erhalten werden können [88-90].

## NMR-Spektroskopie

Auch die Magnetresonanzspektroskopie kann zur Bestimmung von Bindungskonstanten verwendet werden. Hierbei werden die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen, Peakbreiten und Relaxationszeiten der Signale des Proteins in Anwesenheit und Abwesenheit des zu bestimmenden Arzneistoffes bestimmt und verglichen [91, 92].

### 1.3.4. Theoretische Methoden

*In-silico*-Experimente zur Vorhersage pharmakokinetischer Parameter sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Auch wenn erste Erfolge auf diesem Gebiet zu verzeichnen sind und Proteinbindungen erfolgreich vorhergesagt werden konnten [93, 94], ist die Entwicklung noch nicht so weit vorangeschritten, dass sie eine gleichwertige Alternative zu den oben beschriebenen experimentellen Methoden darstellt. Zwar ist es möglich, auf diese Weise Anhaltspunkte für die Proteinbindung einer Substanz zu bekommen, aber es ist in jedem Fall nötig, diese in einem *In-vitro*- oder *In-vivo*-Experiment zu überprüfen. Auf eine alleinige Berechnung ist beim momentanen Forschungsstand nicht ausreichend Verlass.

## 1.4. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die von *Heinze* [95] etablierte und von *Albert* [96] weiterentwickelte Methode universeller einsetzbar zu machen und Lösungen für früher aufgetretene Bestimmungsprobleme zu finden. Hierfür sollten die folgenden Punkte untersucht werden:

1. Entwicklung neuer Messzellen, die zum einen die oftmals hohen Proteinverluste während der Messung minimieren sollten und mit denen zum anderen Substanzen, die aufgrund von Adsorption an die bisherigen Zellen nicht messbar waren, bestimmen werden können.
2. Entwicklung einer Methode, die stark hydrophobe Substanzen der Messung zugänglich macht und die nicht potentiell Protein denaturierende Chemikalien wie DMSO, verwendet.
3. Weiterführung der von *Albert* begonnenen Experimente zur Verdrängung von Arzneistoffen aus der Plasmaproteinbindung, um die verwendete Methodik zu verbessern und um Rückschlüsse auf Bindestellen und –arten von Arzneistoffen möglich zu machen.
4. Untersuchung der Veränderungen der Proteinbindung durch kovalent an Albumin bindende Arzneistoffe.
5. Untersuchung der Unterschiede in der Proteinbindung einzelner Stereoisomere einer Verbindung am Beispiel der Ephedraalkaloide Ephedrin und Pseudoephedrin.
6. Bestimmung der Proteinbindung von neu entwickelten Fluorchinolonen, um aus diesen Ergebnissen Struktur-Bindungsbeziehungen ableiten zu können, die eine weitere Optimierung der Verbindungen ermöglicht.

## **2. Aufbau der Messanlage für die kontinuierlichen Ultrafiltration**

## 2.1. Messanlage

Die in den Kapiteln 3 und 4 beschriebenen Experimente wurden mit Hilfe der beiden von *Heinze* und *Albert* aufgebauten Messanlagen durchgeführt [Abb. 13] [95, 96]. Diese basieren auf des von *Illy* und *Oehlmann* entwickelten Messaufbaus von *Nickel et al.* (Universität Bonn) [97, 98]. Die jeweiligen Optimierungen und baulichen Unterschiede werden im Folgenden bei den einzelnen Bauteilen der beiden Anlagen 1 und 2 beschrieben.

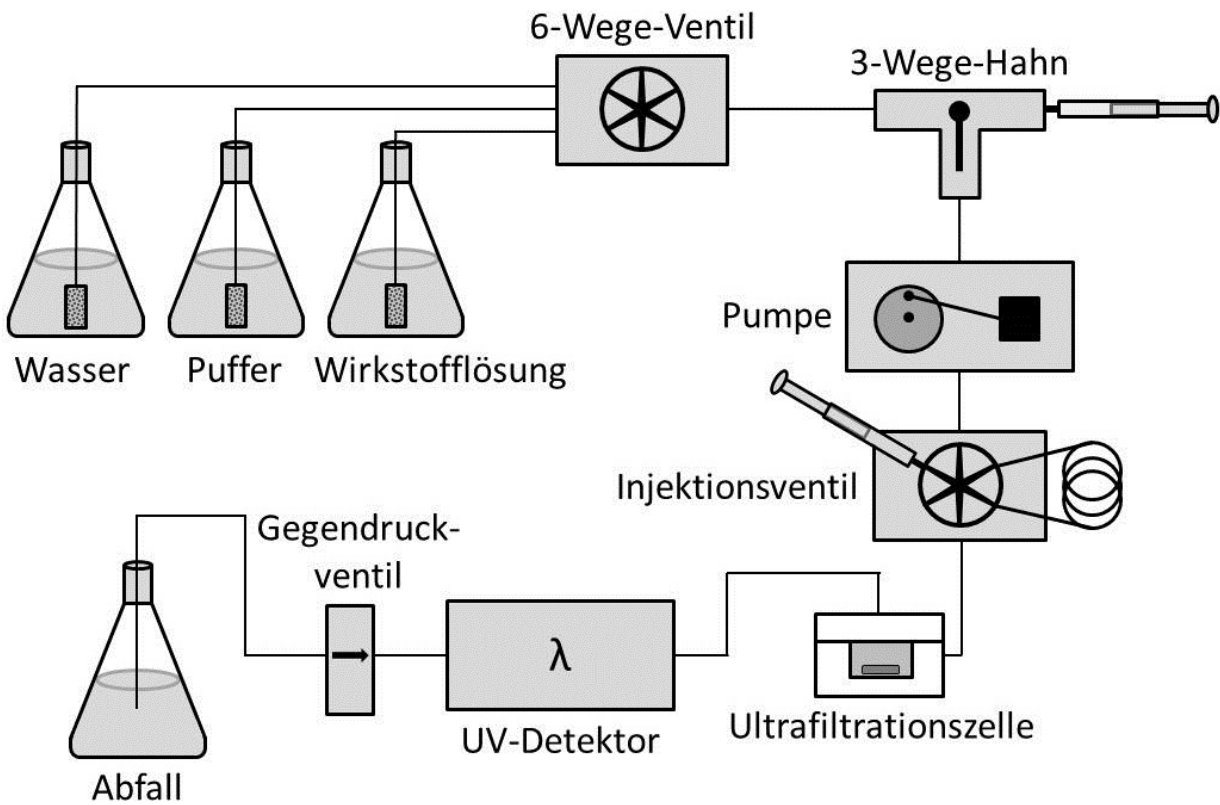


Abb. 13: Schematischer Aufbau der Messanlage zur kontinuierlichen Ultrafiltration



### 2.1.1. Durchführung der Messungen

Im folgenden Abschnitt sind die einzelnen Schritte einer Bestimmung der Proteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration aufgelistet. In Klammern sind jeweils die Kapitel angegeben, in welchen der jeweilige Punkt detailliert beschrieben wird.

Vor der eigentlichen Messung müssen zunächst folgende Vorbereitungen durchgeführt werden:

- Herstellung und Entgasung der Puffer- und Wirkstofflösung [3.1.4, 3.1.6]
- Einbau der Messzelle und der Ultrafiltrationsmembran [2.1.3, 3.2.2]
- Spülen der Anlage mit Puffer, bis eine konstante Basislinie erreicht ist
- Eingabe der Substanz- und Proteineinwaage, sowie der Messzeiten der einzelnen Schritte in die Datenmasken der Messsoftware [2.2.2]
- Vorbereitung der Proteinlösung [3.1.7]

Anschließend beginnt die Aufzeichnung der Messdaten:

- Starten der Messung mit der Programmfunktion „Datenaufzeichnung“ [2.2.2]
- Spülen der Anlage mit Wirkstofflösung, bis konstante Absorption am Detektor erreicht ist [3.2.2]
- Spülen der Anlage mit Puffer, bis Absorption am Detektor „Null“ erreicht hat
- Proteininjektion [3.2.2]
- Spülen der Anlage mit Puffer, bis Absorption am Detektor „Null“ erreicht hat [3.2.2]
- Spülen der Anlage mit Wirkstofflösung, bis konstante Absorption am Detektor erreicht ist [3.2.2]
- Spülen der Anlage mit Puffer, bis Absorption am Detektor „Null“ erreicht hat [3.2.2]
- Programm beendet die Datenaufzeichnung [3.2.2]

Nach der Messung müssen die folgenden Wartungsschritte durchgeführt werden:

- Ausbau der Messzelle und Reinigung der Ultrafiltrationsmembran [3.2.3]
- Reinigung des Injektionsventils [3.2.3]
- Spülen der Anlage mit Wasser
- Auswertung der aufgezeichneten Daten [3.3]

## 2.1.2. Bauteile der Anlage

### Vorratsgefäße

Die verwendeten Lösungen wurden aus Messzylindern über Edelstahlfritten mit einer Porengröße von 2 µm angesaugt. Dies verhindert, dass Partikel in die Pumpe und die Kapillaren der Anlage gelangen und diese verstopfen. Die Messzylinder wurden mit Parafilm verschlossen, um das Verdunsten der Lösungen und eventuelle Kontaminationen durch Staub zu vermeiden. Mit Hilfe der Differenz der Volumina in den Gefäßen und der jeweiligen Dauer des Experiments wurde nach jeder Messung die Flussrate kontrolliert.

### 6-Wege-Ventil

Um zwischen den Lösungen zu wechseln, wurden 6-Wege-Ventile (Rheodyne, Cotati, CA, USA, Modell 5011) verwendet. Während der Messung werden nur die Positionen für Wirkstoff- und Pufferlösung benötigt. Zwei weitere Positionen sind mit Wasser und Methanol-80% zur Reinigung der Anlage belegt. Die übrigen Stellungen werden nicht benötigt und sind über einen Kurzschluss dicht miteinander verbunden, um Ansaugen von Luft zu verhindern [Abb. 14]. Die Ventile schalten durch Anlegen von Druckluft und werden beide über einen Controller gesteuert, der sowohl den vollautomatischen Zugriff über die Steuerungssoftware als auch eine manuelle Bedienung ermöglicht.



Abb. 14: Belegung der Positionen des 6-Wege-Ventils

## Pumpe und 3-Wege-Hahn

Die Anlagen sind je mit einer HPLC-Pumpe (Modell 2250, Bischoff, Leonberg, Deutschland) ausgestattet. Es handelt sich hierbei um Doppelkopfpumpen, die auch bei einem für die Experimente typischen niedrigen Druck von 0.2-0.3 bar einen pulsationsarmen und gleichmäßigen Fluss ermöglichen. Um Schäden an den Bauteilen der Anlage und der Ultrafiltrationsmembran zu verhindern, wurde das Systemlimit der Pumpen auf 4.0 bar eingestellt. Wird dieser Druck überschritten, schalten die Pumpen selbsttätig ab. Mit Hilfe der Purge-Ventile und des vorgeschalteten 3-Wege-Hahns können die verwendeten Lösungen manuell über eine Spritze angesaugt und Luft aus den Anlagen entfernt werden. Die Pumpensteuerung ist direkt am integrierten Bedienungsfeld oder automatisch über die Steuersoftware möglich.

## Injektionsventil

Für die Proteininjektion ist zwischen Pumpe und Messzelle jeweils ein weiteres 6-Wege-Ventil (Modell 7010, Rheodyne, Cotati, CA, USA) geschaltet. Dieses ist mit einer Dosierschleife mit einem Volumen von 1 ml ausgestattet und kann nur manuell bedient werden [Abb. 14].

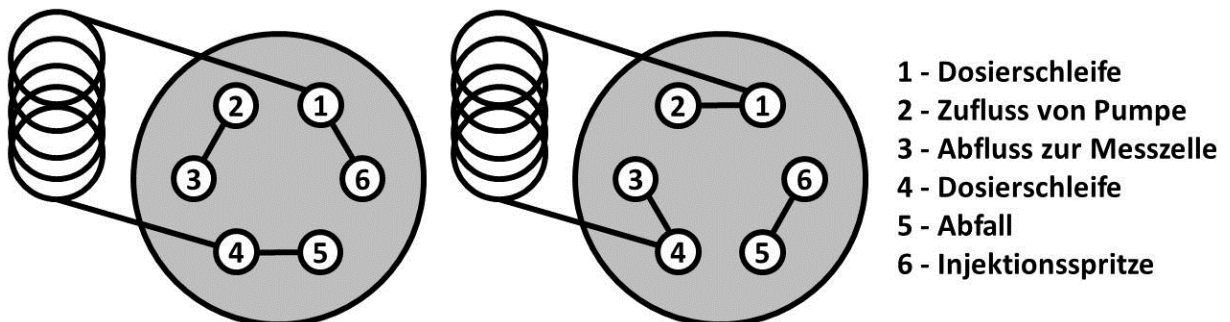


Abb. 15: Positionen des Injektionsventils

## UV-Detektor

Die beiden Messanlagen sind mit zwei UV-Detektoren unterschiedlicher Bauart ausgestattet. Anlage 1 verwendet ein Einstrahlphotometer (Modell M87, Knauer, Berlin, Deutschland) mit einem Wellenlängenbereich von 205-400 nm und Anlage 2 einen DAD-3L-Detektor (Bischoff, Leonberg, Deutschland), der bis zu drei Wellenlängen im

Bereich von 190-395 nm gleichzeitig detektieren kann. Von diesen drei Signalen können von der verwendeten Software nur zwei aufgezeichnet werden. Die Schichtdicke der Durchflussküvette beider Geräte beträgt 1 cm. Für Messungen über 400 nm wurde in Anlage 2 ein zweiter Detektor (Varian Pro Star UV/Vis Detector, Model 320, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland) zwischen dem ersten DAD-3L und dem Gegendruckventil in Serie eingebaut und jeweils ein Signaleingang des Messrechners mit jeweils einem Signalausgang der beiden Detektoren verbunden, wobei für den Varian-Pro-Star-UV/Vis-Detector ein BNC-Stecker-Adapter verwendet wurde. Durch die Serienschaltung ergeben sich für beide Geräte unterschiedliche Totzeiten. Da allerdings beide Signale von der Auswertungssoftware als getrennte Experimente betrachtet werden, stört dies die Messung nicht.

### **Gegendruckventil und Abfallgefäß**

In beiden Anlagen ist zwischen Detektor und Abfallgefäß ein Gegendruckventil (Artikel: SSI-06-0120, Spence Strainers International, Walden, NY, USA) eingebaut, das einen Druck von 0.2 bis 10 bar aufbauen kann. Dies ist notwendig um ein Entspannen der Lösung nach der Messzelle zu verhindern, da sich sonst Luftblasen in den Schläuchen der Anlage bilden können. Als Abfallgefäß wurden 250-ml-Messzylinder verwendet, um das pro Messung durch die Anlagen geflossene Volumen bestimmen zu können und um die Flussrate und die Dichtigkeit zu kontrollieren.

### **2.1.3. Messzelle**

Die Messzelle stellt das zentrale Bauteil der Anlagen dar. Für die Bestimmungen wurden die bereits von *Heinze* und *Albert* beschriebenen Zellen verwendet [95, 96]. Da diese nicht für alle Messungen verwendet werden konnten, wurden sie baulich verändert und entsprechend optimiert. Die folgenden Abschnitte beschreiben den generellen Aufbau aller Messzellen anhand der PMMA-Zellen. Anschließend werden die daraus resultierenden Weiterentwicklungen erläutert und eine kurze Übersicht gegeben, welche Zelle für welche Messungen geeignet ist.

### 2.1.3.1. PMMA-Zellen (Standardzelle)

Diese Messzelle besteht aus Polymethylmethacrylat (PMMA). Abb. 16 zeigt ihren schematischen Aufbau. Sie ist durchsichtig, wodurch der korrekte Zusammenbau und die Blasenfreiheit der Mischkammer leicht überprüft werden kann.

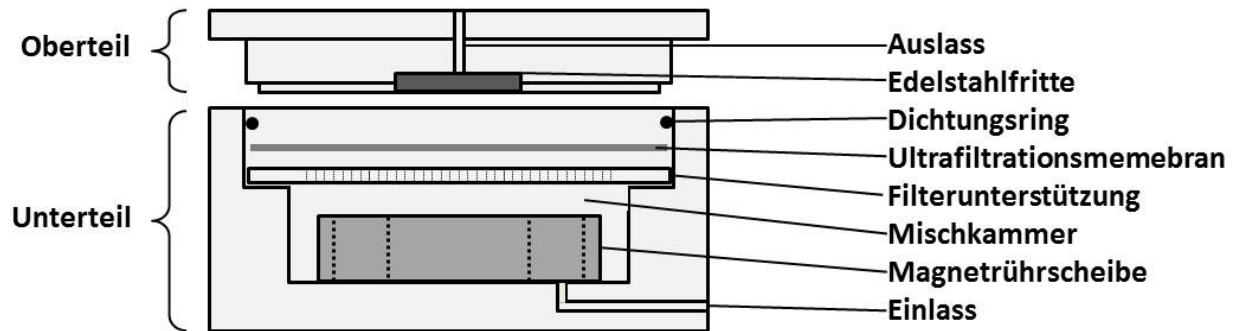


Abb. 16: Schematischer Aufbau der Messzellen

#### Oberteil

Das Oberteil dient zur Abdichtung der Messzelle. Es besitzt am Rand einen Steg, der dafür sorgt, dass der darunterliegende Dichtungsring auf den Rand der Ultrafiltrationsmembran gedrückt wird. So wird kein Druck auf deren Filtrationsfläche ausgeübt, was diese beschädigen könnte. Vor dem Auslass des Deckels befindet sich eine Stahlfritte mit einer Porengröße von 2  $\mu\text{m}$ . Diese verhindert, dass Fasern, die sich von der Membran lösen könnten, in die Durchflussküvette des Detektors gelangen und diese verstopfen oder verschmutzen. Unterhalb des Oberteils befindet sich der Dichtungsring, der verhindert, dass der Zelleninhalt seitlich aus der Messzelle austritt.

#### Ultrafiltrationsmembran

Es wurden Ultracel-Membrane (Millipore®, Bedford, MA, USA) mit einer Ausschlussgröße (MWCO) von 10 kDa verwendet. Hierbei handelt es sich um hydrophile Filter aus regenerierter Cellulose. Dieses Material zeichnet sich dadurch aus, dass es in der Regel eine geringe Adsorption gegenüber niedermolekularen Substanzen und Proteinen zeigt, es aufgrund seiner Fibrillenstruktur eine hohe Retention aufweist und es kompatibel mit organischen Lösungsmitteln ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass diese Membrane mehrfach verwendet werden können. Aus dem gleichen Grund wurde die Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Da bei längerem Gebrauch die Membran al-

tert und auch größere Moleküle passieren lässt, kann durch die Wahl dieser Größe die Membran länger verwendet werden, bis sie für Albumin (ca. 65 kDa) durchlässig wird [99].

### **Filterunterstützung**

Die Filterunterstützung besteht ebenfalls aus PMMA und ist eine Lochscheibe, die die gleichen Abmessungen wie die Ultrafiltrationsmembran aufweist. Sie schützt die Membran vor Beschädigung durch die Drehbewegung der Rührscheibe und vor dem auf dem System lastenden Druck. Sie ist in der Mitte mit 1 mm großen Bohrungen versehen, um der Flussrate keinen Widerstand entgegenzusetzen. Am Rand ist die Unterstüztung massiv und höher als in der Mitte. Das Fehlen der Löcher in diesem Bereich verhindert, dass durch den Druck des Dichtrings die Scheibe zerbricht. Die Erhöhung bewirkt, dass zwischen Membran und Lochscheibe ein kleiner Hohlraum verbleibt, wodurch über die gesamte Mittelfläche der Membran filtriert wird.

### **Unterteil, Magnetrührscheibe und Zellenhalterung**

Das Unterteil besteht aus PMMA und beinhaltet die Mischkammer. In dieser wird das Protein zurückgehalten und mit der Wirkstofflösung vermischt. Hierfür befindet sich eine Magnetrührscheibe in der Kammer. Diese hat vier Lochbohrungen und besteht aus Polytetrafluorethylen, in das ein Stabmagnet eingebettet ist. Die Bohrungen sind so angeordnet, dass sie über dem Einlass rotieren und es so zu einer besseren Durchmischung kommt [Abb. 17].

Die Messzelle ist während der Messung in eine Zellenhalterung aus Edelstahl eingespannt, die mit vier Flügelmuttern verschlossen wird. Diese Halterung sorgt für den nötigen Druck, um die Zelle dicht und verschlossen zu halten [Abb. 17]. Um eine gleichmäßige Durchmischung der Protein- und Wirkstofflösung zu gewährleisten, steht die Zellenhalterung inklusive Messzelle während des Versuchs auf einem Magnetrührer (RH basic, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland).

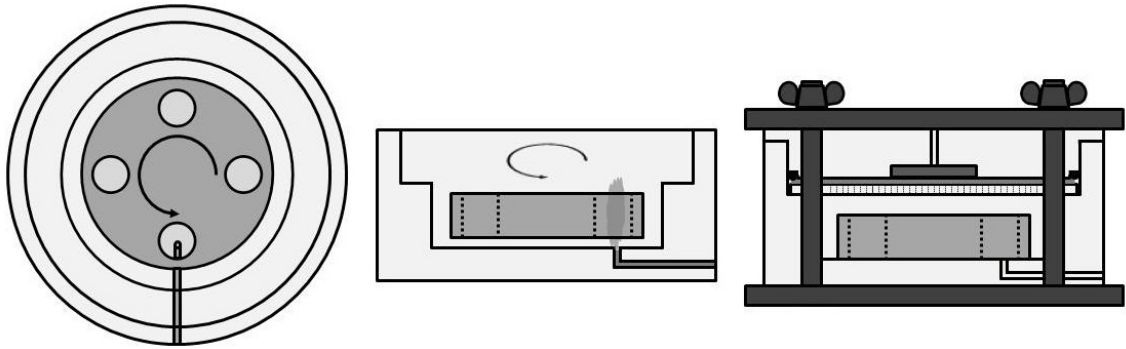


Abb. 17: Funktion der Rührscheibe in Draufsicht (links) und Seitenansicht (Mitte) des Unterteils; Messzelle eingespannt in die Zellenhalterung (rechts)

## Optimierung der PMMA-Zellen

Die bisher verwendeten PMMA-Zellen konnten oft nicht ausreichend abgedichtet werden, was eine zuverlässige Retention des Proteins an der Filtermembran nicht gewährleistete. Zur Verbesserung der Dichtigkeit wurden daher im Rahmen dieser Arbeit Zellen konstruiert, bei denen der Steg des Oberteils um 0.5 mm verkürzt wurde. Dadurch kann auf den Dichtungsring ein höherer Druck ausgeübt werden, ohne dass das Oberteil auf die Membran drückt und diese beschädigt. In Kombination mit Dichtungen mit kleinerem Durchmesser konnten die Proteindurchgänge während der Messung stark reduziert werden.

## Verwendung der PMMA-Zellen

Die PMMA-Zellen sind die bevorzugten Zellen für die Bestimmung der Proteinbindung. Das Material ist härter im Vergleich zu fluorierten Materialien wie PVDF und PTFE und somit weitestgehend abnutzungsresistent. Durch ihre Transparenz können die Vorgänge in der Mischkammer jederzeit verfolgt werden. Sie sind leichter zusammenzubauen und kostengünstiger in der Herstellung als die Zellen aus PVDF. Daher sollte auf diese nur zurückgegriffen werden, wenn die Messung mit PMMA-Zellen nicht möglich ist.

### **2.1.3.2. PVDF-Zellen**

Für die Messung von Substanzen, die eine starke Adsorption an PMMA zeigten, wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit PVDF-Zellen konstruiert. Der schematische Aufbau dieser Zellen ist identisch mit dem der PMMA-Zellen [Abb. 16], wobei Oberteil, Unterteil und Filterunterstützung aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) bestehen. Dieses ist opak und weicher als PMMA. Beim Zusammenbau muss daher besonders darauf geachtet werden, dass keine Luft in der Mischkammer eingeschlossen wird, ggf. muss die Zelle vor der Messung länger mit Puffer gespült werden, um die Blasen auszuspülen. Die Gewinde sind besonders vorsichtig zu behandeln, da sich das Material leicht abreiben lässt und die Gewinde leicht ausfransen, was sie undicht werden lässt. Die Herstellungskosten liegen wesentlich über denen des PMMA-Modells. Vorteil der PVDF-Zellen ist, dass sie chemisch inerte sind und mit ihnen auch Substanzen vermessen werden können, die an PMMA adsorbieren.

Eine weitere Möglichkeit um chemisch inerte Zellen zu erhalten, wäre die Verwendung von Edelstahl für Ober- und Unterteil. Die meisten Substanzen zeigen an dieses Material eine schwächere Adsorption als an viele Kunststoffe. Die Filterunterstützung müsste in diesem Fall aus PTFE gefertigt werden, da eine Stahlscheibe bei der Lochbohrung Spannung aufbaut, wodurch es zu Verformung und/oder zum Bruch der Scheibe kommen kann. Aufgrund der höheren Kosten und der aufwändigen Bearbeitung von Stahl wurde auf den Bau einer solchen Zelle verzichtet, zumal sich die in Kapiteln 4.3, 4.4 und 4.5 aufgetreten Probleme meist auch mit Hilfe der PVDF-Zellen lösen ließen. Für künftige Probleme dieser Art könnte eine solche Zelle allerdings durchaus nützlich sein.

### **2.1.3.3. Zellen für Messungen bei höheren Drücken**

Die Zelle wurde im Rahmen dieser Arbeit für Messungen mit Mizellenhaltigem Puffer [vgl. 3.1.5] entwickelt, da dieser zu einem starken Anstieg des Anlagendrucks während der Messung führt. Bei der Verwendung anderer Puffer ist die Verwendung der normalen PMMA sinnvoller, da durch den zweiten Dichtungsring bei den Zellen für Messungen bei höheren Drücken ein blasenfreier Zusammenbau schwieriger ist.



Der Aufbau der Zellen für Messungen bei höheren Drücken gleicht dem der bisher beschriebenen Zellen. Sie bestehen ebenfalls aus PMMA mit dem Unterschied, dass im Unterteil eine zusätzliche Rille eingedreht wurde, um einen zweiten Dichtungsring in die Zelle einsetzen zu können ohne das Volumen Mischkammer zu verändern. Dieser zweite Ring ist notwendig, um die Zelle bei dem unter 4.5.4 beschriebenen Druckanstieg abzudichten. Fehlt dieser, wird ein Teil des Zellvolumens seitlich aus der Zelle gedrückt, wodurch eine sinnvolle Messung nicht mehr möglich ist. Werden in die unter 2.1.3.1 und 2.1.3.2 beschriebenen Messzellen ein zweiter Ring unter die Filterunterstützung gelegt, halten diese dem Druck ebenfalls stand, jedoch werden so bei der Messung Spülkurven erhalten, die einen unregelmäßigen Kurvenverlauf aufweisen. Dies könnte darin begründet sein, dass bei dieser Vorgehensweise eine schlecht durchmischte Totzone entsteht, in der sich Protein und/oder Arzneistoff unkontrolliert ablagern können. Die Verläufe der daraus resultierenden Spülkurven sind nicht einheitlich und weisen an einer oder mehreren Stellen kurze Plateauphasen auf, wodurch der Anstieg der Absorption stufig erscheint. Da bei der Auswertung aus dem Kurvenverlauf Anzahl und Belegung der Bindungsstellen berechnet werden, sind die so erhaltenen Kurven für die Auswertung nicht verwendbar.

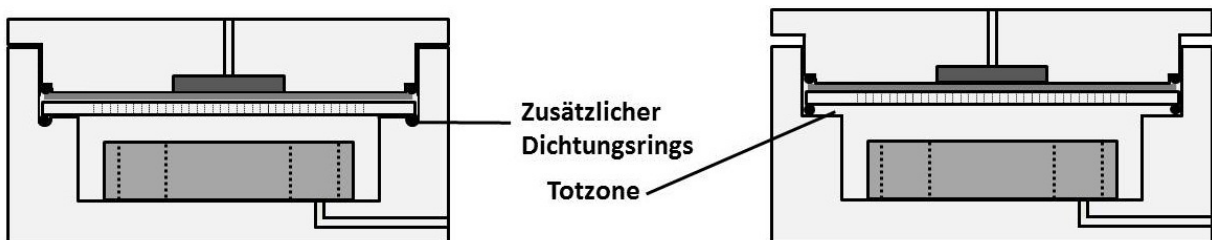


Abb. 18: Modifizierte Zelle für Messungen bei höherem Druck (links); schlecht durchmischte Totzone bei der Verwendung der PMMA-Zellen

### 2.1.3.4. Alternative Membranmaterialien

Für die meisten Messungen sind Membrane aus regenerierter Cellulose am besten geeignet. Allerdings zeigen einige Substanzen eine starke Adsorption an dieses Material, weshalb im Einzelfall die Membranmaterialien zurückgegriffen werden muss.

## Polycarbonat

An Polycarbonat-Membranen zeigten Substanzen wie GHQ168 [siehe 4.5.4], die eine hohe Bindung zu regenerierter Cellulose hatten, eine geringere Adsorption. Da zurzeit Membranen mit Porengrößen, die eine Retention von Albumin ermöglichen, nicht mehr im Vertrieb sind, konnte nicht überprüft werden, ob sich diese für die Bestimmung der Proteinbindung eignen. Sollten sie zukünftig wieder erhältlich sein, könnten sie eine wertvolle Alternative zur regenerierten Cellulose darstellen.

## Polyethersulfon

Viele Substanzen zeigen eine stärkere Adsorption an Polyethersulfon (PES) als an regenerierte Cellulose [95], dennoch war die Bindung der Substanz GHEK15 an die PES-Membran deutlich geringer als an Filter aus regenerierter Cellulose. Die Adsorption an Polyethersulfon-Membrane ist folglich nicht zwangsläufig höher. Des Weiteren ist PES weniger porös und hat dadurch eine geringere Oberfläche. Durch Inkubation mit Wirkstofflösung kann die Membran vor der Messung abgesättigt werden, um auswertbare Spülkurven zu erhalten [vgl. 4.5.4]. Allerdings ist dieses Vorgehen substanzkonsumierend.

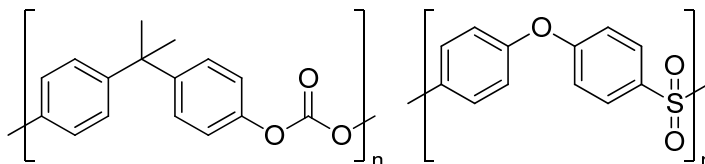


Abb. 19: Strukturen von Polycarbonat (links) und Polyethersulfon (rechts)

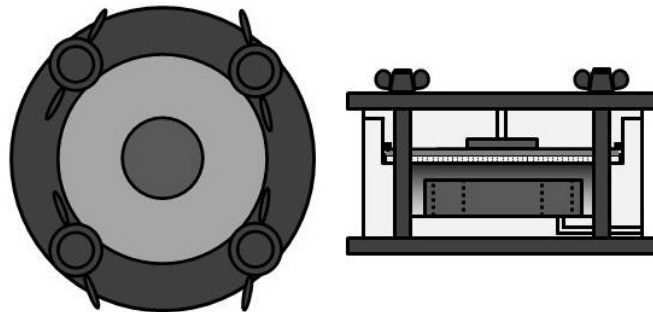
### 2.1.3.5. Dichtigkeitstest der Messzelle

Ein erhöhter Proteindurchgang während der Messung kann mehrere Ursachen haben. Die Ultrafiltrationsmembran kann beschädigt oder zu lange in Gebrauch sein oder die Messzelle ist undicht. Dies ist der Fall, wenn sie falsch zusammengesetzt wurde, der Dichtungsring porös ist oder die Zelle dem Druck während der Messung nicht stand hält [vgl. 2.1.3.3 und 4.5.4]. Da ein unnötiger Austausch der Membran teuer ist und sich die Suche nach der Ursache zeitaufwändig gestalten kann, wurde in Rahmen

dieser Arbeit der folgende schnelle und einfach durchzuführende Dichtigkeitstest für diese Zellen entwickelt.

Tritt nach der Injektion ein erhöhter Proteindurchgang auf, wird eine weitere Proteinprobe (ca. 40 mg/ml) in einer 0.1%igen Brilliantblau-G-Lösung gelöst und über das Injektionsventil in die Messzelle injiziert. Der Farbstoff bindet sehr stark an Albumin und hat eine sehr intensive blaue Farbe, die auch in den opaken Teflonschläuchen der Anlage gut zu erkennen ist [100]. Anhand der Passage der Farbe durch die Messzelle kann die Ursache der Undichtigkeit wie folgt bestimmt werden:

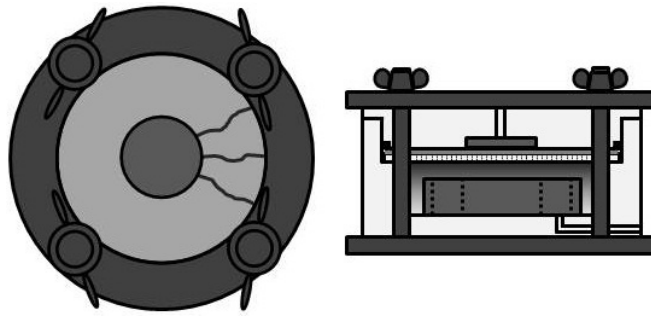
Fall 1: Ein Teil der Farbe passiert rasch die Zelle, während ein Großteil unterhalb der Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten wird. In der Aufsicht der Zelle wirkt die Membran gleichmäßig bläulich [Abb. 20].



**Abb. 20: Das Protein wird teilweise zurückgehalten (links), der Proteindurchgang ist erhöht, ohne dass ein undichte Stelle direkt zu erkennen ist (rechts).**

In diesem Fall ist die Membran die Ursache. Durch Beschädigung oder Alterung ist die Durchlassgrenze erhöht. Zunächst wird der ungebundene Farbstoffanteil rasch abfiltriert, während der an das Protein gebundene Anteil nur langsam zusammen mit dem Protein die Membran passieren kann und sich deshalb zunächst an dieser anreichert. Das Problem kann durch den Austausch der Ultrafiltrationsmembran behoben werden.

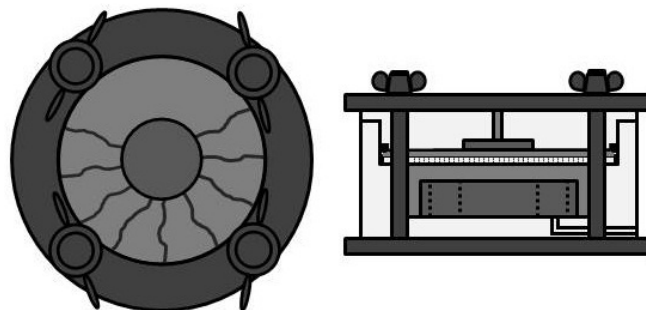
Fall 2: Ein Teil der Farbe passiert rasch die Zelle, während ein Großteil unterhalb der Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten wird. In der Aufsicht der Zelle sind blaue Schlieren vom Zellenrand zur Fritte im Oberteil zu erkennen [Abb. 21].



**Abb. 21:** Das Protein wird teilweise zurückgehalten (links), der Proteindurchgang ist erhöht, das am Filter vorbeifließende Protein ist in der Aufsicht deutlich zu erkennen (rechts).

In diesem Fall ist die Zelle undicht. Die gefärbte Proteinlösung wird hierbei an der Ultrafiltrationsmembran vorbei durch die Zelle gedrückt, wodurch die blauen Schlieren entstehen. Auch hier kann der ungebundene Farbstoff zunächst schneller durch die Messzelle eluieren, da er sowohl die Membran als auch die undichte Stelle passieren kann. Hierfür ist meist ein defekter Dichtungsring verantwortlich. Sollte das Problem trotz neuer Dichtung weiter bestehen, kann die Zelle beschädigt sein und muss ausgetauscht werden.

Fall 3: Die Farbe passiert rasch und gleichmäßig die Zelle ohne dass ein Teil zurückgehalten wird [Abb. 22].



**Abb. 22:** Das Protein wird nicht zurückgehalten (links), der Proteindurchgang ist erhöht. Das Protein fließt über weite Teile der an der Membran vorbei (rechts).

In diesem Fall ist die Zelle falsch zusammengebaut. Wird die Zellenhalterung nicht fest genug angezogen und/oder ist das Oberteil schräg aufgesetzt, kann ähnlich wie im Fall 2 die Proteinlösung ungehindert an der Membran vorbei durch die Zelle fließen. Das Problem lässt sich durch erneuten, korrekten Zusammenbau der Zelle beheben.

#### **2.1.4. Zubehör und Kleinteile**

Die folgende Aufstellung gibt Verbrauchsmaterialien und ihre Bezugsquellen an, die für den Betrieb der Anlage nötig sind.

Firma Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen, Deutschland):

- Finger-tight PEEK fittings, 1/16" (10/pk) Art.-Nr. 5063-6591

Diese werden zur Verbindung von der Messzelle mit den Teflonkapillaren verwendet. Auf die Verwendung von Metallfittings sollte verzichtet werden, da diese die Gewinde (besonders der PVDF-Zellen) stark abnutzen und beschädigen.

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

- Edelstahlfritten 2 µm Art.-Nr. 8020-8020

Firma Schwarz GmbH (Würzburg, Deutschland):

- O-Ring 41x3 – 70/NBR Art.-Nr. OR0300X04100

## 2.2. Steuergeräte der Messanlage

### 2.2.1. Steuerung der Geräte

Die Steuerung beider Anlagen erfolgt jeweils über einen Rechner mit Windows-XP als Betriebssystem. Der PC ist über eine RS232-Schnittstelle mit der Pumpe und dem  $W_S$ A-Controller verbunden. Über diesen wird zum einen ein Steuergerät kontrolliert, dass das 6-Wege-Ventil schaltet und zum anderen die Signale des Detektors gesammelt und an den Rechner weitergegeben.

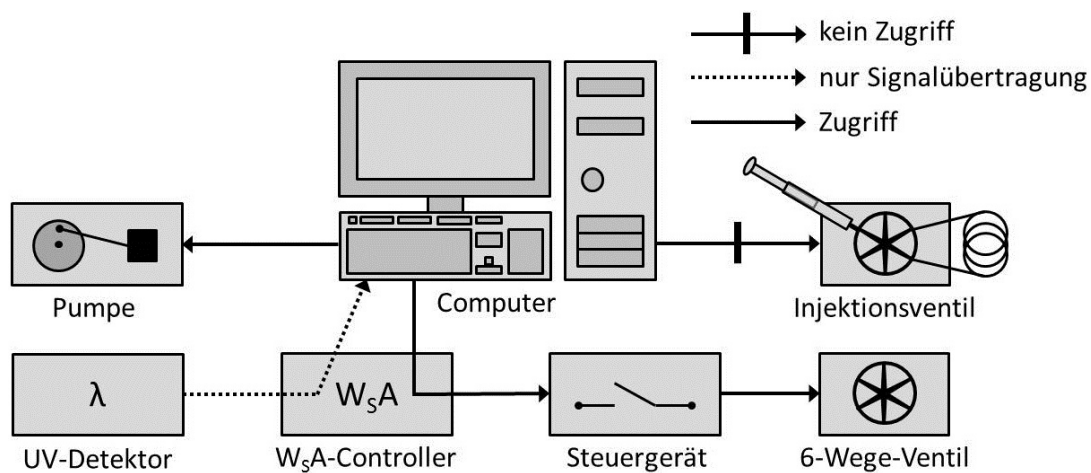


Abb. 23: Steuerung der Anlage

Dadurch ergibt sich jeweils eine unterschiedliche Bedienung der einzelnen Bauteile. Über den Rechner kann die Pumpe an- und ausgeschaltet und ihre Flussrate verändert werden. Dies kann auch manuell an der Bedienungskonsole der Pumpe erfolgen. Alle weiteren Funktionen, wie die Einstellung des maximalen Drucks müssen über die Bedienungskonsole gesteuert werden. Das 6-Wege-Ventil kann vollautomatisch über die Software oder manuell über den  $W_S$ A-Controller geschaltet werden. Der UV-Detektor kann nur über seine Bedienungskonsole eingestellt werden, die von ihm ausgehenden Signale werden nur aufgezeichnet. Das Injektionsventil kann nur manuell bedient werden, ebenso der Magnetrührer.

## 2.2.2. Aufbau und Funktion der Messsoftware

Die Anlagen werden mittels der Software „W<sub>S</sub>A-Protein“ bedient, die von Dr. B. Reyer programmiert wurde. Das folgende Kapitel erklärt die wichtigsten Funktionen, die für die Durchführung einer Messung und die Wartung der Anlagen benötigt werden.

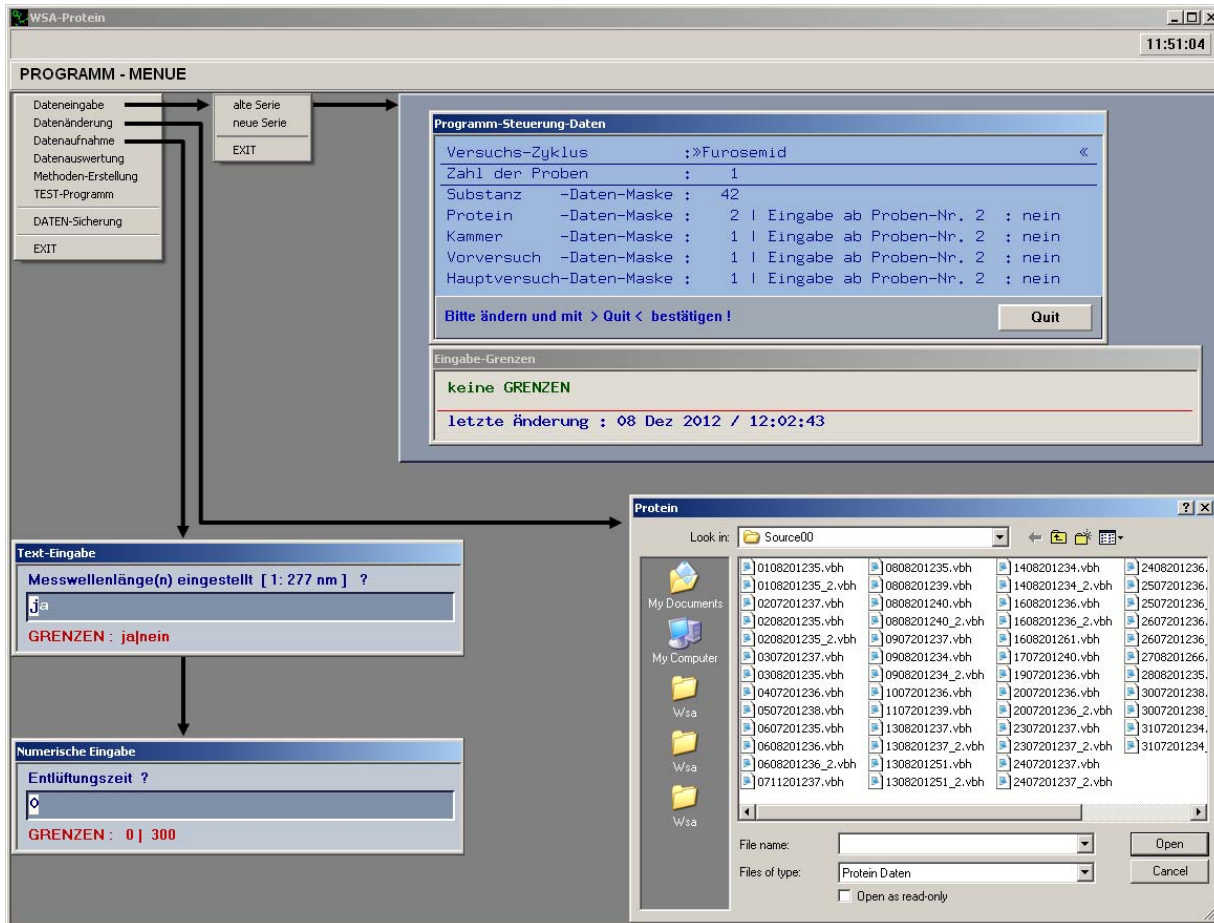
Beim Start der Software erscheint zunächst das Programmmenü mit den folgenden Punkten:

- Dateneingabe
- Datenänderung
- Datenaufnahme
- Methoden-Erstellung
- Testprogramm

Die Funktion Dateneingabe legt eine neue Speicherdatei für die aktuelle Messung an und öffnet zunächst das Fenster „Programm-Steuerung-Daten“, in dem Substanz, Protein, Messzelle, Vorversuch und Hauptversuch ausgewählt werden. Nach deren Auswahl werden die Datenmasken dieser fünf Parameter nacheinander geöffnet und die Angaben, die zuvor in der Methoden-Erstellung eingegeben wurden, können nochmals kontrolliert und korrigiert werden [Abb. 24].

Bei der Datenänderung wird zunächst eine bestehende Messung geöffnet, wonach anschließend, wie bei Dateneingabe, die Datenmasken der einzelnen Parameter aufgerufen und nachbearbeitet werden können. Wurde z.B. bei der Methodenerstellung versehentlich eine falsche Proteineinwaage eingegeben, kann diese hier korrigiert werden [Abb. 24].

Der Punkt „Datenaufnahme“ fragt zunächst ab, ob die korrekte Wellenlänge am Detektor eingestellt ist und wie lange die Entlüftungszeit vor Versuchsbeginn sein soll. Die Frage nach der Wellenlänge dient als Erinnerung, deren Einstellung zu kontrollieren. Das Programm gibt an dieser Stelle zwar die in der Datenmaske der Substanz hinterlegte Messwellenlänge an, aber die Einstellung am Detektor kann nur manuell an dessen Bedienungskonsole erfolgen [vgl. 2.2.1]. Da der Versuch erst gestartet wird, wenn die Anlage frei von Blasen ist, wird die zweite Frage stets mit „0“ beantwortet und der Versuch startet nach Bestätigung dieser Eingabe automatisch, indem das Fenster „ProteinRUN“ geöffnet und mit der Datenaufzeichnung begonnen wird [Abb. 24].



**Abb. 24: Aufbau der Menüfunktionen "Dateneingabe", "Datenänderung" und "Datenaufnahme"**

Wird der Punkt „Methoden-Erstellung“ aufgerufen, öffnet sich ein weiteres Menü [Abb. 25]. Hier können die Datenmasken der einzelnen Parameter erstellt werden.

Mit der Auswahl „Substanz“ und „Ändern“, lassen sich die Masken der einzelnen Substanzen aufrufen. Anschließend werden die Angaben zur Substanz wie Name, Molmasse, Summenformel und Einwaage eingegeben. Das Programm kann bis zu 102 dieser Masken anlegen und speichert diese unter der entsprechenden Nummer. Analog kann die Protein-, Kammer- und Vorversuchsmaske bearbeitet werden.

In der Hauptversuchsmaske können die Zeiten für die einzelnen Versuchsschritte eingegeben werden. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit fährt das Programm selbstständig mit dem nächsten Schritt fort. Eine Ausnahme ist die Protein-Injektion, vor der das Programm angehalten wird und erst nach Bestätigung der Injektion fortgesetzt. Jeder Schritt darf maximal 120 Minuten dauern, eine längerer Zeitraum, wird vom Programm nicht akzeptiert. Während der Messung kann ein Schritt jederzeit manuell durch Klicken auf den „STOP“-Button im Fenster „ProteinRUN“ beendet werden, wonach das Programm mit dem nächsten Schritt fortfährt. Eine Verlängerung der Schrittdauer



während des Laufs ist nicht möglich. Wird eine Substanz zum ersten Mal vermessen, ist es daher sinnvoll zunächst alle Schritte auf die maximale Länge von 120 min zu setzen. Für die darauffolgenden Messungen können die Zeiten, die für die einzelnen Schritte effektiv nötig waren, dann entsprechend programmiert werden.

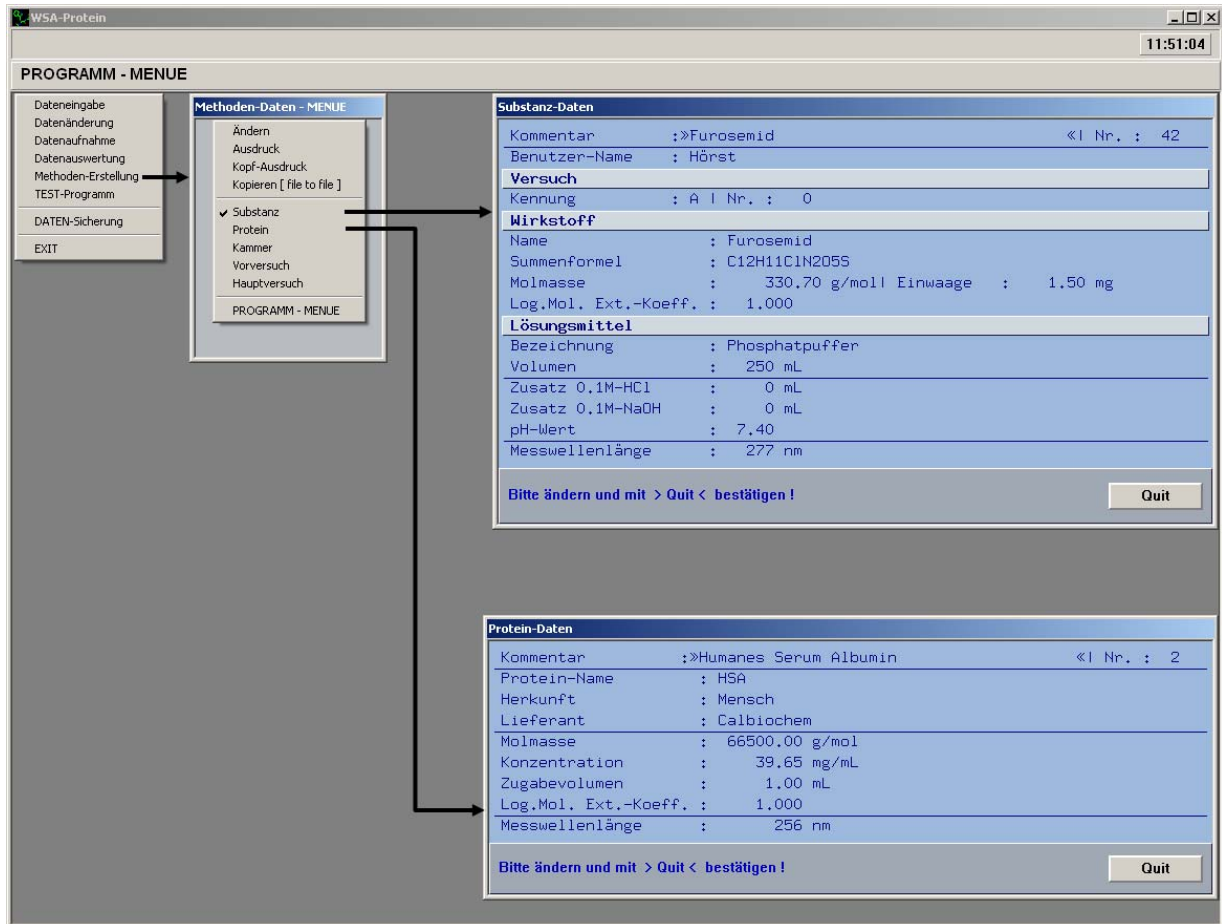


Abb. 25: Aufbau und Funktion der "Methoden-Erstellung" am Beispiel der Substanz- und Protein-Datenmaske

Mit Hilfe des Test-Programms können die Pumpe und das 6-Wege-Ventil direkt bedient werden. Dies ist vor allem beim vor jedem Versuch durchzuführenden Spülen der Anlage nützlich [Abb. 26].

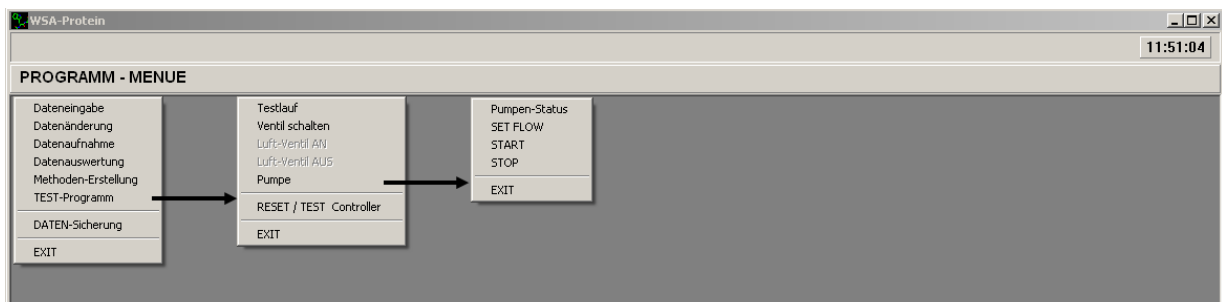


Abb. 26: Aufbau des "Test-Programms"



## **3. Versuchsdurchführung**

### 3.1. Verwendete Substanzen und Geräte

#### 3.1.1. Wirkstoffe

Für die in Kapitel 4 beschriebenen Experimente wurden die folgenden Arzneistoffe verwendet:

<b>Wirkstoff</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acetylcystein	Berlin Chemie AG, Berlin, Deutschland
Ambroxol-HCl	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Carbamazepin	Wörwag Pharma GmbH & Co.KG, Böblingen, Deutschland
Diclofenac-Na	Dr. Kade Pharmazeutische Fabrik GmbH, Berlin, Deutschland
Diphenhydramin-HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dipyridamol	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland
(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Ephedrin-HCl	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )-Ephedrin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<i>rac</i> Ephedrin-HCl	Knoll AG, Minden, Deutschland
Etacrynsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Furosemid	Winthrop Arzneimittel, Frankfurt am Main, Deutschland
Ibuprofen	Berlin Chemie AG, Berlin, Deutschland
Imipramin-HCl	Alfred E. Tiefenbacher GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Nefopam-HCl	Krewel Meuselbach GmbH, Eitorf, Deutschland
Nifedipin	Rentschler Biotechnologie GmbH, Laupheim, Deutschland
Phenprocoumon	Wörwag Pharma GmbH & Co.KG, Böblingen, Deutschland
Piroxicam	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )-Pseudoephedrin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-Pseudoephedrin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Salicylsäure	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Tryptophan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Warfarin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Darüber hinaus wurden die nachfolgenden von Mitarbeitern der Arbeitskreise Holzgrabe und Bringmann synthetisierten Substanzen vermessen:

<b>Substanzgruppe</b>	<b>synthetisiert von</b>	<b>zuerst synthetisiert von</b>
Bisnaphthalimide	<i>Tischer</i>	<i>Tischer, Bender</i> [101, 102]
Naphthylisochinoline	<i>Albers</i>	<i>Gulder</i> [103]
Fluorchinolone	<i>Hiltensperger</i>	<i>Hiltensperger, Niedermeier</i> [104, 105]

### 3.1.2. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden für die Versuchsdurchführung verwendet:

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acetylcysteamin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Cysteamin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Cystein	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ellman-Reagenz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nicotinsäurenitril	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Thiosalicylsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Polysorbat 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

### 3.1.3. Proteine und Ultrafiltrationsmembrane

Für die Herstellung der Proteinlösungen wurden die folgenden Albumine der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) verwendet:

Albumin from human serum lyophilized powder, ≥96%	Art.Nr. A1653
Albumin from bovine serum ≥98%, lyophilized powder	Art.Nr. A7906

Die Ultrafiltrationsmembrane wurden von Merck Millipore (Billerica, MA, USA) bezogen:

Ultrafiltration Discs, PLGC, Ultracel regenerated cellulose, 10 kDa NMWL, 47 mm  
Art.Nr. PLGC04710

Ultrafiltration Discs, PLTK, Ultracel regenerated cellulose, 30 kDa NMWL, 47 mm  
Art.Nr. PLGCTK04710

Ultrafiltration Discs, PBTK, Biomax polyethersulfone, 30 kDa NMWL, 44.5 mm  
Art.Nr. PBTK04310 (außer Handel)

### 3.1.4. Pufferlösung

Für die Herstellung aller benötigten Lösungen wurde der bereits von *Heinze* und *Albert* beschriebene Phosphatpuffer, mit folgender Zusammensetzung, verwendet:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	100.0 mM	$\triangleq$	3.210 g/l
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	22.6 mM	$\triangleq$	0.800 g/l
Natriumchlorid	5.1 mM	$\triangleq$	5.488 g/l

Die Salze werden eingewogen und in ca. 800 ml Milipore®-Wasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert der Lösung bestimmt und ggf. mit 1 M Natronlauge oder 1 M Phosphorsäure auf pH 7.4 eingestellt. Die Lösung wird in einen 1l-Messkolben überführt, mit Milipore®-Wasser zu 1 l ergänzt und für 30 min mit Ultraschall entgast.

Der so erhaltene Puffer entspricht in seiner Tonizität und seinem pH-Werte dem des Blutes. Er sollte nicht länger 2-3 Tage verwendet werden, da ansonsten Ausflockungen durch mikrobiellen Befall auftreten, die zu Verstopfungen der Anlage führen können.

Da die Lösungsgeschwindigkeit der Phosphatsalze sehr langsam ist, wurde meist ein 10-fach konzentriertes Pufferkonzentrat vorbereitet, um die Herstellung zu beschleunigen und zu vereinfachen. Es ist aufgrund seiner hohen Tonizität mikrobiell kaum anfällig und zeigt über mehrere Wochen weder Ausflockungen noch pH-Wertveränderungen. Bei der Pufferherstellung wurden zunächst 100 ml dieses Konzentrates zu ca. 800 ml mit Milipore®-Wasser verdünnt. Anschließend wurde weiter verfahren, wie oben beschrieben.

### 3.1.5. Pufferlösungen für schlecht wasserlösliche Stoffe

Für die Herstellung von Wirkstofflösungen schlecht wasserlöslicher Stoffe können dem Phosphatpuffer als Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Polysorbat 20 zugesetzt werden.

DMSO kann bis zu einer Konzentration von 10 % (V/V) zugesetzt werden [96]. Die Lösung beginnt sich nach einigen Stunden zu zersetzen, was durch einen stechenden Geruch zu erkennen ist. Deshalb sollte der Puffer stets frisch hergestellt und Reste verworfen werden.

Polysorbat 20 kann in Konzentrationen von 0.1-1 mM zugegeben werden. Konzentrationen über 1 mM können nicht verwendet werden, da der Druck, aufgrund der Bildung komplexerer Mizellsysteme als Kugelmizellen, während der Messung in der Zelle stark ansteigt [vgl. 4.5.4]. Bei Konzentrationen unter 0.1 mM trägt Polysorbat 20 nicht mehr zu Verbesserung der Löslichkeit eines Stoffes bei, da hier seine CMC unterschritten ist und keine Mizellen mehr gebildet werden [106]. Welche Polysorbat-20-Konzentration für die Lösung einer Substanz am besten geeignet ist, muss im Einzelfall experimentell bestimmt werden.

Da Polysorbat 20 eine hoch-viskose Flüssigkeit ist, die sich schlecht abwiegen lässt, ist es sinnvoll eine weniger viskose Lösung in Puffer herzustellen, die dann volumendosiert zugegeben werden kann. Bei der Herstellung dieser Lösung ist zu starkes Rühren oder Schütteln zu vermeiden, da dies zu Bildung stabilen Schaumes führt, was das Pipettieren erschwert.

Bei der Messung von Substanzen, die schlecht in der Pufferlösung löslich sind, sollte aufgrund der leichteren Handhabung zunächst versucht werden, mit Hilfe von DMSO eine klare Lösung zu erhalten. Erst wenn dies nicht zum Erfolg führt, sollte auf die aufwendigere Polysorbat-20-Variante zurückgegriffen werden.

### 3.1.6. Wirkstofflösung

Die Wirkstoffe werden in den unter 3.1.4 und 3.1.5 beschriebenen Puffern gelöst; hierbei sollte die Absorption in der Plateauphase idealer Weise im linearen Bereich des Lambert-Beer'schen-Gesetzes von 0.2-0.8 AU liegen. Das Verhältnis von Protein und Wirkstoff sollte idealerweise 0.4-0.8 betragen. Die Arbeit von *Oehlmann* zeigt al-

lerdings, dass eine Abweichung von diesen Parametern keinen Einfluss auf das Messergebnis hat und es somit möglich auch mit anderen Verhältnissen reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten [98, 107].

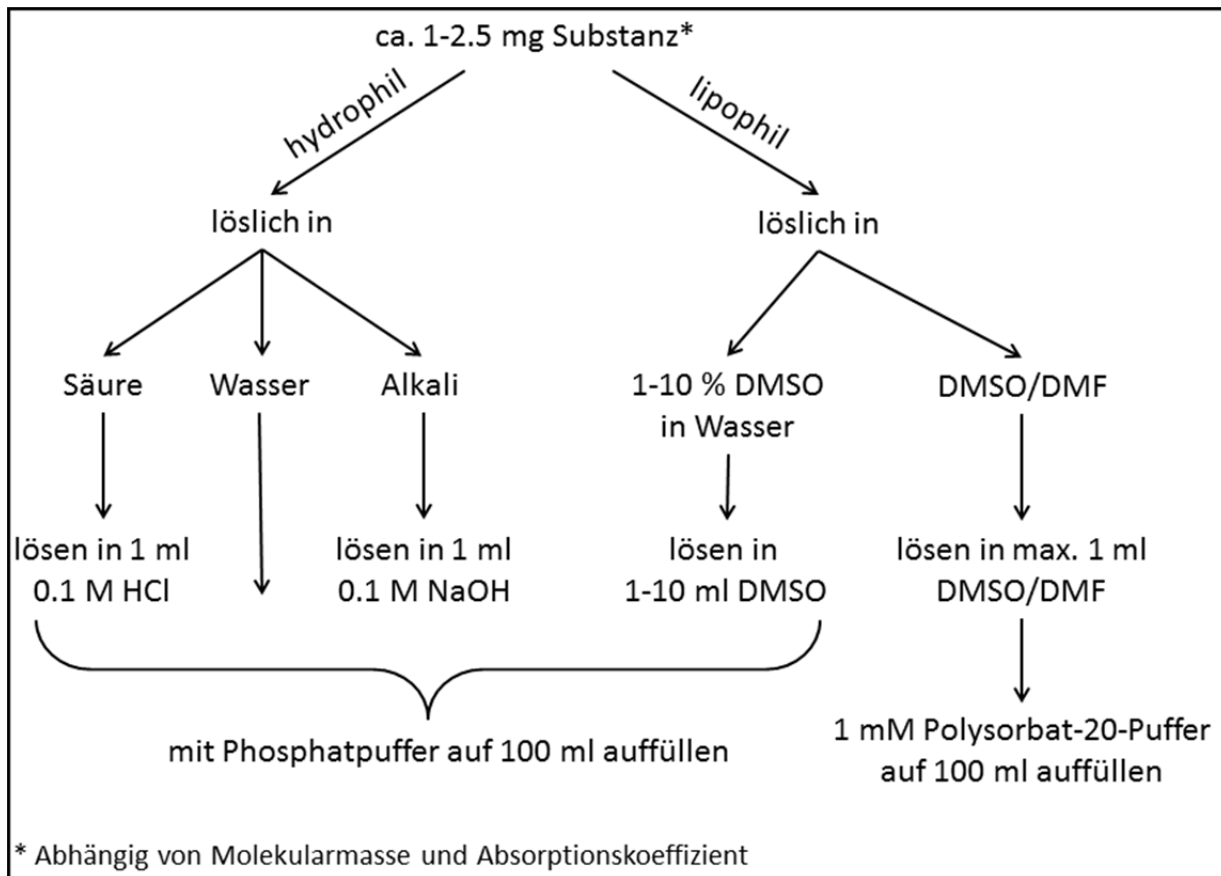


Abb. 27: Entscheidungsbaum für die Herstellung der Wirkstofflösung

Lösen sich Substanzen schlecht in den Puffermedien, können sie je nach ihren Säure-Base-Eigenschaften mit 0.1 M Salzsäure oder 0.1 M Natronlauge angelöst werden. Lipophile Neutralstoffe werden bei der Verwendung der DMSO-haltigen Puffer am besten in der gesamten DMSO-Menge gelöst und anschließend mit reinem Puffer auf das erforderliche Endvolumen aufgefüllt.

Bei der Verwendung des Polysorbat-20-haltigen Puffers werden von diesem ca. 90 % vorgelegt. Die Substanz wird in maximal 1 ml DMSO oder DMF gelöst und in den vorgelegten Puffer pipettiert. Anschließend wird mit Polysorbat-20-haltigem Puffer auf das erforderliche Endvolumen aufgefüllt [Abb. 27].

Die Wirkstofflösung wird vor der Verwendung 30 min im Ultraschallbad entgast.



### 3.1.7. Proteinlösung

Um Bedingungen zu schaffen, die denen im menschlichen Körper möglichst ähnlich sind, lag die Konzentration des Albumins in der Wirkstofflösung stets zwischen 38 und 42 mg/ml, was der physiologischen Konzentration im Blut entspricht. Das Protein wird in dem für die Wirkstofflösung verwendeten Puffer gelöst. Um die hierbei leicht auftretende Schaumbildung zu vermeiden sollte, der Messkolben nur leicht geschwenkt und/oder kurz in ein Ultraschallbad getaucht werden. Anschließend wird das Protein vorsichtig in eine 2-ml-Spritze aufgezogen, wobei Schaumbildung ebenfalls zu vermeiden ist, da auf diese Weise Luftblasen in die Anlage gelangen und das Messergebnis stören können.

### 3.1.8. Wasser

Für die Herstellung aller für die Bestimmung notwendiger Lösungen wurde Millipore®-Wasser verwendet, das mit einer Milli-Q-Synthese-Anlage (Billerica, MA, USA), hergestellt wurde.

### 3.1.9. Geräte

Für die Aufnahme der UV-Spektren der zu vermessenden Substanzen und für die Herstellung der benötigten Lösungen wurden die folgenden Geräte verwendet:

UV/Vis-Spektrophotometer:

Varian Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland

Shimadzu UVmini-1240 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland

Waagen:

Sartorius CPA225D-0CE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Kern 770, KERN & SOHN GmbH, 72336 Balingen, Deutschland

Mettler Toledo AB104-S/PH, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland

pH-Meter:

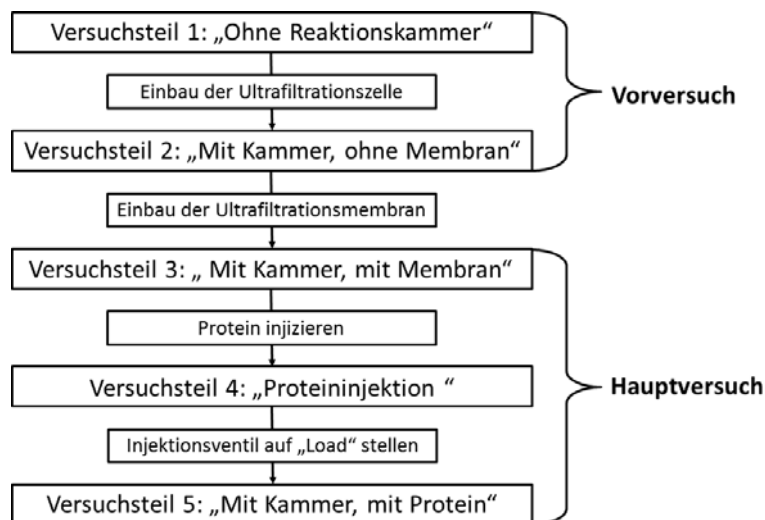
PHM220 Lab pH-Meter Radiometer Analytical SAS, Lyon, Frankreich

Ultraschallbad:

Bandelin Sonorex Model RK 156, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin Deutschland

### 3.2. Versuchsablauf

Eine Messung besteht aus fünf Versuchsschritten [Abb. 28]. Bei jedem dieser Teile, mit Ausnahme des vierten Teils „Proteininjektion“, wird die Anlage zunächst mit Wirkstofflösung beladen bis ein konstantes Absorptionsplateau erreicht ist. Anschließend wird solange mit Pufferlösung gespült, bis die Absorption wieder bei null ist. Auf diese Weise werden jeweils zwei Spülkurven pro Versuchsteil erhalten. In Falle der „Proteininjektion“ wird nur mit Puffer gespült und folglich nur eine Kurve aufgezeichnet.



**Abb. 28: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs**

### 3.2.1. Vorversuch

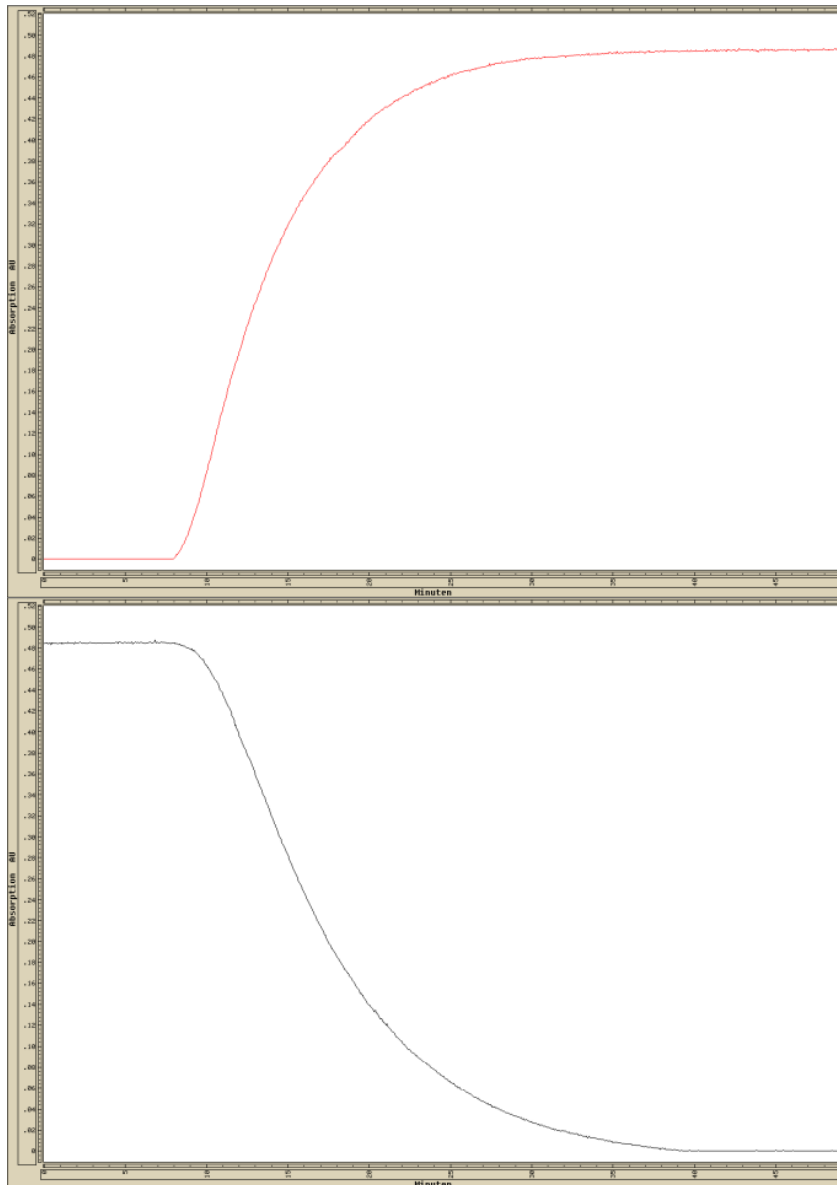
Im Vorversuch werden die Kurven für das Einspülen der Wirkstofflösung und das anschließende Ausspülen des Wirkstoffes mit Puffer, ohne eingebaute Messzelle aufgenommen (Versuchsteil 1). Anschließend werden die gleichen Kurven mit eingebauter Messzelle aber ohne eingelegte Membran aufgezeichnet (Versuchsteil 2). Diese Daten werden für die Bestimmung der Proteinbindung nicht benötigt. Der Vorversuch dient zur Wartung der Anlage und als Test, ob die Konzentration der Wirkstofflösung für die Messung geeignet ist. So ist es möglich, die Anlage auf Undichtigkeiten und korrektes Fördervolumen der Pumpe zu prüfen, Adsorption der Wirkstoffe an die Filtermembran festzustellen und die Höhe der Absorption in der Plateauphase zu bestimmen. Da Dichtigkeit und Fördervolumen - wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben - mit Hilfe der Vorrats- und Abfallgefäße berechnet werden können und die Höhe der Absorption im Plateau mit Hilfe eines UV/Vis-Spektrophotometers schneller ermittelt werden kann, kann im Routinebetrieb auf den Vorversuch meistens verzichtet werden.

### 3.2.2. Hauptversuch

Alle Schritte des Hauptversuches werden für die spätere Berechnung der Proteinbindung benötigt. Im Versuchsteil 3 wird zunächst die Messzelle wie folgt zusammengesetzt. Das Unterteil wird mit der Anlage verbunden und mit Puffer gefüllt. Rührscheibe und Filterunterstützung werden vorsichtig in die Mischkammer gesetzt, die Membran wird aufgelegt und vorsichtig mit dem Dichtungsring nach unten gedrückt. Anschließend wird das Oberteil aufgesetzt und mit der Anlage verbunden. Die Messzelle wird in die Halterung eingespannt und die Anlage spült für ca. 30 min mit Puffer [vgl. Abb. 16].

Ist die Absorption am Detektor konstant, wird an diesem die Taste „Zero“ gedrückt, das Injektionsventil auf „Load“ gestellt und die Kurven werden analog zum Vorversuch aufgenommen. Zunächst werden die Wirkstoffkurve und die Spülkurve ohne Protein erhalten [Abb. 29]. Die Erste weist im Idealfall nach spätestens 60 min eine konstante Absorption auf. Die Zweite sollte innerhalb von 60 min wieder auf null abgefallen sein.

Andernfalls liegt eine Adsorption der Substanz an die Bauteile der Anlage vor, die je nach ihrer Stärke die Messung stören kann.



**Abb. 29: Wirkstoffkurve (oben) und Spülkurve (unten) aus Versuchsteil 3**

Wenn die Absorption Null erreicht hat, kann mit Versuchsteil 3 begonnen werden. Die Proteinlösung wird wie in Kapitel 3.1.7 hergestellt, in das Injektionsventil injiziert und das Ventil wird auf „Inject“ gestellt. Nach Bestätigung der Injektion im Messprogramm wird das Protein in die Mischkammer der Messzelle gespült. Während dieses Vorgangs wird die Proteinspülkurve aufgezeichnet. Diese kommt dadurch zustande, dass Proteinbruchstücke, die kleiner als die Ausschlussgrenze der Membran sind, passieren können und dadurch ein Detektorsignal erzeugen. Die resultierende Kurve sollte möglichst flach und kurz sein [Abb. 30]. Ist dies nicht der Fall, ist die Membran beschädigt oder die Messzelle wurde nicht korrekt zusammengesetzt. Ist das Detektor-

signal wieder bei null, wird das Injektionsventil wieder auf „Load“ gestellt. Dies ist sehr wichtig, da sonst die Dosierschleife im weiteren Versuch eine längere Totzeit als im Versuchsteil 3 verursacht, wodurch die Messung nicht auswertbar ist. Im Anschluss wird die Proteininjektion im Programm beendet.

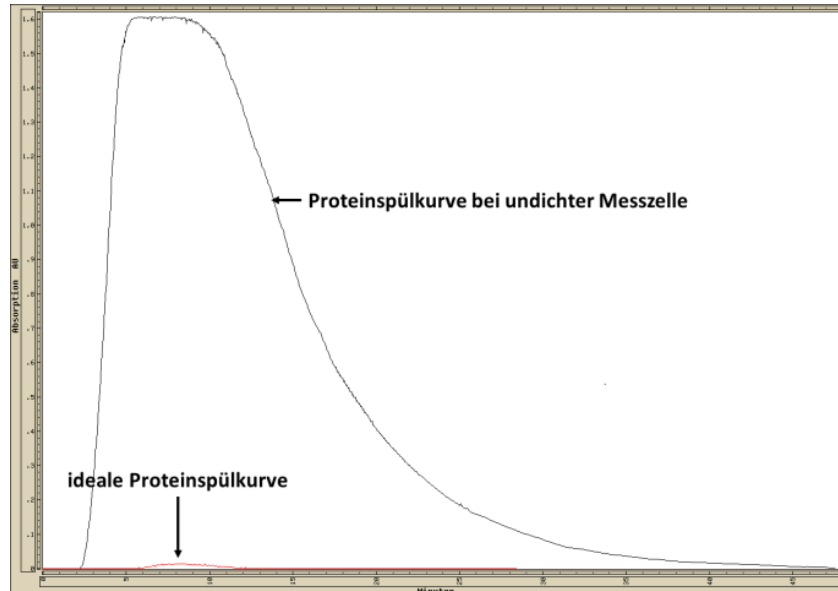


Abb. 30: Beispiele für Proteinspülkurven

Der folgende Versuchsteil ist im Ablauf mit Teil 3 identisch. Die Messzelle wird wieder mit Wirkstofflösung beladen. Durch das sich in der Mischkammer befindende Protein wird das Erreichen des Absorptionsplateaus hierbei verzögert. Werden die Wirkstoffkurven der Versuchsteile 3 und 5 übereinander gelegt, entsteht zwischen beiden eine Fläche, deren Größe dem Ausmaß der Proteinbindung entspricht [Abb. 31].

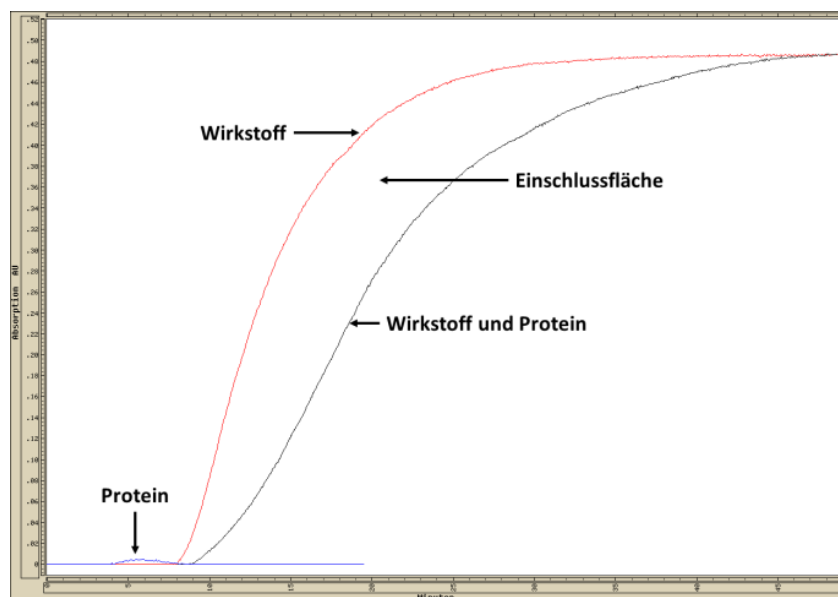


Abb. 31: Wirkstoffkurve mit und ohne Protein übereinander gelegt, die Fläche zwischen beiden Kurven gibt das Ausmaß der Proteinbindung an.

### 3.2.3. Abbau und Pflege der Anlage

Nach Versuchsende wird die Messzelle aus der Anlage ausgebaut und geöffnet. Die Membran wird vorsichtig ohne die empfindliche Unterseite zu berühren aus der Zelle genommen, unter fließendem demineralisiertem Wasser abgespült und für 10-15 min in 0.1 M Natronlauge gelegt. Anschließend wird die Membran mit demineralisiertem Wasser von Natronlauge gereinigt, in eine Petrischale mit 10 %igem Ethanol gelegt und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei sorgfältiger Reinigung und vorsichtiger Handhabung kann eine Membran drei bis vier Wochen benutzt werden, ohne dass sich der Proteindurchgang erhöht. Eine neue Membran wird vor der ersten Benutzung mit der glänzenden Seite nach unten für mindestens eine Stunde in eine Petrischale mit Millipore®-Wasser gelegt, wobei das Wasser in dieser Zeit alle 10 min abdekantiert und erneuert wird, um Verunreinigung aus der Herstellung der Membran aus dieser herauszulösen. Wenn möglich sollte die Membran anschließend über Nacht in 10 %igem Ethanol lagern.

Die restlichen Zellenbauteile werden ebenfalls unter fließendem demineralisiertem Wasser abgespült und zum Trocknen in ein fusselfreies Tuch eingeschlagen. Die Messzelle sollte nicht im Trockenschrank getrocknet werden, da sich durch die Temperaturen das Material verziehen oder spröde werden kann.

Das Injektionsventil wird nach der Messung zweimal mit 5 ml Millipore®-Wasser gespült. Je einmal in „Load“- und „Inject“-Position. Ist das Ventil verstopft, kann es mit 0.1 M Natronlauge gespült werden. Hierbei sollten die Spritze und Spritzenaufsatz gut festgehalten werden, da beim Abplatzen der Spritze die Gefahr besteht, dass die Natronlauge unkontrolliert spritzt.

Die Anlage muss, sofern am folgenden Tag wieder gemessen wird, nicht weiter gereinigt werden. Lediglich die Wirkstofflösung sollte verworfen werden, um evtl. Zersetzungen der Substanz zu vermeiden. Wird die Anlage mehrere Tage nicht benutzt, sollte sie zunächst mit Millipore®-Wasser vollständig von Puffer und Wirkstofflösung befreit und auf 80 % Methanol umgespült werden. Dies verhindert zum einen das Verkeimen der Anlage und zum anderen das Auskristallisieren der Puffersalze, wenn diese längere Zeit in den Kapillaren der Anlage verbleiben.

Ist die Anlage verkeimt oder veralg, wird sie mit 70 %igem Isopropanol für mehrere Stunden gespült und für mehrere Tage auf dieser Lösung stehen gelassen. Wird an-

schließlich weitergespült, sollten sich die Verfärbungen durch den Befall aus den Kapillaren lösen. Ist dies nicht der Fall müssen die entsprechenden Abschnitte ausgebaut und erneuert werden. Da dies aufwändig und kostenintensiv ist, sollte die oben beschriebene Reinigung der Anlage bei längerem Nichtbenutzen konsequent durchgeführt werden.

Das 6-Wege-Ventil sollte alle zwei Wochen geöffnet und von Teflonabrieb befreit werden. Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass die Vertiefung auf dem Rotor gereinigt wird. Die Teflonflocken in den Bohrungen der Lochscheibe lassen sich mit einer Kanüle lösen, festsitzende Verschmutzungen in den Bohrungen lassen sich mit Hilfe einer Druckluftpistole entfernen.

### **3.3. Auswertung der Versuche**

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe der von *Nickel* geschriebenen Programme NPBUW03 und NPBW127. Beide sind in HTBasic programmiert und können nur innerhalb der Programmierumgebung ausgeführt werden.

#### **3.3.1. Datenkonvertierung**

Da die Messsoftware  $W_S$ A-Protein in einer anderen Programmiersprache geschrieben ist, müssen die erhaltenen Messdaten von den gespeicherten Formaten \*.VBH und \*.VBD in die mit der Auswertesoftware kompatiblen Formate \*.ABD und \*.PBD umgewandelt werden. Dies erfolgt mit Hilfe des Programms NPBUW03.

#### **3.3.2. Berechnung der Titrationskurven**

Die Auswertung wird mit dem Programm NPBW127 durchgeführt. Zur Berechnung der experimentellen Titrationskurve wird der negative dekadische Logarithmus der freien Wirkstoffkonzentration gegen das molare Verhältnis von Wirkstoff zu Protein aufgetragen.

Der freie Wirkstoffanteil lässt sich mit Hilfe der Elutionskurven berechnen. Die Differenz zwischen beiden Kurven entspricht dem gebundenen Wirkstoffanteil. Mit der

Wirkstoffkonzentration der Lösung und der Flussrate können in jedem Punkt die freie und die gebundene Wirkstoffmenge berechnet werden.

Die theoretische Titrationskurve wird mittels der ermittelten Bindungskonstanten [vgl. 3.3.3] berechnet. Der freie Wirkstoffanteil wird hierzu aus den Bindungskonstanten errechnet und sein negativer dekadischer Logarithmus gegen das molare Verhältnis von Wirkstoff zu Protein aufgetragen. Für eine korrekte Bestimmung der Proteinbindung müssen beide Kurven eine hohe Übereinstimmung aufweisen [Abb. 32].

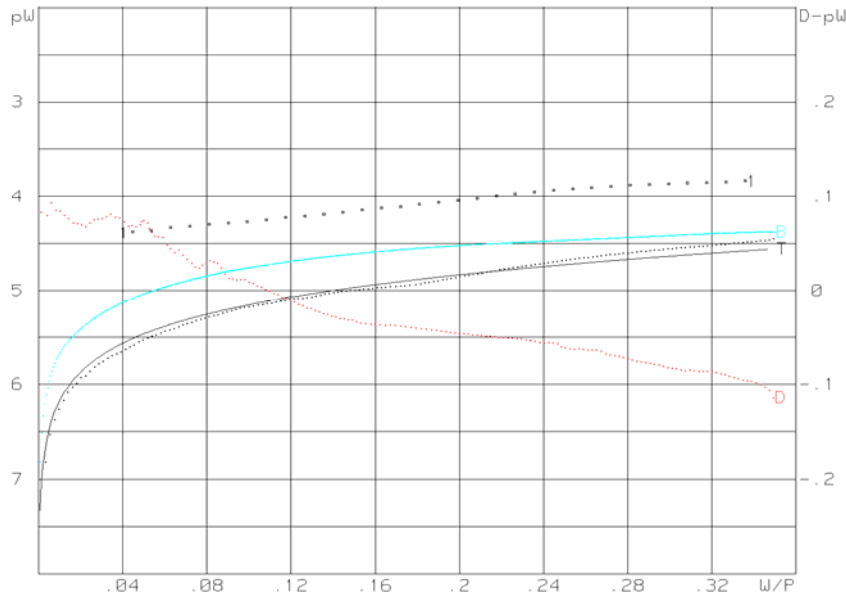


Abb. 32: Graphische Darstellung der Titrationskurvenberechnung; T: Titrationskurven [schwarz gepunktet: experimentell, schwarz durchgezogen: theoretisch], B:  $-\lg(\text{gebundene Wirkstoffkonzentration})$  [hellblau], D: Differenzkurve [rot], 1: Bindungskonstante [schwarz]

### 3.3.3. Iterative Berechnung der Bindungskonstanten

Für die iterative Berechnung der Bindungskonstanten wird zunächst das Verhältnis von Wirkstoff zu Protein am Versuchsende in der Mischkammer bestimmt. Dieses entspricht der Anzahl der mindestens vorhandenen Bindungsstellen. Da nicht immer alle Bindungsstellen voll besetzt sind, muss das Verhältnis nicht ganzzahlig sein, da es den gemittelten Wert der Besetzung entspricht und wird daher ganzzahlig aufgerundet. Ist das Verhältnis bei Versuchsende z.B. 1,5, so müssen mindestens zwei Stellen vorhanden sein. Rein rechnerisch liegt der Schluss nahe, dass es sich in diesem Beispiel um eine vollbesetzte und eine halbbesetzte Stelle handelt, da aber auch drei halbbesetzte ein Verhältnis von 1,5 ergeben würden, wird für die erste Iteration die doppelte Mindestzahl der rechnerisch möglichen Bindungsstellen angenommen.



Die Werte für die Bindungskonstanten werden zunächst sehr hoch angesetzt. Aus diesen wird die sich theoretisch in der Mischkammer befindende Wirkstoffkonzentration berechnet. Das Programm vergleicht die errechneten Werte mit den experimentell bestimmten Werten der Elutionskurve. Durch die Eingang getroffene Annahme sind die so erhaltenen Werte zunächst zu hoch, im nächsten Schritt werden die Bindungskonstanten kleiner angenommen und erneut berechnet. Die Berechnung erfolgt hierbei über mehrere Punkte der Titrationskurve, die Konstante ist der Mittelwert über einen breiteren Bereich der Kurve. Die sich daraus ergebende Standardabweichung gibt die Zuverlässigkeit der Berechnung an.

Im Idealfall sollte aus jedem Punkt der Kurve die gleich Konstante resultieren, da dies in der Praxis nicht der Fall ist, bricht das Programm ab, wenn die gewichtete Summe der Standardabweichung ein Minimum erreicht hat. Anschließend beginnt die Iteration erneut mit der Grundvoraussetzung, dass eine Bindungsstelle weniger vorhanden ist. Dies wird so lange fortgesetzt, bis die Konstanten bei der Mindestzahl der Stellen berechnet sind. Die wahrscheinlichste Anzahl der Stellen ist die, bei der die Standardabweichung am kleinsten ist.

Bei der Berechnung der Bindungskonstanten werden zwei unterschiedliche Rechenmodelle zugrunde gelegt. Das eine geht davon aus, dass alle Stellen voneinander unabhängig besetzt werden, das andere, dass die Bindung eines Liganden die Bindung weiterer Liganden beeinflusst. Das Programm gibt somit zwei unterschiedliche Konstanten an, die abhängigen und die unabhängigen Bindungskonstanten.

#### **3.3.4. Scatchard-Plot**

Der Scatchard-Plot wird zur Überprüfung der iterativ bestimmten Bindungskonstanten berechnet. Wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben wird hierfür das experimentell bestimmte Verhältnis von gebundenem Arzneistoff zu der Gesamtproteinmenge, dividiert durch die Konzentration von freiem Arzneistoff gegen das Verhältnis von gebundenem Arzneistoff zu der Gesamtproteinmenge aufgetragen und die Bindungskonstanten graphisch bestimmt.

Die so erhaltenen Werte sollten möglichst identisch mit den iterativ berechneten Bindungskonstanten sein.

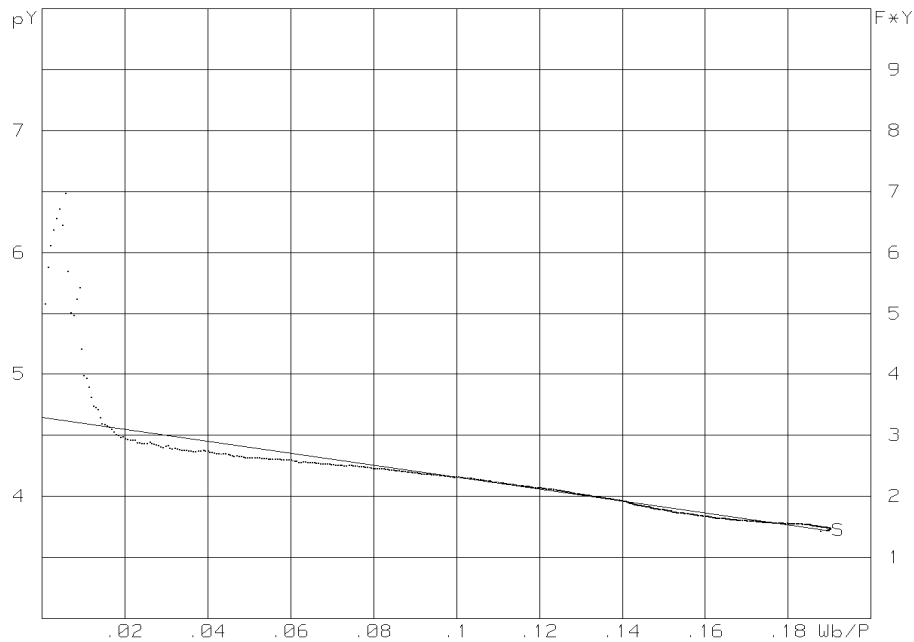


Abb. 33: Scatchard-Plot; S: Messpunkte [gepunktet] und Regressionsgerade [durchgezogen]

### 3.3.5. Auswertungsprotokoll

Das Auswertungsprotokoll besteht aus den folgenden Teilen:

- Wirkstoffkurven
- Übersicht über die Versuchsdaten
- berechneten Bindungskonstanten mit Standardabweichung
- graphische Darstellung der Titrationskurven
- Belegung der Bindungsstellen
- graphischen Darstellung des freien und gebundenen Wirkstoffanteils für verschiedene Verhältnisse von Protein zu Wirkstoff
- der Scatchard-Plot

Die benötigten Daten können den Ausdrucken entnommen werden. Normalerweise werden die Ergebnisse mehrerer Versuch zusammengefasst und die Mittelwerte gebildet.

### 3.3.6. SOP

Im Rahmen der Sonderforschungsbereichs 630 wurde basierend auf der in den Kapiteln 2 und 3 die Standard Operating Procedure SOP M-A4-001 (Bestimmung der Pro-

teinbindung) erstellt. Ziel dieser SOP ist es die Einhaltung der gleichen Prozessabläufe einer Bestimmung zu gewährleisten und dadurch gleichbleibend verlässliche Ergebnisse zu erhalten. [Volltext SOP M-A4-001 siehe 7.5]



## 4. Ergebnisse

## 4.1. Verdrängung aus der Proteinbindung

### 4.1.1. Verdrängung durch nicht-kovalent bindende Arzneistoffe

Wie unter 1.2 beschrieben, liegen der Verdrängung von Arzneistoffen verschiedene Mechanismen zugrunde. In dieser Arbeit sollten die Literatur-bekanntesten Experimente [96, 108, 109], die ebenfalls mittels kontinuierlicher Ultrafiltration durchgeführt wurden, weiterentwickelt und auf andere Bindungsmodi angewandt werden. Ziel war es, die Bindung beider Arzneistoffe parallel in einem Experiment und somit unter gleichen Bedingungen zu bestimmen.

Die verwendete Anlage ist mit einem UV-Detektor ausgerüstet, der mehrere Wellenlängen gleichzeitig erfassen kann. Werden zwei Arzneistoffe, die zum einen möglichst weit auseinanderliegende Absorptionsmaxima aufweisen und zum anderen jeweils ein Absorptionsminimum im Absorptionsmaximum des anderen Stoffes haben [Abb. 34], ausgewählt, können diese nebeneinander in einem Experiment bestimmt werden [73]. Um eine möglichst störungsfreie Messung zu erzielen, wurden die Konzentrationen jeweils so gewählt, dass die Absorption des einen Stoffes bei der Messwellenlänge des anderen nicht höher als das Grundrauschen des Detektors war.

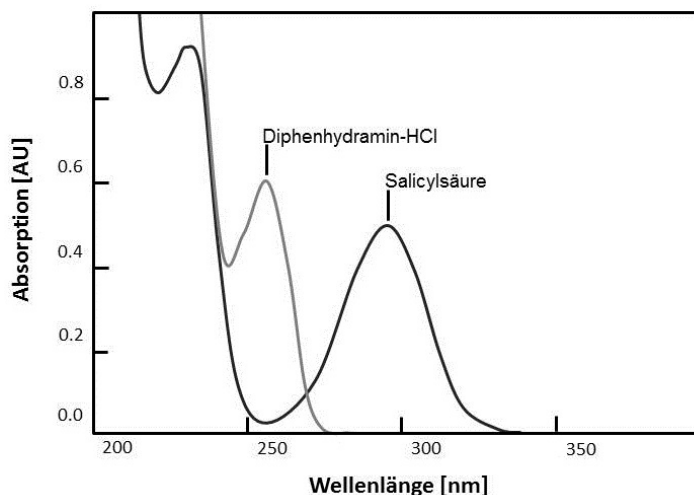


Abb. 34: UV-Spektrum des Diphenhydramin-HCl und der Salicylsäure

Die in der Dissertation von *Albert* beschriebenen Messungen, wurden mit zwei verschiedenen Versuchsansätzen durchgeführt, bei denen die Bindung jedes Stoffes jeweils in einem separaten Experiment bestimmt wurde.

Bei der Messung der Verdrängung zweier Substanzen A und B unter den Bedingungen des ersten Versuchsansatzes, wurde zunächst die Beeinflussung der Bindung von A durch B bestimmt. Hierfür wurde die Konzentration von A so gewählt, wie sie

bei einer Einzelbestimmung ideal wäre. Der Verdrängungspartner B wurde in einer Konzentration zugegeben, bei der seine Absorption die von A nicht beeinflusst. In einer zweiten Messung wurde anschließend die Beeinflussung der Bindung von B durch A bestimmt, indem die Stoffe umgekehrt eingesetzt wurden. Folglich war hierbei die Konzentration von B so hoch wie in einer Einzelmessung und die von A wurde so angepasst, dass die Absorption von B nicht beeinflusst wurde.

Dadurch ergaben sich unterschiedliche Konzentrationen der Stoffe in den beiden Experimenten. Dies kann zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen, da um die Störung der Absorption durch den Verdrängungspartner zu minimieren der jeweils zu bestimmenden Stoff in einer höheren Konzentration eingesetzt wird. Somit ergeben sich unterschiedliche Gleichgewichtskonzentrationen, je nachdem welcher Stoff bestimmt wird und die Bindung des zu bestimmenden Stoffes ist jeweils begünstigt, da dieser in einer höheren Konzentration vorliegt.

Bei der Messung mit dem zweiten Versuchsansatz wurde das Protein zunächst mit Stoff B gesättigt und dieses gesättigte Protein dann mit einer Lösung von Stoff A ultrafiltriert. Hierbei geht die Bindung des Stoffes B allerdings schon aufgrund dieses Vorgehens zurück. Die Konzentration von B in der Zelle sinkt durch das Anfluten der Lösung A und es liegen nicht mehr die Bedingungen der vorher erfolgten Gleichgewichtseinstellung vor. Das Milieu um das Protein verarmt so an Substanz B zu Gunsten von A, dessen Konzentration kontinuierlich steigt. Dadurch wird die Bindung des Stoffes A bei diesem Ansatz begünstigt, da im Verlauf der Messung Effekt der Elution von B aus der Messzelle zunimmt und dies den Stoffaustausch durch die Verdrängung überlagert. Dies führt besonders bei Stoffen, die einen schellen Austausch zwischen gebundener und ungebundener Form aufweisen, zur Verfälschung der Ergebnisse.

Um die Nachteile beider Vorgehensweisen zu vermeiden, wurde die Methode so modifiziert, dass sich bei den Messungen beide Stoffe stets gleichzeitig und in einem konstanten Verhältnis zueinander in der Wirkstofflösung befanden. Ihre Proteinbindung wurde somit stets nebeneinander bestimmt.

Daraus ergibt sich die Einschränkung, dass mit diesem Versuchsansatz die von *Albert* beschriebene Unterscheidung zwischen Konkurrenz um eine Bindestelle (1. Versuchsansatz) und Verdrängung aus der Proteinbindung (2. Versuchsansatz) nicht möglich ist. Da es sich bei der Proteinbindung allerdings um ein dynamisches Gleichgewicht handelt, bei dem ein steter Wechsel zwischen der an das Protein gebunden

und ungebundenen Form eines Stoffes stattfindet, ist eine Verdrängung im Sinne eines direkten Austausches eines gebundenen Liganden durch einen anderen bei den durchgeführten Messungen nicht gegeben.

Die vermessenen Stoffe liegen nicht kovalent an das Protein gebunden vor, sondern diffundieren immer wieder von diesem ab, das heißt die Bindungsstellen werden immer wieder frei und können so auch von dem anderen Liganden besetzt werden. Die Verdrängung kommt somit nicht durch direkten Austausch zustande, sondern durch Belegung oder allosterische Modulation einer Bindungsstelle durch den anderen Liganden. Eine Unterscheidung zwischen Verdrängung und Konkurrenz ist somit nicht sinnvoll.

Für die Durchführung wurden vorwiegend Substanzen betrachtet, deren Proteinbindung höher als 90 % ist, da davon ausgegangen wurde, dass vor allem Arzneistoffe mit hoher Bindung sich gegenseitig aus der Bindung verdrängen [59]. An welchen Bindungsstellen des Proteins der Stoff bindet und ob es sich bei den Stoffen um klinisch relevante Kombinationspartner handelt, wurde zunächst nicht berücksichtigt, da erst die generelle Möglichkeit der parallelen Bestimmung untersucht wurde.



#### 4.1.1.1. Basischer und saurer Arzneistoff

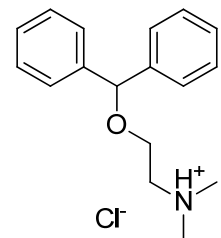
Die ersten untersuchten Arzneistoffpaare bestanden jeweils aus einem Arzneistoff mit basischer Funktionalität und einem mit saurer Funktion, wobei beide Stoffe reversible Bindung an Albumin aufweisen. Die sauren Arzneistoffe binden spezifisch an die Sudlow-I- oder Sudlow-II-Bindestelle des Albumins, wobei beide Stellen eine hohe Affinität zu anionisch vorliegenden Stoffen zeigen. Schwach basische Arzneistoffe wie Diazepam können darüber hinaus, wenn sie unprotoniert vorliegen, auch Affinität zu Sudlow-II haben [21, 22, 110].

Für kationisch vorliegende Stoffe ist keine spezifische Bindestelle bekannt, weshalb davon ausgegangen wird, dass diese vorwiegend unspezifisch an Albumin binden. Eine direkte Konkurrenz um eine Bindungsstelle ist somit nicht wahrscheinlich und Änderungen im Bindungsverhaltens beider Stoffe sollten vorwiegend auf Konformationsänderungen des Proteins beruhen [14].

Die Ergebnisse der folgenden Messungen werden in Kapitel 4.1.1.4 diskutiert.

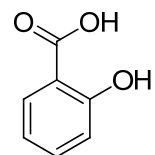
#### Diphenhydramin-HCl und Salicylsäure

<b>Substanz I:</b>	<b>Diphenhydramin-HCl</b>
Summenformel:	$C_{17}H_{22}ClNO$
Molare Masse:	291.8 g/mol
Messwellenlänge:	257 nm
Eingesetzte Konzentration:	500 mg/l
Verwendetes Protein:	Bovines Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	70-85 % [111]



Diphenhydramin-HCl

<b>Substanz II:</b>	<b>Salicylsäure</b>
Summenformel:	$C_7H_6O_3$
Molare Masse:	138.1 g/mol
Messwellenlänge:	295 nm
Eingesetzte Konzentration:	10 mg/l
Verwendetes Protein:	Bovines Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	80-95 % [1]



Salicylsäure

Übersicht über die Messungen von Diphenhydramin-HCl (DP) und Salicylsäure (SA):

	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
<b>DP (Literatur)</b>	70-85	---	---	---
<b>DP (experimentell)</b>	75.01 ± 5.29	3.62	2.60	---
<b>DP in Anwesenheit von SA</b>	63.77 ± 3.52	3.23	2.88	2.77
<b>SA (Literatur)</b>	80-95	---	---	---
<b>SA in Anwesenheit von DP</b>	90.11 ± 2.21	4.13	3.09	---

Messung von Diphenhydramin-HCl:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	82.15	3.83	2.71	84.31	3.95	2.79
2	72.34	3.61	2.53	74.28	3.74	---
3	79.12	3.80	---	74.77	3.69	---
4	70.60	3.29	2.99	76.56	3.74	2.90
5	70.84	3.59	2.18	69.59	3.58	---
<b>Mittelwert</b>	<b>75.01</b>	<b>3.62</b>	<b>2.60</b>	<b>75.90</b>	<b>3.74</b>	<b>2.85</b>
<b>sdv</b>	<b>5.29</b>	<b>0.22</b>	<b>0.34</b>	<b>5.36</b>	<b>0.13</b>	<b>0.08</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>7.05</b>	<b>5.96</b>	<b>13.04</b>	<b>7.06</b>	<b>3.59</b>	<b>2.73</b>

Messung von Diphenhydramin-HCl in Anwesenheit von Salicylsäure (10 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				Abhängige Bindungsstellen			
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	60.12	3.08	2.90	2.72	51.48	3.25	2.93	2.75
2	66.58	3.20	3.02	2.84	76.56	3.74	2.90	2.73
3	67.92	3.10	2.93	2.75	64.98	3.49	2.80	2.63
4	63.76	3.47	---	---	50.50	3.22	---	---
5	60.45	3.32	2.66	---	52.49	3.27	2.91	---
<b>Mittelwert</b>	<b>63.77</b>	<b>3.23</b>	<b>2.88</b>	<b>2.77</b>	<b>59.20</b>	<b>3.39</b>	<b>2.89</b>	<b>2.70</b>
<b>sdv</b>	<b>3.52</b>	<b>0.16</b>	<b>0.15</b>	<b>0.06</b>	<b>11.35</b>	<b>0.22</b>	<b>0.06</b>	<b>0.06</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>5.51</b>	<b>5.03</b>	<b>5.34</b>	<b>2.25</b>	<b>19.17</b>	<b>6.51</b>	<b>2.01</b>	<b>2.38</b>

Messung von Salicylsäure in Anwesenheit von Diphenhydramin-HCl (500 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	89.55	4.13	2.83	90.61	4.19	---
2	90.14	4.15	3.08	88.89	4.23	---
3	92.46	4.29	3.05	91.66	4.37	---
4	91.66	4.05	3.84	92.62	4.32	---
5	86.75	4.02	2.65	87.36	4.06	---
<b>Mittelwert</b>	<b>90.11</b>	<b>4.13</b>	<b>3.09</b>	<b>90.23</b>	<b>4.23</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>2.21</b>	<b>0.11</b>	<b>0.45</b>	<b>2.12</b>	<b>0.12</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>2.45</b>	<b>2.55</b>	<b>14.70</b>	<b>2.35</b>	<b>2.85</b>	<b>---</b>

Messung von Salicylsäure:

Auf die Einzelmessungen wurde verzichtet, da im Verdrängungsexperiment kein Unterschied zum Literaturwert der Proteinbindung der Salicylsäure zu erkennen war. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass keine Beeinflussung der Bindung von Salicylsäure vorliegt.

Bei den folgenden Messungen wurde bei den sauren Arzneistoffen analog verfahren und die Einzelbestimmung nur durchgeführt, wenn eine Abweichung zu der literaturbekannten Bindung auftrat.

**Ambroxol-HCl und Furosemid****Substanz I:****Ambroxol-HCl**

Summenformel:

 $C_{13}H_{19}Br_2ClN_2O$ 

Molare Masse:

414.6 g/mol

Messwellenlänge:

306 nm

Eingesetzte Konzentration:

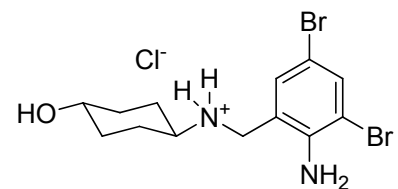
70 mg/l

Verwendetes Protein:

Humanes Serumalbumin

Bindung laut Literatur:

~ 90 % [1]



Ambroxol-HCl

**Substanz II:****Furosemid**

Summenformel:

 $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ 

Molare Masse:

330.7 g/mol

Messwellenlänge:

277 nm

Eingesetzte Konzentration:

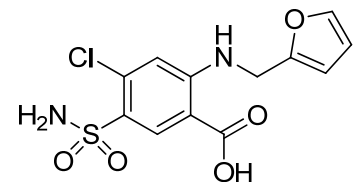
15 mg/l

Verwendetes Protein:

Humanes Serumalbumin

Bindung laut Literatur:

~ 98 % [1]



Furosemid

Übersicht über die Messungen von Ambroxol-HCl (AM) und Furosemid (FU):

	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
<b>AM (Literatur)</b>	~ 90	---	---
<b>AM (experimentell)</b>	89.39 ± 0.52	4.02	3.75
<b>AM in Anwesenheit von FU</b>	79.77 ± 5.60	3.66	3.28
<b>FU (Literatur)</b>	~98	---	---
<b>FU in Anwesenheit von AM</b>	97.55 ± 0.19	4.72	4.15

Messung von Ambroxol-HCl:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	89.50	3.93	3.75	91.13	4.23	---
2	89.01	4.13	---	89.79	4.16	---
3	89.14	4.14	---	89.69	4.16	---
4	89.04	3.91	3.73	90.66	4.21	---
5	90.25	3.98	3.76	91.73	4.27	---
<b>Mittelwert</b>	<b>89.39</b>	<b>4.02</b>	<b>3.75</b>	<b>93.02</b>	<b>4.35</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.52</b>	<b>0.11</b>	<b>0.02</b>	<b>91.00</b>	<b>4.23</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.58</b>	<b>2.73</b>	<b>0.41</b>	<b>1.26</b>	<b>0.07</b>	<b>---</b>

Messung von Ambroxol-HCl in Anwesenheit von Furosemid (15 mg/l):

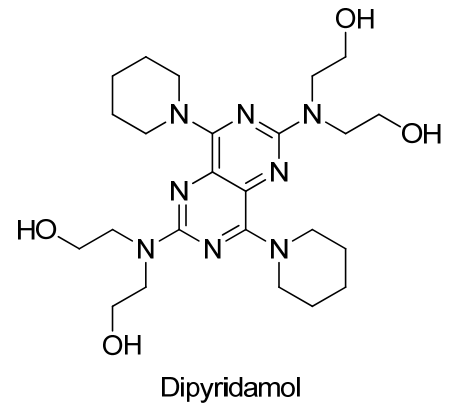
Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	76.77	3.70	2.69	76.80	3.74	---
2	84.95	3.75	3.58	79.64	3.81	3.64
3	71.40	3.44	3.16	71.67	3.61	---
4	83.30	3.70	3.52	78.74	3.79	3.61
5	82.42	3.70	3.44	75.53	3.71	3.54
<b>Mittelwert</b>	<b>79.77</b>	<b>3.66</b>	<b>3.28</b>	<b>76.48</b>	<b>3.73</b>	<b>3.60</b>
<b>sdv</b>	<b>5.60</b>	<b>0.12</b>	<b>0.37</b>	<b>3.13</b>	<b>0.08</b>	<b>0.05</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>7.02</b>	<b>3.38</b>	<b>11.16</b>	<b>4.10</b>	<b>2.11</b>	<b>1.43</b>

Messung von Furosemid in Anwesenheit von Ambroxol-HCl (70 mg/l):

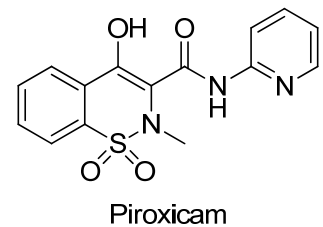
Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	97.76	4.76	4.20	97.19	4.76	4.41
2	97.57	4.70	4.22	96.92	4.72	4.43
3	97.24	4.68	4.04	96.98	4.73	4.15
4	97.61	4.74	4.11	96.36	4.64	4.47
5	97.58	4.71	4.19	96.99	4.73	4.40
<b>Mittelwert</b>	<b>97.55</b>	<b>4.72</b>	<b>4.15</b>	<b>96.89</b>	<b>4.72</b>	<b>4.37</b>
<b>sdv</b>	<b>0.19</b>	<b>0.03</b>	<b>0.08</b>	<b>0.31</b>	<b>0.05</b>	<b>0.13</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.20</b>	<b>0.68</b>	<b>1.81</b>	<b>0.32</b>	<b>0.96</b>	<b>2.90</b>

## Dipyridamol und Piroxicam

<b>Substanz I:</b>	<b>Dipyridamol</b>
Summenformel:	$C_{24}H_{40}N_8O_4$
Molare Masse:	504.6 g/mol
Messwellenlänge:	417 nm
Eingesetzte Konzentration:	20 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	~ 99 % [1]



<b>Substanz II:</b>	<b>Piroxicam</b>
Summenformel:	$C_{15}H_{13}ClN_3O_4S$
Molare Masse:	331.4 g/mol
Messwellenlänge:	355 nm
Eingesetzte Konzentration:	30 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	~99 % [1]



### Übersicht über die Messungen von Dipyridamol (DY) und Piroxicam (PI):

	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
<b>DY (Literatur)</b>	~ 99	---	---	---
<b>DY (experimentell)</b>	99.99 ± 0.01	7.06	6.88	---
<b>DY in Anwesenheit von PI</b>	83.10 ± 1.04	3.88	2.74	---
<b>PI (Literatur)</b>	~99	---	---	---
<b>PI in Anwesenheit von DY</b>	96.98 ± 0.73	4.41	4.22	4.04

Messung von Dipyridamol:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	99.98	6.68	6.51	83.13	3.84	---
2	99.99	7.13	6.95	86.81	4.04	---
3	99.99	7.33	7.15	90.83	4.22	---
4	99.99	7.23	7.05	89.22	4.13	---
5	99.98	6.92	6.75	81.41	3.86	---
<b>Mittelwert</b>	<b>99.99</b>	<b>7.06</b>	<b>6.88</b>	<b>86.28</b>	<b>4.02</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.01</b>	<b>0.26</b>	<b>0.26</b>	<b>3.98</b>	<b>0.17</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.01</b>	<b>3.69</b>	<b>3.71</b>	<b>4.61</b>	<b>4.14</b>	<b>---</b>

Messung von Dipyridamol in Anwesenheit von Piroxicam (30 mg/l):

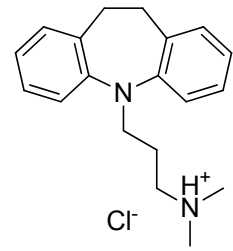
Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	83.60	3.90	2.80	83.66	3.93	---
2	82.09	3.81	3.07	80.79	3.85	3.44
3	82.04	3.85	2.67	81.28	3.86	3.21
4	83.28	3.90	2.49	83.33	3.92	---
5	84.49	3.93	2.68	83.38	3.92	3.09
<b>Mittelwert</b>	<b>83.10</b>	<b>3.88</b>	<b>2.74</b>	<b>82.49</b>	<b>3.90</b>	<b>3.25</b>
<b>sdv</b>	<b>1.04</b>	<b>0.05</b>	<b>0.21</b>	<b>1.34</b>	<b>0.04</b>	<b>0.18</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>1.26</b>	<b>1.23</b>	<b>7.81</b>	<b>1.63</b>	<b>0.97</b>	<b>5.48</b>

Messung von Piroxicam in Anwesenheit von Dipyridamol (20 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				Abhängige Bindungsstellen			
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	97.68	4.53	4.35	4.14	98.03	4.92	4.22	3.96
2	96.44	4.33	4.15	3.98	96.07	4.61	4.28	3.74
3	97.85	4.57	4.37	4.19	97.80	4.70	4.32	3.99
4	96.68	4.36	4.18	4.01	95.69	4.57	4.26	3.73
5	96.27	4.26	4.07	3.90	95.27	4.53	4.30	3.78
<b>Mittelwert</b>	<b>96.98</b>	<b>4.41</b>	<b>4.22</b>	<b>4.04</b>	<b>96.57</b>	<b>4.67</b>	<b>4.28</b>	<b>3.84</b>
<b>sdv</b>	<b>0.73</b>	<b>0.13</b>	<b>0.13</b>	<b>0.12</b>	<b>1.26</b>	<b>0.16</b>	<b>0.04</b>	<b>0.13</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.75</b>	<b>3.03</b>	<b>3.09</b>	<b>2.94</b>	<b>1.31</b>	<b>3.33</b>	<b>0.90</b>	<b>3.26</b>

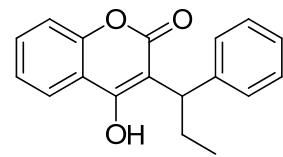
## Imipramin-HCl und Phenprocoumon / Warfarin

<b>Substanz I:</b>	<b>Imipramin-HCl</b>
Summenformel:	$C_{19}H_{25}ClN_2$
Molare Masse:	316.9 g/mol
Messwellenlänge:	258 nm
Eingesetzte Konzentration:	10 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	80-95 % [111]



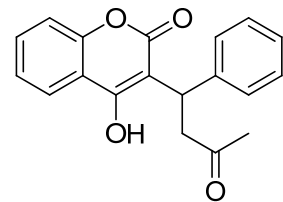
Imipramin-HCl

<b>Substanz II:</b>	<b>Phenprocoumon</b>
Summenformel:	$C_{18}H_{16}O_3$
Molare Masse:	280.31 g/mol
Messwellenlänge:	308 nm
Eingesetzte Konzentration:	5 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	> 99 % [1]



Phenprocoumon

<b>Substanz II:</b>	<b>Warfarin</b>
Summenformel:	$C_{19}H_{16}O_4$
Molare Masse:	308.3 g/mol
Messwellenlänge:	307 nm
Eingesetzte Konzentration:	6 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	~99 % [1]



Warfarin

Übersicht über die Messungen von Imipramin-HCl (IM) und Phenprocoumon (PH) bzw. Warfarin (WA):

	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
<b>IM (Literatur)</b>	80-95	---	---
<b>IM (experimentell)</b>	82.76 ± 2.62	3.82	3.21
<b>IM in Anwesenheit von PH</b>	72.04 ± 3.46	3.51	3.07
<b>IM in Anwesenheit von WA</b>	90.19 ± 2.08	4.15	3.41
<b>PH (Literatur)</b>	> 99	---	---
<b>PH in Anwesenheit von IM</b>	98.50 ± 0.50	4.98	4.07
<b>WA (Literatur)</b>	> 99	---	---
<b>WA in Anwesenheit von IM</b>	98.79 ± 0.13	5.12	3.67

Messung von Imipramin-HCl:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	84.81	3.97	---	80.00	3.82	---
2	79.95	3.6	3.42	79.45	3.81	---
3	82.82	3.87	2.89	85.53	3.99	---
4	80.37	3.67	3.32	80.41	3.84	---
5	85.87	4.00	---	84.02	3.94	---
<b>Mittelwert</b>	<b>82.76</b>	<b>3.82</b>	<b>3.21</b>	<b>81.88</b>	<b>3.88</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>2.62</b>	<b>0.18</b>	<b>0.28</b>	<b>2.72</b>	<b>0.08</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>3.17</b>	<b>4.69</b>	<b>8.77</b>	<b>3.32</b>	<b>2.07</b>	<b>---</b>

Messung von Imipramin-HCl in Anwesenheit von Phenprocoumon (5 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	76.99	3.53	3.94	76.47	3.73	---
2	70.98	3.58	2.50	71.02	3.61	---
3	68.18	3.48	2.74	68.76	3.52	---
4	73.95	3.46	3.27	68.39	3.56	---
5	70.09	3.49	2.89	67.28	3.53	---
<b>Mittelwert</b>	<b>72.04</b>	<b>3.51</b>	<b>3.07</b>	<b>70.38</b>	<b>3.59</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>3.46</b>	<b>0.05</b>	<b>0.56</b>	<b>3.66</b>	<b>0.09</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>4.81</b>	<b>1.36</b>	<b>18.32</b>	<b>5.21</b>	<b>2.39</b>	<b>---</b>

Messung von Imipramin-HCl in Anwesenheit von Warfarin (6 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	88.32	4.00	3.41	85.50	3.99	---
2	91.81	4.27	---	90.76	4.21	---
3	90.76	4.21	---	89.28	4.14	---
4	87.70	3.97	3.41	87.89	4.08	---
5	92.35	4.30	---	90.82	4.22	---
<b>Mittelwert</b>	<b>90.19</b>	<b>4.15</b>	<b>3.41</b>	<b>88.85</b>	<b>4.13</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>2.08</b>	<b>0.15</b>	<b>0.00</b>	<b>2.23</b>	<b>0.10</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>2.31</b>	<b>3.72</b>	<b>0.00</b>	<b>2.51</b>	<b>2.32</b>	<b>---</b>

Messung von Phenprocoumon in Anwesenheit von Imipramin-HCl (10 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	98.45	4.99	3.96	98.38	5	3.99
2	98.87	5.14	3.78	98.85	5.16	3.82
3	98.88	5.14	3.97	98.97	5.21	3.71
4	97.66	4.62	4.44	98.64	5.08	---
5	98.65	5.02	4.19	98.91	5.18	---
<b>Mittelwert</b>	<b>98.50</b>	<b>4.98</b>	<b>4.07</b>	<b>98.75</b>	<b>5.13</b>	<b>3.84</b>
<b>sdv</b>	<b>0.50</b>	<b>0.21</b>	<b>0.25</b>	<b>0.24</b>	<b>0.09</b>	<b>0.14</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.51</b>	<b>4.29</b>	<b>6.24</b>	<b>0.24</b>	<b>1.66</b>	<b>3.67</b>

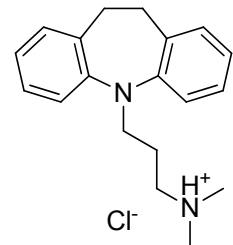


Messung von Warfarin in Anwesenheit von Imipramin-HCl (10 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	98.84	5.14	3.67	98.91	5.18	---
2	98.89	5.16	3.49	98.91	5.18	---
3	98.74	5.10	3.75	98.79	5.14	---
4	98.59	5.05	3.71	98.77	5.13	---
5	98.91	5.16	3.75	98.98	5.21	---
<b>Mittelwert</b>	<b>98.79</b>	<b>5.12</b>	<b>3.67</b>	<b>98.87</b>	<b>5.17</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.13</b>	<b>0.05</b>	<b>0.11</b>	<b>0.09</b>	<b>0.03</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.13</b>	<b>0.92</b>	<b>2.94</b>	<b>0.09</b>	<b>0.63</b>	<b>---</b>

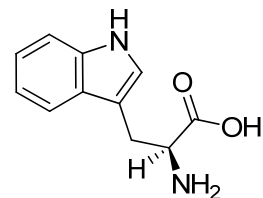
## Imipramin-HCl und L-Tryptophan

<b>Substanz I:</b>	<b>Imipramin-HCl</b>
Summenformel:	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub>
Molare Masse:	316.9 g/mol
Messwellenlänge:	258 nm
Eingesetzte Konzentration:	10 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	80-95 % [111]



Imipramin-HCl

<b>Substanz II:</b>	<b>L-Tryptophan</b>
Summenformel:	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Molare Masse:	204.1 g/mol
Messwellenlänge:	---
Eingesetzte Konzentration:	5 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	~10 % [1]



L-Tryptophan

Übersicht über die Messungen von Imipramin-HCl (IM) und L-Tryptophan (TR):

	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
<b>IM (Literatur)</b>	80-95	---	---	---
<b>IM (experimentell)</b>	82.76 ± 2.62	3.82	3.21	---
<b>IM in Anwesenheit von TR</b>	78.14 ± 4.30	3.78	---	---
<b>TR (Literatur)</b>	~ 10	---	---	---
<b>TR in Anwesenheit von IM</b>	---	---	---	---

Messung von Imipramin-HCl in Anwesenheit von L-Tryptophan (5 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen		Abhängige Bindungsstellen	
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>
1	77.34	3.76	76.22	3.73
2	74.19	3.68	73.76	3.67
3	73.98	3.67	73.48	3.66
4	83.24	3.92	79.86	3.82
5	81.94	3.88	77.11	3.75
<b>Mittelwert</b>	<b>78.14</b>	<b>3.78</b>	<b>76.09</b>	<b>3.73</b>
<b>sdv</b>	<b>4.30</b>	<b>0.11</b>	<b>2.62</b>	<b>0.07</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>5.50</b>	<b>3.02</b>	<b>3.45</b>	<b>1.75</b>

Messung von Imipramin-HCl:

Siehe Experiment Imipramin-HCl und Phenprocoumon / Warfarin.

Messung von L-Tryptophan in Anwesenheit von Imipramin-HCl:

Da das Absorptionsmaximum des L-Tryptophans bei 279 nm mit einem Maximum des Imipramin-HCl zusammenfiel, war nur die Bestimmung des Imipramin-HCl möglich, dessen zweites Maximum bei 258 nm nicht von der Absorption des Tryptophans überlagert wird.

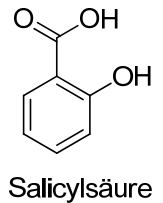
Messung von L-Tryptophan:

Auf die Einzelbestimmung verzichtet, da nur der Einfluss durch die Anwesenheit des Tryptophans auf die Bindung des Imipramin-HCl von Interesse war.

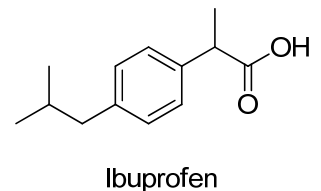
## 4.1.1.2. Zwei saure Arzneistoffe

## Salicylsäure und Ibuprofen

<b>Substanz I:</b>	<b>Salicylsäure</b>
Summenformel:	$C_7H_6O_3$
Molare Masse:	138.1 g/mol
Messwellenlänge:	295 nm
Eingesetzte Konzentration:	10 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	80-95 % [1]



<b>Substanz II:</b>	<b>Ibuprofen</b>
Summenformel:	$C_{13}H_{18}O_2$
Molare Masse:	206.3 g/mol
Messwellenlänge:	264 nm
Eingesetzte Konzentration:	190 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	> 90 % [1]



## Übersicht über die Messungen von Salicylsäure (SA) und Ibuprofen (IB):

	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
<b>SA (Literatur)</b>	80-95	---	---	---
<b>SA (experimentell)</b>	84.99 ± 9.10	3.92	3.38	---
<b>SA in Anwesenheit von IB</b>	99.97 ± 0.03	6.56	6.39	6.33
<b>IB (Literatur)</b>	> 90	---	---	---
<b>IB (experimentell)</b>	99.99 ± 0.00	7.31	6.90	---
<b>IB in Anwesenheit von SA</b>	99.96 ± 0.05	7.35	6.38	---

Messung von Salicylsäure:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	93.28	4.34	3.09	94.13	4.43	---
2	75.26	3.61	3.43	80.50	3.84	---
3	86.44	3.81	3.63	86.23	4.02	---
<b>Mittelwert</b>	<b>84.99</b>	<b>3.92</b>	<b>3.38</b>	<b>86.95</b>	<b>4.10</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>9.10</b>	<b>0.38</b>	<b>0.27</b>	<b>6.84</b>	<b>0.30</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>10.70</b>	<b>9.62</b>	<b>8.07</b>	<b>7.87</b>	<b>7.38</b>	<b>---</b>

Messung von Salicylsäure in Anwesenheit von Ibuprofen (190 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				Abhängige Bindungsstellen			
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	99.99	6.51	6.33	6.15	83.50	3.90	---	---
2	99.97	6.40	6.23	5.99	77.65	3.76	---	---
3	99.98	6.85	6.67	6.50	83.50	3.93	---	---
4	99.91	6.02	5.85	---	83.66	3.93	---	---
5	99.99	7.04	6.86	6.68	93.65	4.39	---	---
<b>Mittelwert</b>	<b>99.97</b>	<b>6.56</b>	<b>6.39</b>	<b>6.33</b>	<b>84.39</b>	<b>3.98</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.03</b>	<b>0.40</b>	<b>0.39</b>	<b>0.32</b>	<b>5.77</b>	<b>0.24</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.03</b>	<b>6.07</b>	<b>6.16</b>	<b>4.99</b>	<b>6.84</b>	<b>5.99</b>	<b>---</b>	<b>---</b>

Messung von Ibuprofen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	pK <sub>4</sub>
1	99.99	7.31	7.13	---	---
2	99.99	7.30	7.12	---	---
3	99.99	7.31	6.44	---	---
<b>Mittelwert</b>	<b>99.99</b>	<b>7.31</b>	<b>6.90</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.00</b>	<b>0.01</b>	<b>0.40</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.00</b>	<b>0.08</b>	<b>5.73</b>	<b>---</b>	<b>---</b>

Messung	Abhängige Bindungsstellen				
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	pK <sub>4</sub>
1	99.99	7.25	7.08	4.76	4.20
2	99.99	7.20	7.03	3.87	3.69
3	99.99	7.30	5.99	3.97	3.80
<b>Mittelwert</b>	<b>99.99</b>	<b>7.25</b>	<b>6.70</b>	<b>4.20</b>	<b>3.90</b>
<b>sdv</b>	<b>0.00</b>	<b>0.05</b>	<b>0.62</b>	<b>0.49</b>	<b>0.27</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.00</b>	<b>0.69</b>	<b>9.18</b>	<b>11.61</b>	<b>6.89</b>

Messung von Ibuprofen in Anwesenheit von Salicylsäure (10 mg/l):

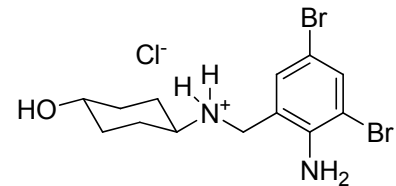
<b>Unabhängige Bindungsstellen</b>					
<b>Messung</b>	<b>Proteinbindung [%]</b>	<b>pK1</b>	<b>pK2</b>	<b>pK3</b>	<b>pK4</b>
1	99.99	7.29	6.05	---	---
2	99.94	7.47	6.03	---	---
3	99.88	7.26	6.25	---	---
4	99.99	7.38	7.20	---	---
5	99.99	7.37	6.36	---	---
<b>Mittelwert</b>	<b>99.96</b>	<b>7.35</b>	<b>6.38</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.05</b>	<b>0.08</b>	<b>0.48</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.05</b>	<b>1.12</b>	<b>7.52</b>	<b>---</b>	<b>---</b>

<b>Abhängige Bindungsstellen</b>					
<b>Messung</b>	<b>Proteinbindung [%]</b>	<b>pK1</b>	<b>pK2</b>	<b>pK3</b>	<b>pK4</b>
1	99.99	7.44	4.92	4.33	4.16
2	99.99	7.33	7.04	4.45	4.26
3	99.99	7.34	6.77	4.43	4.26
4	99.99	7.32	7.15	4.64	4.32
5	99.99	7.43	5.85	3.97	3.8
<b>Mittelwert</b>	<b>99.99</b>	<b>7.37</b>	<b>6.35</b>	<b>4.36</b>	<b>4.16</b>
<b>sdv</b>	<b>0.00</b>	<b>0.06</b>	<b>0.95</b>	<b>0.25</b>	<b>0.21</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.00</b>	<b>0.79</b>	<b>14.92</b>	<b>5.66</b>	<b>5.03</b>

## 4.1.1.3. Zwei basische Arzneistoffe

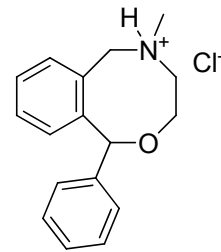
## Ambroxol-HCl und Nefopam-HCl

<b>Substanz:</b>	<b>Ambroxol-HCl</b>
Summenformel:	$C_{13}H_{19}Br_2ClN_2O$
Molare Masse:	414.6 g/mol
Messwellenlänge:	306 nm
Eingesetzte Konzentration:	70 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	~ 90 % [1]



Ambroxol-HCl

<b>Substanz:</b>	<b>Nefopam-HCl</b>
Summenformel:	$C_{17}H_{20}ClNO$
Molare Masse:	289.9 g/mol
Messwellenlänge:	266 nm
Eingesetzte Konzentration:	120 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	~ 75 % [1]



Nefopam-HCl

Übersicht über die Messungen von Ambroxol-HCl (AM) und Nefopam-HCl (NE):

	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
<b>AM (Literatur)</b>	~ 90	---	---
<b>AM (experimentell)</b>	89.39 ± 0.52	4.02	3.75
<b>AM in Anwesenheit von NE</b>	52.14 ± 5.05	3.17	2.65
<b>NE (Literatur)</b>	~ 75	---	---
<b>NE (experimentell)</b>	75.33 ± 2.57	3.60	3.26
<b>NE in Anwesenheit von AM</b>	61.86 ± 1.31	3.31	2.76

Messung von Ambroxol-HCl in Anwesenheit von Nefopam-HCl (120 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	50.60	3.17	2.38	50.15	3.22	---
2	45.02	2.91	2.74	46.03	3.15	---
3	58.77	3.23	2.83	54.53	3.30	---
4	54.37	3.30	---	48.28	3.19	---
5	51.96	3.26	---	46.84	3.17	---
<b>Mittelwert</b>	<b>52.14</b>	<b>3.17</b>	<b>2.65</b>	<b>49.17</b>	<b>3.21</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>5.05</b>	<b>0.16</b>	<b>0.24</b>	<b>3.38</b>	<b>0.06</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>9.69</b>	<b>4.88</b>	<b>8.99</b>	<b>6.88</b>	<b>1.83</b>	<b>---</b>

Messung von Ambroxol-HCl:

Siehe Experiment Ambroxol-HCl und Furosemid.

Messung von Nefopam-HCl:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	78.55	3.79	---	73.35	3.66	---
2	76.65	3.41	3.24	58.03	3.36	3.19
3	71.71	3.63	---	68.65	3.56	---
4	75.46	3.71	---	66.74	3.52	---
5	74.28	3.46	3.28	45.79	3.15	2.97
<b>Mittelwert</b>	<b>75.33</b>	<b>3.60</b>	<b>3.26</b>	<b>62.51</b>	<b>3.45</b>	<b>3.08</b>
<b>sdv</b>	<b>2.57</b>	<b>0.16</b>	<b>0.03</b>	<b>10.87</b>	<b>0.20</b>	<b>0.16</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>3.41</b>	<b>4.50</b>	<b>0.87</b>	<b>17.39</b>	<b>5.78</b>	<b>5.05</b>

Messung von Nefopam-HCl in Anwesenheit von Ambroxol-HCl (70 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	62.35	3.29	2.90	48.99	3.20	3.03
2	63.92	3.36	2.83	51.40	3.25	3.07
3	61.34	3.20	3.02	46.82	3.17	2.99
4	60.88	3.36	2.47	61.07	3.42	---
5	60.80	3.34	2.59	62.70	3.45	---
<b>Mittelwert</b>	<b>61.86</b>	<b>3.31</b>	<b>2.76</b>	<b>54.20</b>	<b>3.30</b>	<b>3.03</b>
<b>sdv</b>	<b>1.31</b>	<b>0.07</b>	<b>0.23</b>	<b>7.23</b>	<b>0.13</b>	<b>0.04</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>2.11</b>	<b>2.05</b>	<b>8.20</b>	<b>13.33</b>	<b>3.90</b>	<b>1.32</b>

#### 4.1.1.4. Diskussion

Die Vermessung der Base/Säuren-Paare Diphenhydramin-HCl/Salicylsäure, Ambroxol-HCl/Furosemid und Imipramin-HCl/Phenprocoumon ergab, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Stoffe jeweils die Arzneistoffe mit basischer Funktion eine um ca. 10 % (Diphenhydramin-HCl: 75 % / 64 %; Ambroxol-HCl: 89 % / 80 %; Imipramin-HCl: 83 % / 72 %) erniedrigte Proteinbindung aufwiesen, während die der sauren Stoffe unbeeinflusst war im Vergleich mit den Literaturwerten [Abb. 35].

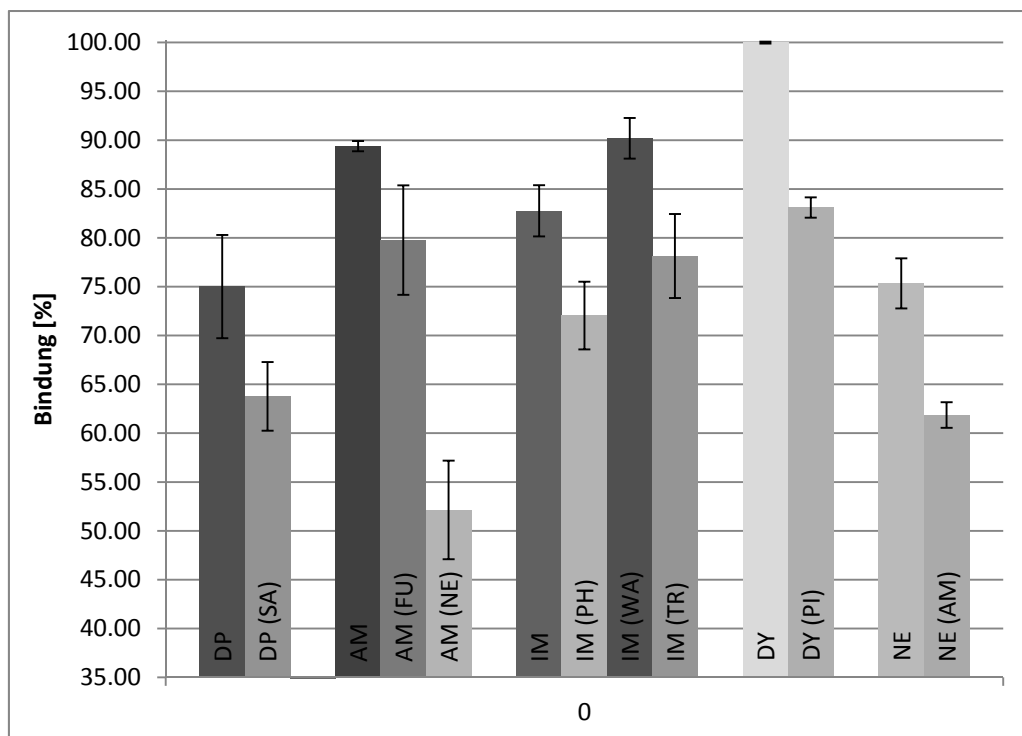


Abb. 35: Proteinbindungen der kationischen Arzneistoffe in der Einzelmessung und im Verdrängungsexperiment; Verdrängungspartner in Klammern. (AM: Ambroxol-HCl, DP: Diphenhydramin-HCl, DY: Dipyridamol, Fu: Furosemid, IM: Imipramin-HCl, NE: Nefopam-HCl, PH: Phenprocoumon, PI: Piroxicam, SA: Salicylsäure, TR: Tryptophan, WA: Warfarin)

Im nächsten Schritt wurde ein Paar aus einem sauren Stoff und einer schwächer basischen Substanz vermessen. Da bei steigendem Protonierungsgrad einer Base deren Bindung an Albumin stark sinken kann [110], wurde eine schwächere Base als in den bisherigen Experimenten gewählt, um zu bestimmen, ob dies auch hier einen Einfluss auf die Bindung hat. Als Base wurde Dipyridamol gewählt. Während die zuvor untersuchten basischen Substanzen aufgrund ihrer  $pK_S$ -Werte ( $> 9$ ) im Puffer (pH-Wert 7.40) nahezu vollständig protoniert vorliegen, ist Dipyridamol mit einem  $pK_S$  von 6.4 bei pH 7.4 nur zu ca. 10 % protoniert. Somit würden eventuell vorhandene ionische Wechselwirkungen, die an der Bindung beteiligt sein könnten, verringert und



es könnten Rückschlüsse auf die Bindungsart und –stellen ermöglicht werden. Dipyridamol müsste sich folglich stärker als die bisher vermessenen Basen aus der Bindung verdrängen lassen, wenn die basische Funktion entscheidend für die veränderte Bindung in Anwesenheit eines zweiten sauren Arzneistoffes ist.

Substanz	pK <sub>s</sub>	Funktion
Diphenhydramin-HCl	9.06 [112]	tertiäres Amin
Ambroxol-HCl	9.2 [113]	sekundäres Amin
Imipramin-HCl	9.5-10.2 [112]	tertiäres Amin
Dipyridamol	6.4 [113]	Pyrimido[5,4-d]pyrimidin
Nefopam-HCl	9.2 [113]	tertiäres Amin
Salicylsäure	2.83 [112]	Carbonsäure
	12.63 [112]	Phenol
Furosemid	3.9 [112]	Carbonsäure
Phenprocoumon	4.2 [113]	vinylloge Carbonsäure
Warfarin	4.8-5.1 [113]	vinylloge Carbonsäure
Piroxicam	5.46 [113]	vinylloge Carbaminsäure
	1.86 [113]	Pyridin
Ibuprofen	4.4 [113]	Carbonsäure

Tab. 5: pK<sub>s</sub>-Werte der vermessenen Substanzen

Die Änderung der Bindung von Dipyridamol (99 % / 83 %) durch Piroxicam war mit 17 % signifikant stärker, als die der anderen Basen (Diphenhydramin-HCl, Ambroxol-HCl, Imipramin-HCl) [Abb. 35]. Da sich alle vier Arzneistoffpaare dahingehend gleich verhalten haben, dass jeweils der saure den basischen Arzneistoff verdrängen konnte, und da der Effekt bei dem schwächer basischen Dipyridamol stärker ausgeprägt war, lässt den Schluss zu, dass an Albumin eine spezifische Bindetasche für kationische Stoffe vorhanden ist, die mit steigendem Protonierungsgrad der Substanz stärker besetzt wird und die durch die Anwesenheit eines sauren Stoffes beeinflusst werden kann.

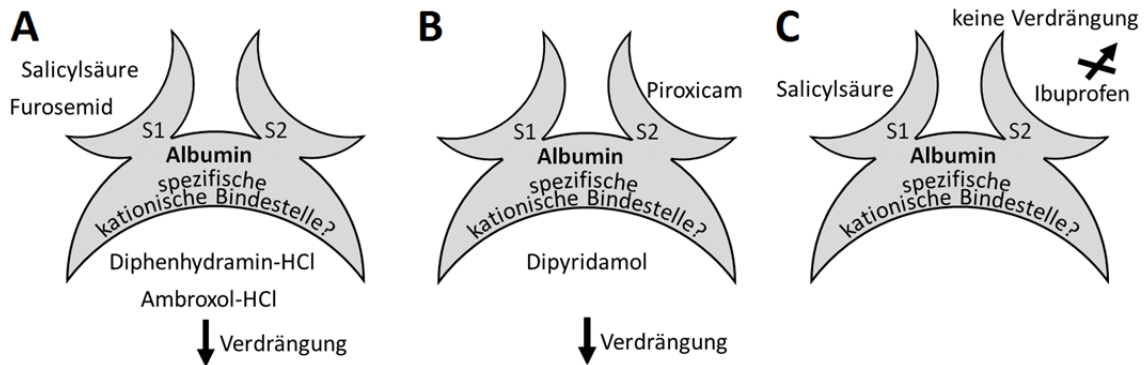
Eine solche spezifische Bindungsstelle für kationische Arzneistoffe ist - wie eingangs erwähnt - bisher nicht bekannt [vgl. 4.1.1.1]. Im Gegensatz dazu sind für saure Arzneistoffe zwei spezifische Bindungsstellen beschrieben, die nach ihrem Entdecker Sudlow benannt sind. Die Bindestelle Sudlow-I weist dabei eine höhere Spezifität für Säuren auf, während an die Sudlow-II-Stelle auch schwache Basen wie Diazepam

( $pK_s$  3.3 [112]) binden, die unter physiologischen Bedingungen ungeladen vorliegen [21, 22, 114]. Die Bindung des Diazepam ist hierbei stark von seinem Protonierungsgrad abhängig und sinkt bei höherer Protonierung [110].

In der Literatur ist bekannt, dass Salicylsäure, Furosemid und Phenprocoumon an die spezifischen Bindestelle Sudlow-I und Piroxicam an Sudlow-II binden [22, 23, 115, 116]. Da die Sudlow-II-Bindestelle weniger spezifisch ist als die Sudlow-I-Bindestelle und an diese z.B. auch schwach basische Liganden binden, könnte es sich bei der Kationenbindestelle um die Sudlow-II-Stellen handeln. Ist dies der Fall, erklärt das die Verdrängung vom Dipyridamol mit Piroxicam, da dann beide Stoffe in direkter Konkurrenz um die Bindestelle stehen.

Die Verdrängung der anderen Basen (Diphenhydramin-HCl, Ambroxol-HCl, Imipramin-HCl) durch die Sudlow-I-Liganden (Salicylsäure, Furosemid, Phenprocoumon) lässt sich allerdings nicht auf diese Weise erklären. Da Sudlow-I keine kationischen Liganden bindet, ist eine direkte Konkurrenz auszuschließen. Wird weiterhin davon ausgegangen, dass alle vier Basen (Diphenhydramin-HCl, Ambroxol-HCl, Imipramin-HCl, Dipyridamol) an derselben Stelle binden und es sich bei dieser Stelle um Sudlow-II handelt, muss diese durch die Belegung von Sudlow-I eine Beeinflussung erfahren.

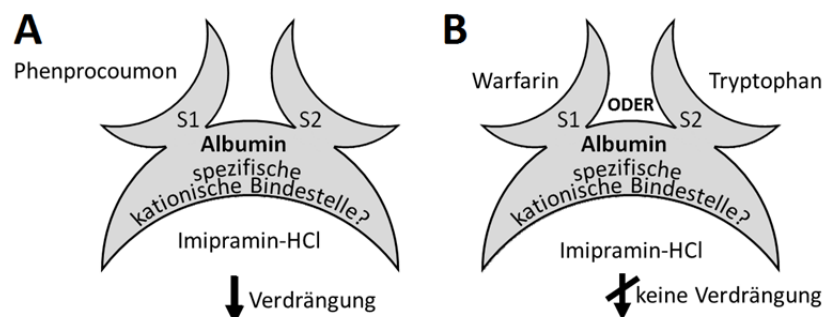
Dies könnte dadurch hervorgerufen werden, dass die Besetzung der Sudlow-I-Stelle eine allosterische Konformationsänderung der Sudlow-II-Bindestelle hervorruft, wodurch die Bindungsaffinität dieser sinkt. Ist dies der Fall, müsste sich ein bekannter Sudlow-II-Ligand wie Ibuprofen [27] durch einen Liganden, der an Sudlow-I bindet (Salicylsäure) verdrängen lassen. Im Experiment mit Ibuprofen und Salicylsäure konnte dies nicht bestätigt werden, beide Substanzen zeigten keine Erniedrigung ihrer Bindung, also gibt es bei diesem Säurepaar, das an Sudlow-I bzw. -II bindet, keine gegenseitige Beeinflussung durch Konformationsänderungen.



**Abb. 36: Schematische Darstellung der Verdrängungsexperimente der Paare Diphenhydramin-HCl/Salicylsäure, Ambroxol-HCl/Furosemid [A], Dipyridamol/Piroxicam [B] und Salicylsäure/Ibuprofen [C], (S1: Sudlow-I; S2: Sudlow-II)**

Die Untersuchung von Yoo et al. [117] beschäftigte sich ebenfalls mit der Proteinbindung des Imipramin-HCl und der Bindung von Basen an die Sudlow-II-Seite des Albumins. Yoo et al. bestimmten mittels HP-Affinitäts-Chromatographie die Veränderung der Proteinbindung von Imipramin-HCl in Anwesenheit von Warfarin (Sudlow-I Ligand) und L-Tryptophan (Sudlow-II-Ligand). Ihre Ergebnisse zeigten, dass Warfarin keinen Einfluss auf die Bindung des Imipraminhydrochlorids hatte, während sich mit Tryptophan eine Verdrängung ergab, weshalb sie zu dem Schluss kamen, dass es sich bei der Bindestelle des Imipramin-HCl um die Sudlow-II-Stelle handelt.

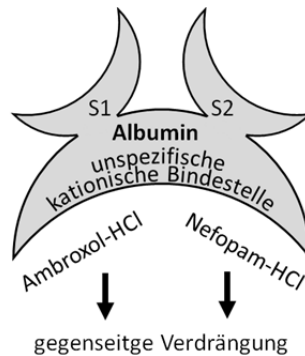
Das Ergebnis dieser Untersuchung steht allerdings im Widerspruch zu den hier mittels Ultrafiltration erhaltenen Werten, da bei der Ultrafiltration das dem Warfarin strukturell sehr ähnliche Phenprocoumon (Sudlow-I-Ligand) eine Verdrängung von Imipramin-HCl hervorrief. Warfarin selbst führte allerdings zu einer Erhöhung der Imipramin-Bindung um ca. 8 %. Tryptophan hatte dagegen keinen Einfluss auf die Bindung des Imipramin-HCl.\*



**Abb. 37: Schematische Darstellung der Verdrängungsexperimente der Paare Imipramin-HCl/Phenprocoumon [A] und Paare Imipramin-HCl/Warfarin bzw. Paare Imipramin-HCl/Tryptophan [B], (S1: Sudlow-I; S2: Sudlow-II)**

\* Diese Diskrepanz in den Ergebnissen kann darin begründet liegen, dass in den HPLC-Experimenten an ein Trägermaterial gebundenes Albumin verwendet wurde, dass sich in seinen Eigenschaften von freiem Protein stark unterscheiden kann.

Die bisher diskutierten Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei der kationischen Bindestelle nicht um Sudlow-II handelt, denn verschiedene Sudlow-II-Liganden (Piroxicam, Tryptophan) riefen unterschiedliche Effekte hervor. Da das Paar Warfarin / Imipramin-HCl keine gegenseitige Beeinflussung der Bindung zeigte, ist auch eine allosteren Modulation unwahrscheinlich, da hier analog zu der Messung mit Phenprocoumon / Imipramin-HCl die Bindung des Imipraminhydrochlorids geringer werden müsste [Abb. 37].



**Abb. 38: Schematische Darstellung des Verdrängungsexperiments des Paares Ambroxol-HCl/Nefopam-HCl, (S1: Sudlow-I; S2: Sudlow-II)**

Die Bindestelle der starken Basen ist mit großer Wahrscheinlichkeit eine zusätzliche, mehr oder weniger spezifische kationische Bindestelle, wie in Abb. 38 dargestellt. Dafür spricht, dass das Basenpaar Ambroxol-HCl / Nefopam-HCl sich gegenseitig aus der Proteinbindung verdrängt. Die Bindung des Ambroxolhydrochlorids ging um 38 % zurück, die des Nefopam-HCl um 14 %, d.h. beide binden an die gleiche Stelle des Albumins. Wie spezifisch diese Bindestelle für basische Arzneistoffe ist, kann mit den hier durchgeführten Experimenten nicht beurteilt werden.

Werden die vorliegenden Untersuchungen zusammengefasst, kann davon ausgegangen werden, dass

- a) es eine Bindungsstelle für protonierte Basen (Kationen) gibt, die von Sudlow-II verschieden ist.
- b) keine Beeinflussung der Sudlow-II-Stelle durch die Besetzung von Sudlow-I stattfindet.

Generell ließ sich durch die Experimente zeigen, dass eine simultane Messung der Verdrängungen von zwei Stoffen aus der Proteinbindung mit dem gewählten Versuchsansatz möglich ist. Allerdings muss auch erwähnt werden, dass mit dieser Methode nur Substanzen, deren UV/Vis-spektroskopische Eigenschaften die oben erwähnten Parameter erfüllen, untersucht werden können. Entsprechen diese den Vor-

gaben nur zum Teil, kann wie bei dem Beispiel Imipramin-HCl/Tryptophan nur einer der Stoffe betrachtet werden. Hierbei handelt es sich um ein reines Detektionsproblem, das durch die Wahl eines geeigneteren Detektionsverfahrens wie der Massenspektrometrie behoben werden könnte.

Hierfür müssten allerdings einige zum Teil kritische Parameter angepasst werden. Zum einen muss der Puffer auf leichtflüchtige Substanzen wie Ammoniumformiat umgestellt werden, wodurch dieser allerdings seine den physiologischen Verhältnissen angepassten Eigenschaften teilweise verliert. Es ist auch sehr gut möglich, dass der kontinuierliche Proteindurchgang durch die Zelle nach Schritt 3 eine Quantifizierung erschwert. Dieser ist normalerweise so niedrig, dass er im Rauschen des UV-Detektors untergeht und nicht erfasst wird. Bei einer MS-Detektion könnte dieser allerdings Störsignale hervorrufen, da insbesondere bei stark bindenden Stoffen auch Protein-Substanz-Addukte gemessen werden. Inwiefern dies praktisch umsetzbar ist, müsste in entsprechenden Experimenten gezeigt werden.

#### 4.1.2. Verdrängung durch kovalent an Cys34 bindende Arzneistoffe

Wie unter 1.1 erwähnt enthalten sowohl das humane als auch das bovine Serumalbumin jeweils 35 Cysteine in ihrer Aminosäuresequenz. Hiervon sind 34 zu Disulfidbrücken verknüpft und nur das Cystein in Position 34 ist in beiden Proteinen nicht intramolekular gebunden [14].

Im Körper liegen ca. 70-80 % des Albumins in der humanen Mercaptalbuminform (HMA) vor, d.h. das Cys34 liegt in der reduzierten freien Thiolform vor. Der Rest ist größtenteils an kleine Moleküle wie Cystein und Homocystein gebunden und wird als humanes Nonmercaptalbumin bezeichnet (HNA). Ein geringer Anteil ist bis zur Sulfin- bzw. Sulfonsäure oxidiert [118] [Abb. 39].

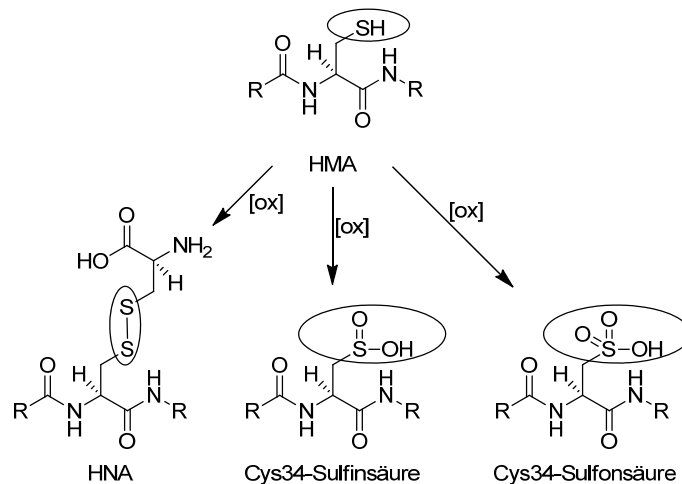
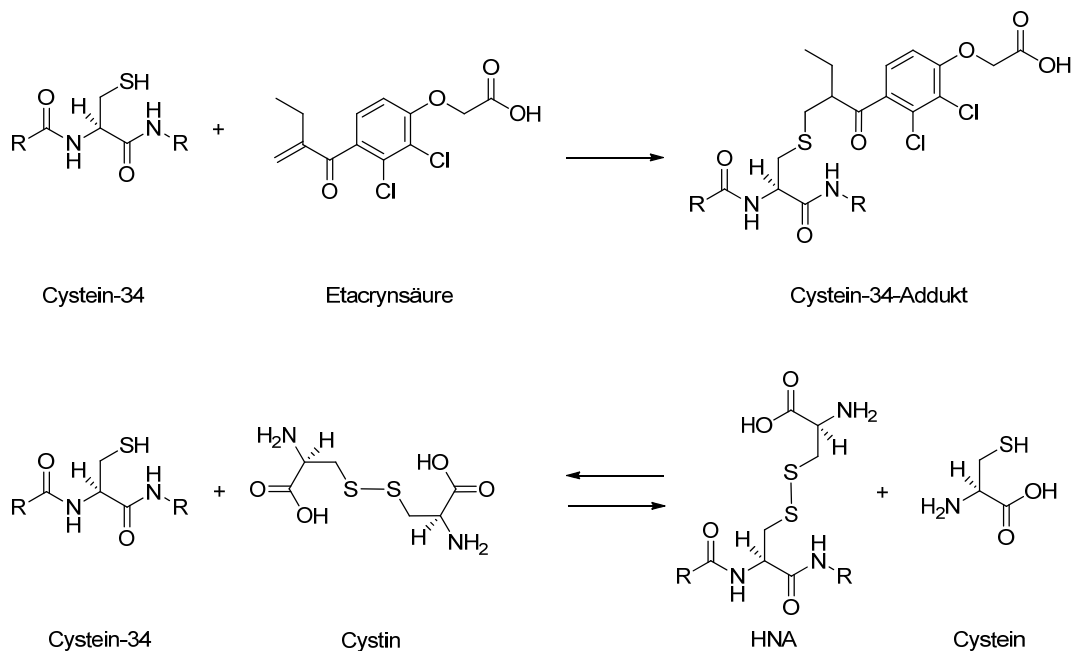


Abb. 39: Cys34 im Mercaptalbumin [HMA], Nonmercaptalbumin [HNA] und oxidiert zu Sulfin- und Sulfonsäure

Oxidations- und Additionsreaktionen an dieser Position können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet werden und beeinflussen die Konformation des Proteins und somit seine Bindungseigenschaften für endogene und exogene Liganden [33, 119-125].

Hierbei haben nicht nur die schon erwähnten Thiolverbindungen eine große Bedeutung, sondern auch hochreaktive Arzneistoffe wie Etacrynsäure [33] oder die Stickstofflost-Verbindungen Melphalan und Chlorambucil [122]. Allerdings unterscheiden diese sich grundlegend in den Mechanismen der Albuminbindung, da sie nukleophil angreifen und irreversible Addukte bilden, während für Thiole und deren Disulfide eine Rückreaktion zum freien Albumin möglich ist [Abb. 40]. Die darüber hinaus noch denkbare Reduktion der Disulfidbrücken des Albumins durch Thiolverbindungen findet

unter physiologischen Bedingungen nicht statt, da die S-S-Bindung aufgrund der Faltung des Proteins sehr stabil sind [14].



**Abb. 40: Reversible und irreversible Bindung von Substanzen an Cys34 des Albumins**

Der Einfluss der Oxidation des Cys34 auf das Bindungsvermögen des Albumins hängt in den in der Literatur beschriebenen Experimenten stark von den verwendeten Reagenzien ab und wurden z.T. unter im Körper nicht vorkommenden Bedingungen durchgeführt [123]. Daher war es Ziel der hier durchgeführten Experimenten Verdrängungen unter Konditionen zu messen, die so physiologisch wie möglich sind.

Hierzu wurde Acetylcystein (ACC) als Bindungspartner für Cys34 gewählt, da dieses breit und unkritisch in der Selbstmedikation angewendet wird und somit eine mögliche Quelle für ein erhöhtes Angebot an Thiolverbindungen im Plasma darstellt. ACC ist in der Lage kovalent über eine Disulfidbrücke an Cys34 zu binden und dadurch die Konformation des Albumins zu verändern. Inwiefern sich diese Konformationsänderung auf die Bindung von Arzneistoffen auswirkt, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

#### 4.1.2.1. Verdrängung durch Acetylcystein

Da Acetylcystein (ACC) kein Chromophor besitzt und somit mittels UV nicht detektiert werden kann, wurde zunächst eine Substanz gesucht, die eine Thiolgruppe und ein Chromophor besitzt, da erst überprüft werden musste, ob unter den Bedingungen der Methode eine Bindung an Cys34 möglich ist.

Die hierfür zunächst verwendete Thiosalicylsäure [Abb. 41] zeigt zwar eine sehr gute Absorption in den für die Messungen erforderlichen Konzentrationen, hatte aber mit ca. 90 % eine deutlich höhere Bindung als das Acetylcystein (ca. 20-50 % [1, 126]).

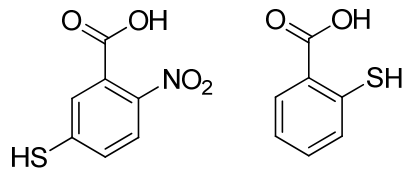


Abb. 41 MNBS (links) Thiosalicylsäure (rechts)

Aus diesem Grund wurde 4-Mercapto-2-nitrobenzoesäure (MNBS) vermessen. Da diese nicht kommerziell erhältlich war, wurde sie durch alkalische Hydrolyse des Ellman-Reagenzes gewonnen [127]. Allerdings zeigte auch diese eine hohe Bindung von ca. 90 %.

Bei beiden Verbindungen handelt es sich um Thiophenole und nicht um aliphatische Mercaptoverbindungen. Die SH-Gruppe beider Moleküle sind daher wesentlich azider als die des Acetylcysteins, wodurch die Bindung über eine Disulfidbrücke unwahrscheinlicher ist, da sie im Puffer teilweise deprotoniert vorliegen. Dies erklärt zwar den Unterschied in der Proteinbindung, hat aber auch zur Folge, dass sich beide Substanzen nicht eignen, um die Tauglichkeit der Methode für das zu untersuchende Problem zu überprüfen.

### **Synthese einer aromatischen Verbindung mit einer aliphatischen Thiolgruppe**

Da eine aliphatische Thiolverbindung mit einem Chromophor kommerziell nicht erhältlich war, wurde ein Nicotinsäureanalogon des Acetylcysteins, das Nicotinylcystein nach der Vorschrift von Drauz und Krimmer synthetisiert [128]. Hierfür wurden Nicotinsäurenitril und L-Cystein zusammen mit Kaliumcarbonat in gleichen Volumenteilen Wasser und Methanol gelöst und für 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit konzentrierter Salzsäure auf pH-Wert 5.0 eingestellt und 45 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen konnte das Produkt als weiße Kristalle abfiltriert werden. Da bei dieser Synthese, die absolute Konfiguration des Cysteinteils erhalten bleibt, ist sie somit identisch mit der des Acetylcysteins [Abb. 42].



Bei der DC-Kontrolle (Kieselgel, Essigsäure / n-Butanol / Wasser, 1:1:2, Detektion: 1. UV bei 254 nm; 2. begasen mit Bromcyan und besprühen mit *p*-Aminobezoesäure) war ein zweiter Fleck mit niedrigerem  $R_f$ -Wert zu erkennen. Dieser war auch nach erneutem Umkristallisieren vorhanden. Deshalb wurde die Substanz massenspektrometrisch (Agilent 1100 LC/MSD Trap SL, direkte Injektion in Methanol 50% gelöst) vermessen. Hierbei stellte sich heraus, dass es sich bei der zweiten Substanz um das Dimer des Produktes handelte. Da dieses sowohl bei einem erneuten Aufreinigungsversuch mittels Säulenchromatographie als auch später bei der Proteinbindungsbestimmung in der Pufferlösung entstand und für die Bestimmung nicht stört [Abb. 40], wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

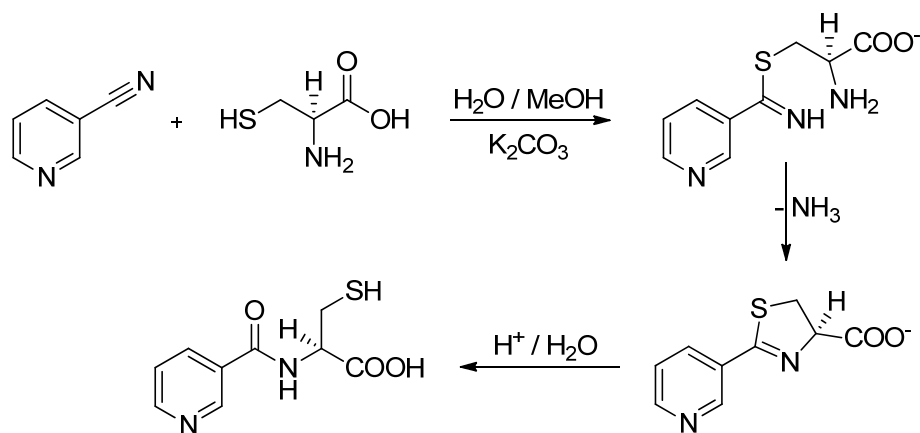
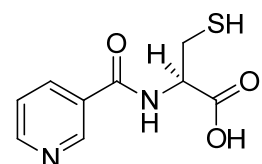


Abb. 42: Synthese des Nicotinsäureamids des Cysteins

## Proteinbindung der Modelsubstanz Nicotinylcystein

<b>Substanz:</b>	<b>Nicotinylcystein</b>
Summenformel:	$C_9H_{10}N_2O_3S$
Molare Masse:	226.3 g/mol
Messwellenlänge:	256 nm
Eingesetzte Konzentration:	20 mg/l
Verwendetes Protein:	Bovines Serumalbumin



Nicotinylcystein

Messungen von Nicotinylcystein:

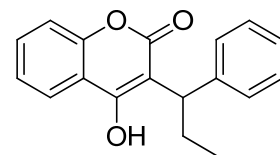
Messung	Unabhängige Bindungsstellen		Abhängige Bindungsstellen	
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>
1	32.35	3.34	26.47	3.21
2	29.50	3.28	18.61	3.02
3	32.32	3.34	26.51	3.22
4	31.23	2.88	28.88	2.83
5	30.13	3.27	29.52	3.19
6	29.68	3.22	25.42	3.12
<b>Mittelwert</b>	<b>30.87</b>	<b>3.22</b>	<b>25.90</b>	<b>3.10</b>
<b>sdv</b>	<b>1.29</b>	<b>0.17</b>	<b>3.90</b>	<b>0.15</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>4.16</b>	<b>5.38</b>	<b>15.06</b>	<b>4.88</b>

Die Substanz zeigte eine Proteinbindung von ca. 31 % und liegt somit im Bereich des Acetylcysteins (Literaturwert 20-50 % [1, 126]). Aufgrund der ähnlichen Bindung und der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Verbindung kann davon ausgegangen werden, dass auch das Acetylcystein unter den gegebenen Bedingungen an das Albumin bindet und somit dessen potenzielle Verdrängung durch dieses gemessen kann.

### Verdrängung von Arzneistoffen durch Acetylcystein

Bei den folgenden Messungen wurde der Puffer mit 13 mg/l Acetylcystein versetzt, dies entspricht der mittleren Plasmakonzentration nach einer einmaligen peroralen Einnahme von 200 mg ACC. Diese Lösung wurde zur Herstellung der Arzneistofflösung, der Proteinlösung und als Spülpuffer verwendet. Alle anderen Parameter blieben unverändert. Die Ergebnisse der folgenden Messungen werden in Kapitel 4.1.3 diskutiert.

**Substanz:** Phenprocoumon  
 Substanzdaten siehe Experiment Imipramin-HCl und Phenprocoumon / Warfarin  
 C<sub>ACC</sub> im Puffer: 120 mg/l  
 Bindung laut Literatur: > 99 % [1]



Phenprocoumon

Messungen von Phenprocoumon in Anwesenheit von Acetylcystein (13 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	99.70	5.75	---	99.52	5.54	---
2	99.45	5.38	3.99	99.38	5.43	---
3	98.65	5.09	---	98.53	5.05	---
<b>Mittelwert</b>	<b>99.27</b>	<b>5.41</b>	<b>---</b>	<b>99.14</b>	<b>5.34</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.55</b>	<b>0.33</b>	<b>---</b>	<b>0.54</b>	<b>0.26</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.55</b>	<b>6.12</b>	<b>---</b>	<b>0.54</b>	<b>4.81</b>	<b>---</b>

**Substanz:**

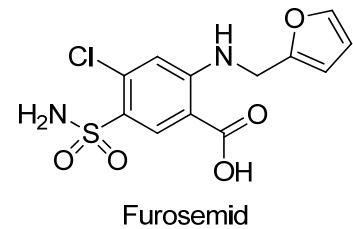
**Furosemid**

Substanzdaten siehe Experiment Ambroxol-HCl und

Furosemid

C<sub>ACC</sub> im Puffer: 120 mg/l

Bindung laut Literatur: ~ 98 % [1]



Messungen von Furosemid in Anwesenheit von Acetylcystein (13 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	99.12	5.25	4.00	99.03	5.23	4.23
2	98.74	5.01	4.45	98.67	5.03	4.37
3	97.38	4.76	3.61	97.13	4.75	3.87
<b>Mittelwert</b>	<b>98.41</b>	<b>5.01</b>	<b>4.02</b>	<b>98.28</b>	<b>5.00</b>	<b>4.16</b>
<b>sdv</b>	<b>0.91</b>	<b>0.25</b>	<b>0.42</b>	<b>1.01</b>	<b>0.24</b>	<b>0.26</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.93</b>	<b>4.89</b>	<b>10.46</b>	<b>1.03</b>	<b>4.82</b>	<b>6.21</b>

**Substanz:**

**Diclofenac-Na**

Summenformel:

C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>NNaO<sub>2</sub>

Molare Masse:

318.1 g/mol

Messwellenlänge:

274 nm

Eingesetzte Konzentration:

20 mg/l

Verwendetes Protein:

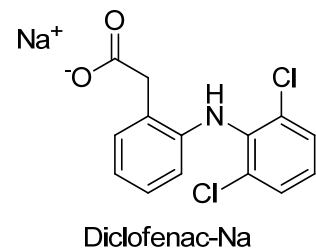
Bovines Serumalbumin

Bindung laut Literatur:

> 99 % [1]

C<sub>ACC</sub> im Puffer:

120 mg/l



Messungen von Diclofenac-Na in Anwesenheit von Acetylcystein (13 mg/ml):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	100.00	8.42	8.25	99.99	8.42	8.24
2	99.98	7.93	7.75	99.98	6.25	---
3	100.00	8.66	7.25	99.99	8.63	7.27
4	100.00	8.68	---	100.00	8.75	4.85
5	99.99	8.35	---	99.98	8.36	8.18
<b>Mittelwert</b>	<b>99.99</b>	<b>8.41</b>	<b>7.75</b>	<b>99.99</b>	<b>8.08</b>	<b>7.14</b>
<b>sdv</b>	<b>0.01</b>	<b>0.30</b>	<b>0.50</b>	<b>0.01</b>	<b>1.04</b>	<b>1.59</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.01</b>	<b>3.61</b>	<b>6.45</b>	<b>0.01</b>	<b>12.82</b>	<b>22.24</b>

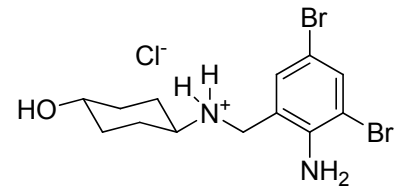
**Substanz:** Ambroxol-HCl

Substanzdaten siehe Experiment Ambroxol-HCl und

Furosemid

C<sub>ACC</sub> im Puffer: 120 mg/l

Bindung laut Literatur: ~ 90 % [1]



Ambroxol-HCl

Messungen von Ambroxol-HCl in Anwesenheit von Acetylcystein (13 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	80.95	3.85	---	76.71	3.74	---
2	83.39	3.92		76.31	3.73	---
3	70.99	3.41	3.17	69.58	3.58	---
4	77.60	3.76	---	61.29	3.42	---
5	79.05	3.80	---	75.11	3.70	---
6	68.05	3.33	3.15	61.89	3.43	3.25
7	72.70	3.50	3.10	67.41	3.53	3.36
<b>Mittelwert</b>	<b>76.10</b>	<b>3.65</b>	<b>3.14</b>	<b>69.76</b>	<b>3.59</b>	<b>3.31</b>
<b>sdv</b>	<b>5.63</b>	<b>0.23</b>	<b>0.04</b>	<b>6.57</b>	<b>0.14</b>	<b>0.08</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>7.40</b>	<b>6.42</b>	<b>1.15</b>	<b>9.42</b>	<b>3.81</b>	<b>2.35</b>

Messungen von Ambroxol-HCl:

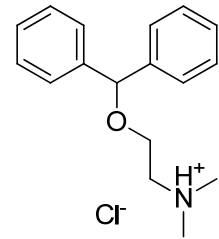
Siehe Experiment Ambroxol-HCl und Furosemid

**Substanz: Diphenhydramin-HCl**

Substanzdaten siehe Experiment Diphenhydramin-HCl und Salicylsäure

C<sub>ACC</sub> im Puffer: 120 mg/l

Bindung laut Literatur: 70-85 % [111]



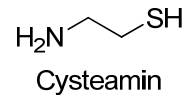
Diphenhydramin-HCl

Messungen von Diphenhydramin-HCl in Anwesenheit von Acetylcystein (13 mg/l):

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	61.71	3.24	2.97	54.75	3.30	3.00
2	58.94	3.29	2.66	51.95	3.26	2.70
3	57.59	3.13	2.96	53.45	3.16	2.99
4	51.89	3.09	2.75	57.40	3.35	---
5	61.04	3.41	---	45.43	3.14	---
6	46.49	3.12	2.07	46.99	3.17	---
<b>Mittelwert</b>	<b>56.28</b>	<b>3.21</b>	<b>2.68</b>	<b>51.66</b>	<b>3.23</b>	<b>2.90</b>
<b>sdv</b>	<b>5.93</b>	<b>0.12</b>	<b>0.37</b>	<b>4.61</b>	<b>0.09</b>	<b>0.17</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>10.54</b>	<b>3.85</b>	<b>13.70</b>	<b>8.93</b>	<b>2.66</b>	<b>5.88</b>

Messungen von Diphenhydramin-HCl in Anwesenheit von Cysteamin:

Bei den folgenden Messungen wurde der Puffer mit 6.1 mg/l Cysteamin versetzt, was der gleichen Stoffmenge Acetylcystein in den vorausgegangenen Versuchen entspricht. Der restliche Versuch wurde wie oben für das Acetylcystein beschrieben durchgeführt.

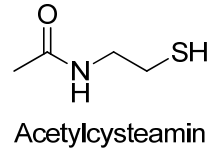


Cysteamin

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	52.93	3.26	---	47.63	3.18	---
2	58.88	3.07	---	59.19	3.06	---
3	65.75	3.47	2.45	61.41	3.42	2.49
4	58.30	3.37	---	53.03	3.27	---
5	69.39	3.79	3.35	65.56	3.78	3.29
<b>Mittelwert</b>	<b>61.05</b>	<b>3.39</b>	<b>2.90</b>	<b>57.36</b>	<b>3.34</b>	<b>2.89</b>
<b>sdv</b>	<b>6.52</b>	<b>0.27</b>	<b>0.64</b>	<b>7.08</b>	<b>0.28</b>	<b>0.57</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>10.67</b>	<b>7.88</b>	<b>21.94</b>	<b>12.34</b>	<b>8.31</b>	<b>19.57</b>

Messungen von Diphenhydramin-HCl in Anwesenheit von Acetylcysteamin:

Bei den folgenden Messungen wurde der Puffer mit 9.5 mg/l Acetylcysteamin versetzt, was der gleichen Stoffmenge Acetylcystein und Cysteamin in den vorausgegangenen Versuchen entspricht. Der restliche Versuch wurde wie oben für das Acetylcystein beschrieben durchgeführt.



Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	93.65	4.37	3.01	91.74	4.27	3.05
2	95.08	4.50	3.09	95.17	4.51	3.10
3	88.68	4.00	3.49	85.21	3.98	3.45
4	97.20	4.73	3.57	96.85	4.71	3.54
5	83.47	4.15	---	86.55	4.03	---
<b>Mittelwert</b>	<b>91.62</b>	<b>4.35</b>	<b>3.29</b>	<b>91.10</b>	<b>4.30</b>	<b>3.29</b>
<b>sdv</b>	<b>5.53</b>	<b>0.29</b>	<b>0.28</b>	<b>5.13</b>	<b>0.31</b>	<b>0.25</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>6.04</b>	<b>6.60</b>	<b>8.54</b>	<b>5.64</b>	<b>7.25</b>	<b>7.49</b>

Einzelmessungen:

Siehe Experiment Diphenhydramin-HCl und Salicylsäure.

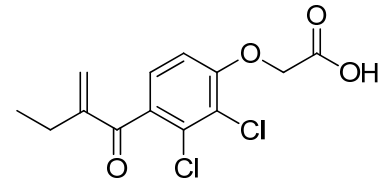
**4.1.2.2. Verdrängung von Dipyridamol durch Etacrynsäure**

Für die Messungen mit Etacrynsäure als kovalent an Albumin bindender Arzneistoff musste die Versuchsdurchführung modifiziert werden. Die Substanz bindet sowohl kovalent als auch nichtkovalent an das Protein [33, 40]. Da in diesem Experiment nur der Effekt der kovalenten Bindung untersucht werden sollte, wurde nachfolgend beschriebene Methode verwendet.

Das Albumin wurde zunächst für zwei Stunden mit einer Pufferlösung inkubiert, die 1 mg/ml Etacrynsäure enthielt. Das Verhältnis von Etacrynsäure zu Albumin betrug hierbei ca. 10:1. Anschließend wurde diese Proteinlösung wie immer im 3. Versuchsschritt injiziert und so lange mit Puffer ultrafiltriert, bis die Absorption wieder bei null war. Die restlichen Versuchsschritte wurden unverändert durchgeführt.

**Substanz:** Etacrynsäure

Substanzdaten siehe Experiment Dipyrindamol und Piroxicam



Etacrynsäure

Messungen von Etacrynsäure:

Unabhängige Bindungsstellen					
Messung	Proteinbindung [%]	pK1	pK2	pK3	pK4
1	97.90	4.59	4.27	4.10	3.91
2	99.01	5.10	4.44	4.26	4.09
3	98.49	4.79	4.35	4.17	4.00
<b>Mittelwert</b>	<b>98.47</b>	<b>4.83</b>	<b>4.35</b>	<b>4.18</b>	<b>4.00</b>
<b>sdv</b>	<b>0.56</b>	<b>0.26</b>	<b>0.09</b>	<b>0.08</b>	<b>0.09</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.56</b>	<b>5.32</b>	<b>1.95</b>	<b>1.92</b>	<b>2.25</b>

Abhängige Bindungsstellen					
Messung	Proteinbindung [%]	pK1	pK2	pK3	pK4
1	98.53	5.05	4.25	4.08	3.90
2	99.11	5.27	4.29	4.12	3.94
3	98.98	5.21	4.35	4.17	4.00
<b>Mittelwert</b>	<b>98.87</b>	<b>5.18</b>	<b>4.30</b>	<b>4.12</b>	<b>3.95</b>
<b>sdv</b>	<b>0.30</b>	<b>0.11</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.31</b>	<b>2.20</b>	<b>1.17</b>	<b>1.09</b>	<b>1.28</b>

**Substanz:**

**Dipyrindamol**

Summenformel:

$C_{24}H_{40}N_8O_4$

Molare Masse:

504.6 g/mol

Messwellenlänge:

417 nm

Eingesetzte Konzentration:

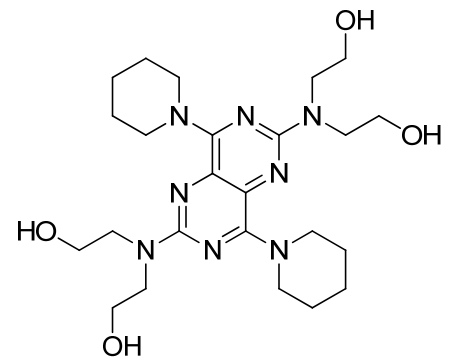
20 mg/l

Verwendetes Protein:

Humanes Serumalbumin

Bindung laut Literatur:

~ 99 % [1]



Dipyrindamol

Messungen in Anwesenheit von Etacrynsäure:

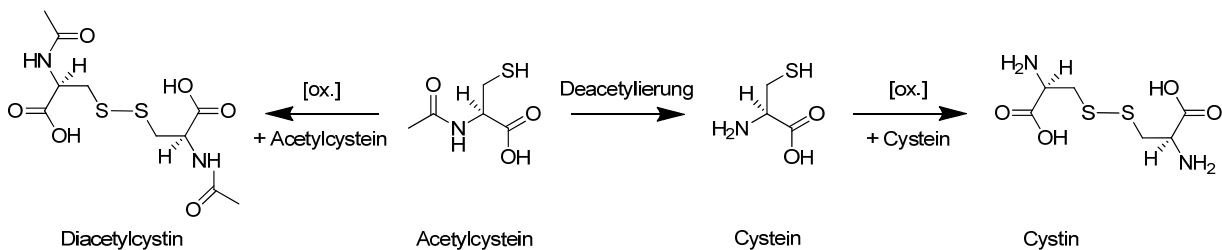
Messung	Unabhängige Bindungsstellen					Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	99.99	7.23	7.06	6.88	93.84	4.40	---	---
2	99.99	7.47	7.29	7.11	99.13	5.28	---	---
3	99.99	7.34	7.17	6.99	96.42	4.65	---	---
4	99.99	7.48	7.30	7.12	99.92	6.31	---	---
<b>Mittelwert</b>	<b>99.99</b>	<b>7.38</b>	<b>7.21</b>	<b>7.03</b>	<b>97.33</b>	<b>5.16</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.00</b>	<b>0.12</b>	<b>0.11</b>	<b>0.11</b>	<b>2.77</b>	<b>0.85</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.00</b>	<b>1.61</b>	<b>1.57</b>	<b>1.61</b>	<b>2.84</b>	<b>16.50</b>	<b>---</b>	<b>---</b>

Einzelmessungen:

Siehe Experiment Dipyridamol und Piroxicam.

**4.1.3. Diskussion**

Für die Konzentration des Acetylcysteins im Puffer wurde 13 mg/ml gewählt. Dies entspricht der errechneten maximalen Plasmakonzentration bei einmaliger Gabe von 200 mg ACC [126]. Hierbei wurde der First-Pass-Effekt der Substanz nicht berücksichtigt, da hierbei nur Metabolite entstehen, die ebenfalls die für die Bindung benötigte Mercapto- bzw. Disulfid-Funktion enthalten [Abb. 1]. Demzufolge kann davon ausgegangen werden kann, dass ihre Reaktivität ähnlich ist.



**Abb. 43: Acetylcystein und seine First-Pass-Metabolite**

Die Sudlow-I-Bindetasche, die in der Subdomäne IIA des Albumins lokalisiert ist, sollte durch die Bindung von Acetylcystein an das Cys34 nicht beeinflusst werden, da dieses in der Subdomäne IA liegt [33, 125]. Folgerichtig wurde das Ausmaß der Proteinbindung der Sudlow-I-Liganden Furosemid und Phenprocoumon durch ACC nicht beeinflusst.

Die Bindestelle des ebenfalls sauren Arzneistoffes Diclofenac-Na ist nicht bekannt. Da auch hier keine Änderung der Proteinbindung festgestellt werden konnte und aufgrund der Struktur des Diclofenacs liegt allerdings nahe, dass es ein Sudlow-I-Ligand ist.

Da sich bei den Verdrängungsexperimenten in Kapitel 4.1.1 gezeigt hatte, dass die Stoffe Ambroxol-HCl und Diphenhydramin-HCl durch saure Stoffe eine Erniedrigung der Proteinbindung um ca. 10 % erfuhren, wurden die Stoffe ebenfalls in Gegenwart von Acetylcystein vermessen. Bei beiden wurde eine Reduktion ihrer Bindung an das Albumin beobachtet [Abb. 44]. Der Effekt war bei Diphenhydramin-HCl stärker ausgeprägt war als bei Ambroxol-HCl.



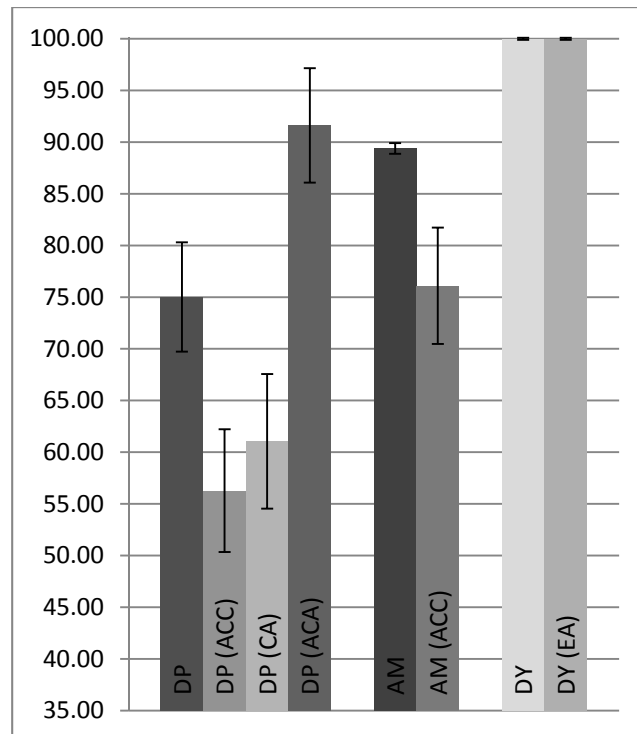


Abb. 44: Proteinbindungen der kationischen Arzneistoffe in der Einzelmessung und im Verdrängungsexperiment; Verdrängungspartner in Klammern. (ACA: Acetylcysteamin, ACC: Acetylcystein, AM: Ambroxol-HCl, CA: Cysteamin, DP: Diphenhydramin-HCl, DY: Dipyridamol, EA: Etacrynsäure)

Wie in dem Übersichtsartikel von Oettl und Stauber [123] erwähnt, hängt die Änderung der Affinität der Liganden zu HNA stark vom benutzten Oxidations- bzw. Modifikationsreagenz und den Reaktionsbedingungen ab. Um zu überprüfen, ob die Säurefunktion des ACCs für die Verminderung der Proteinbindung der Liganden Ambroxol-HCl und Diphenhydramin-HCl verantwortlich ist, wurden die carboxylfreien Derivate des Acetylcysteins, Cysteamin und Acetylcysteamin, verwendet [Abb. 45]. Sie sind in der Lage an Position 34 des Proteins zu binden, d.h. eine Reduktion der Affinität des Diphenhydramin-HCl an Albumin wäre allein durch die Oxidation zum Disulfid zu erklären.

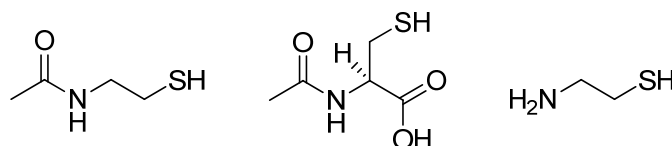
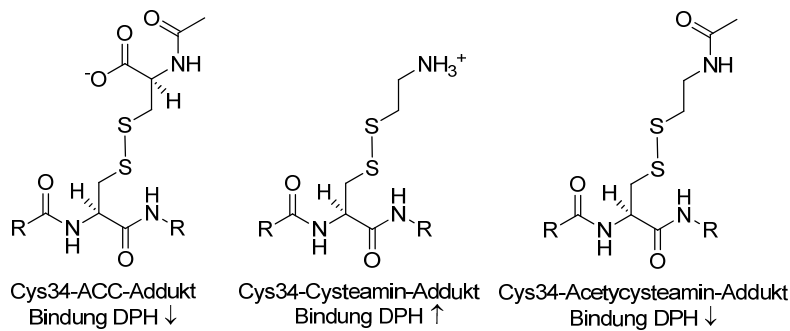


Abb. 45: Acetylcysteamin (links), Acetylcystein (Mitte) und Cysteamin (rechts)

Cysteamin hat auf die Proteinbindung des Diphenhydramin-HCl den gleichen Effekt wie Acetylcystein, d.h. beide vermindern die Diphenhydramin-Bindung um 15-20 %. Acetylcysteamin hingegen erhöht die Affinität des Liganden Diphenhydramin-HCl zum Protein um 17 %. Dieser entgegengesetzte Effekt weist darauf hin, dass die bei ACC und Cysteamin beobachtete Verdrängung, nicht allein auf einer rein sterischen Blo-

ckade einer Bindungsstelle beruht. Vielmehr ist es so, dass die Addukte des Cys34 mit ACC und Cysteamin geladen sind (Cys34-Acetylcystein-Addukt = negativ, Cys34-Cysteamin-Addukt = positiv), während das Cys34-Acetylcysteamin-Addukt neutral ist [Abb. 46], was offensichtlich zu einer besseren Wechselwirkung des Diphenhydramin-HCl's mit dem oxidierten Albumin und damit zu einer höheren Proteinbindung führt; bei den geladenen Addukten kommt es wohl eher zu einer „Abstoßung“ des Diphenhydramin-HCl's. Alle drei Ergebnisse belegen, dass die Diphenhydramin-Bindestelle in der Nähe des Cys34 liegt, welches in der Subdomäne IA liegt, und Diphenhydramin somit nicht an Sudlow-I oder Sudow-II, sondern an eine weitere kationische Bindestelle bindet, wie bereits in Kapitel 4.1.1.4 angenommen wurde.



**Abb. 46: Addukte von ACC, Cysteamin und Acetylcysteamin mit Cys34 bei pH 7.4 (DPH: Diphenhydramin-HCl, ↓: Proteinbindung erniedrigt, ↑: Proteinbindung erhöht)**

Die Experimente mit Acetylcystein und seinen Derivaten Cysteamin und Acetylcysteamin zeigen, dass strukturell sehr ähnlich Bindungspartner zu unterschiedlichen Änderungen der Bindungseigenschaften des Albumins führen können und dass somit Vorhersagen über die Änderungen der Proteinbindung schwierig sind.

Abschließend sei noch der Einfluss von Etacrynsäure auf die Albuminbindung des diskutiert. Etacrynsäure bindet sowohl kovalent an Cys34, als auch nicht-kovalent an Albumin [40]. Beide Bindungsarten haben Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Albumins, wobei diese sowohl kooperative, als auch antikooperative Effekte zeigen können [33, 40].

Bei der Versuchsdurchführung wurde mit Etacrynsäure gesättigtes Albumin verwendet. Da hierbei die Basislinie bei der Messwellenlänge des Diphenhydramin-HCl's für eine sinnvolle Messung zu instabil war, wurde für diesen Versuch Dipyrindamol als Bindungspartner gewählt. Diese Instabilität beruht womöglich darauf, dass die für die Ultrafiltration zur Verfügung stehende Zeit während des Versuches nicht ausreichend war, um den nicht-kovalent gebundenen Anteil der Etacrynsäure vollständig aus der Proteinlösung zu entfernen und somit weiterhin eluierende Etacrynsäure die Messung

störte. Da Dipyridamol ein höheres Absorptionsmaximum als Diphenhydramin-HCl und Etacrynsäure hat, konnte dieses störungsfrei gemessen werden. Es konnte keine Verdrängung des Dipyridamols aus der Bindung festgestellt werden [Abb. 44].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verwendete Methode an sich gut für solche Messungen geeignet ist, da nach Inkubation mit einer kovalent an das Albumin bindenden Substanz dieses ohne weiteren Aufreinigungsschritte in der Messanlage injiziert werden kann. Das Protein wird im anschließenden Spülschritt mit Puffer während der Messung von den ungebundenen Anteilen befreit wird und der Versuch kann ohne Unterbrechung fortgesetzt werden.

## 4.2. Proteinbindung der Ephedra-Alkaloide

### 4.2.1. Allgemeines

Die Pflanzen der Gattung Meerträubel (Ephedra) enthalten eine Reihe von indirekt sympathomimetischen Phenylethylaminen, von denen Ephedrin und Pseudoephedrin die Bedeutendsten sind. Beide Substanzen unterscheiden sich lediglich in ihrer Stereochemie: Sie sind diastereomer zueinander. In der Natur kommen (-)-Ephedrin und (+)-Pseudoephedrin in wesentlich größeren Mengen vor als ihre jeweiligen Enantiomere [Abb. 47] [129].

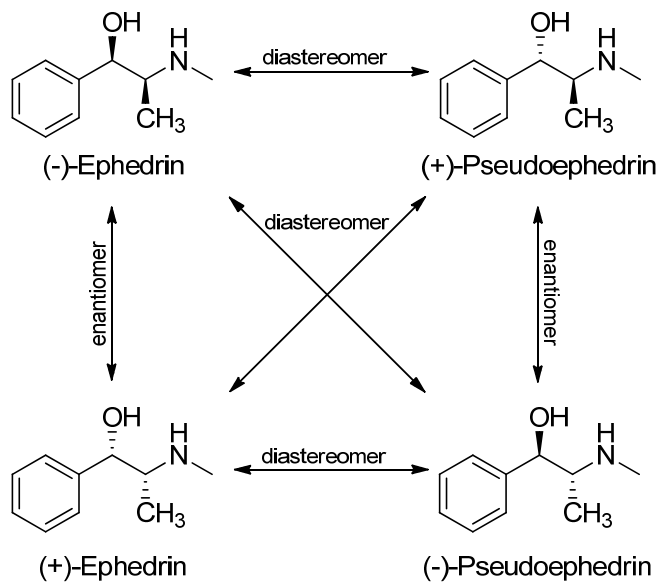


Abb. 47: Übersicht der Ephedraalkaloide und ihre stereochemische Beziehung zueinander

Ye et al. konnten zeigen, dass sich (-)-Ephedrin und (+)-Pseudoephedrin mit Hilfe von bovinem Serumalbumin kapillarelektrophoretisch trennen lassen [130]. Daher liegt der Schluss nahe, dass diese Verbindungen eine unterschiedliche Proteinbindung haben. Da alle vier Stereoisomere sowie die Racemate zur Verfügung standen und bisher das Ausmaß der Proteinbindung nicht bekannt ist, wurde im Folgenden untersucht, ob und wie groß die Unterschiede sind.

## 4.2.2. Ephedrin

**Substanz:** (1*R*,2*S*)-(-)-Ephedrin

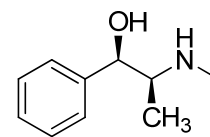
Summenformel: C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO

Molare Masse: 165.23 g/mol

Messwellenlänge: 256 nm

Eingesetzte Konzentration: 400 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin

(1*R*,2*S*)-(-)-EphedrinMessungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				Abhängige Bindungsstellen			
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	22.85	2.37	2.19	2.02	14.33	2.45	2.27	2.09
2	17.73	2.56	---	---	10.41	2.29	2.11	---
3	29.19	2.84	---	---	10.42	2.29	---	---
<b>Mittelwert</b>	<b>23.26</b>	<b>2.59</b>	---	---	<b>11.72</b>	<b>2.34</b>	<b>2.19</b>	---
<b>sdv</b>	<b>5.74</b>	<b>0.24</b>	---	---	<b>2.26</b>	<b>0.09</b>	<b>0.11</b>	---
<b>rel sdv [%]</b>	<b>24.68</b>	<b>9.13</b>	---	---	<b>19.29</b>	<b>3.94</b>	<b>5.17</b>	---

**Substanz:** (1*S*,2*R*)-(+)-Ephedrin

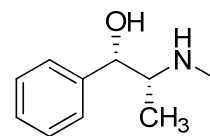
Summenformel: C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO

Molare Masse: 165.23 g/mol

Messwellenlänge: 256 nm

Eingesetzte Konzentration: 400 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin

(1*S*,2*R*)-(+)-EphedrinMessungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				Abhängige Bindungsstellen			
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	96.05	4.43	4.14	---	99.47	5.50	3.08	2.86
2	96.73	4.68	3.07	2.90	97.06	4.74	3.01	2.84
3	98.01	4.90	3.21	3.04	98.70	5.10	3.21	3.03
<b>Mittelwert</b>	<b>96.93</b>	<b>4.67</b>	<b>3.47</b>	<b>2.97</b>	<b>98.41</b>	<b>5.11</b>	<b>3.10</b>	<b>2.91</b>
<b>sdv</b>	<b>1.00</b>	<b>0.24</b>	<b>0.58</b>	<b>0.10</b>	<b>1.23</b>	<b>0.38</b>	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>1.03</b>	<b>5.04</b>	<b>16.74</b>	<b>3.33</b>	<b>1.25</b>	<b>7.43</b>	<b>3.27</b>	<b>3.59</b>

**Substanz:** Racemisches Ephedrin

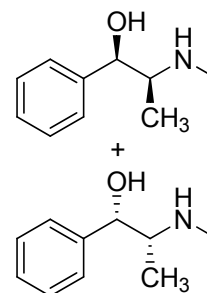
Summenformel:  $C_{10}H_{15}NO$

Molare Masse: 165.23 g/mol

Messwellenlänge: 256 nm

Eingesetzte Konzentration: 400 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin



Racemisches Ephedrin

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				Abhängige Bindungsstellen			
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	93.79	4.38	2.88	2.71	93.73	4.40	2.81	2.64
2	93.02	4.34	2.36	2.19	91.34	4.25	2.45	2.28
3	56.25	3.11	2.93	---	62.69	3.45	3.16	---
4	21.67	2.45	2.25	---	14.37	2.45	2.27	---
5	30.97	2.65	2.48	---	25.38	2.75	2.58	---
6	32.56	2.58	2.41	2.23	12.09	2.36	2.18	2.01
7	43.40	2.88	2.71	---	35.97	2.97	2.80	2.62
8	99.99	6.97	6.79	---	99.98	7.03	---	---
Mittelwert	58.96*	3.67	3.10	2.38	54.44*	3.71	2.61	2.39
sdv	32.02	1.54	1.51	0.29	37.09	1.55	0.34	0.30
rel sdv [%]	54.31	41.83	48.71	12.18	68.13	41.72	13.15	12.61

\* es liegen nur vorläufige Werte vor, da die Substanz im Moment aufgrund der hohen Streuung weiter untersucht wird

### 4.2.3. Pseudoephedrin

**Substanz:** (1S,2S)-(+)-Pseudoephedrin

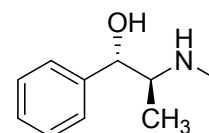
Summenformel:  $C_{10}H_{15}NO$

Molare Masse: 165.23 g/mol

Messwellenlänge: 256 nm

Eingesetzte Konzentration: 400 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin



(1S,2S)-(+)-Pseudoephedrin

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				Abhängige Bindungsstellen			
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	60.08	3.32	2.55	1.71	60.33	3.40	2.47	1.85
2	54.25	3.23	2.45	---	55.00	3.31	2.22	2.04
3	66.30	3.38	2.72	2.54	60.00	3.40	2.97	---
Mittelwert	60.21	3.31	2.57	2.13	58.44	3.37	2.55	1.95
sdv	6.03	0.08	0.14	0.59	2.99	0.05	0.38	0.13
rel sdv [%]	10.01	2.28	5.30	27.62	5.11	1.54	14.96	6.91

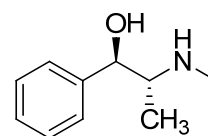
**Substanz:** (1*R*,2*R*)-(-)-PseudoephedrinSummenformel: C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO

Molare Masse: 165.23 g/mol

Messwellenlänge: 256 nm

Eingesetzte Konzentration: 400 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin

(1*R*,2*R*)-(+)-PseudoephedrinMessungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				Abhängige Bindungsstellen			
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	94.71	4.42	3.36	2.93	99.52	5.54	3.14	2.96
2	86.25	3.96	2.93	2.75	83.82	3.94	2.89	2.72
3	92.59	4.16	3.71	2.69	94.42	4.45	3.32	3.15
<b>Mittelwert</b>	<b>91.18</b>	<b>4.18</b>	<b>3.33</b>	<b>2.79</b>	<b>92.59</b>	<b>4.64</b>	<b>3.12</b>	<b>2.94</b>
<b>sdv</b>	<b>4.40</b>	<b>0.23</b>	<b>0.39</b>	<b>0.12</b>	<b>8.01</b>	<b>0.82</b>	<b>0.22</b>	<b>0.22</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>4.83</b>	<b>5.52</b>	<b>11.72</b>	<b>4.48</b>	<b>8.65</b>	<b>17.60</b>	<b>6.93</b>	<b>7.32</b>

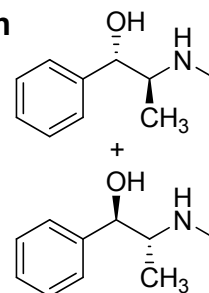
**Substanz:** Racemisches PseudoephedrinSummenformel: C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO

Molare Masse: 165.23 g/mol

Messwellenlänge: 256 nm

Eingesetzte Konzentration: 400 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin



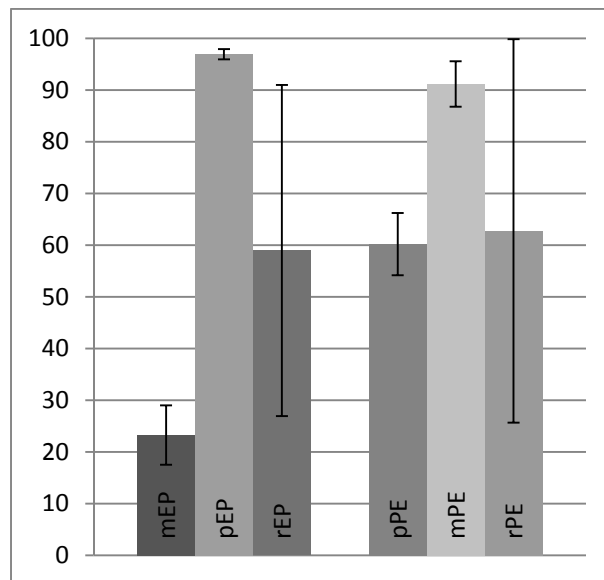
Racemisches Pseudoephedrin

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen				Abhängige Bindungsstellen			
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	21.95	2.45	2.27	---	17.04	2.53	2.36	2.18
2	97.35	4.79	1.65	---	92.42	4.31	2.15	---
3	68.98	3.49	2.56	2.38	73.05	3.66	2.50	2.33
<b>Mittelwert</b>	<b>62.76</b>	<b>3.58</b>	<b>2.16</b>	<b>---</b>	<b>60.84</b>	<b>3.50</b>	<b>2.34</b>	<b>2.26</b>
<b>sdv</b>	<b>38.08</b>	<b>1.17</b>	<b>0.46</b>	<b>---</b>	<b>39.15</b>	<b>0.90</b>	<b>0.18</b>	<b>0.11</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>60.68</b>	<b>32.78</b>	<b>21.52</b>	<b>---</b>	<b>64.35</b>	<b>25.73</b>	<b>7.54</b>	<b>4.70</b>

#### 4.2.4. Diskussion

In der Arbeit von Ye et al. konnte eine kapillarelektrophoretische Trennung von (-)-Ephedrin und (+)-Pseudoephedrin bei pH 9.0 in Gegenwart von bovinem Serumalbumin in einer unbeschichteten Quarzkapillare erreicht werden. Hierbei migrierte (+)-Pseudoephedrin in Anwesenheit des Albumins schneller als (-)-Ephedrin [130]. Da beide Substanzen den gleichen  $pK_S$ -Wert von 9.63 [112] und die gleiche Masse besitzen, sollte als Trennparameter nur die Affinität zum Protein eine Rolle spielen. Beide Substanzen liegen unter den genannten Bedingungen zu ca. 80 % kationisch vor und migrieren somit schneller als Albumin, welches bei pH 9.0 eine negative Nettoladung aufweist [14]. Somit wird die Substanz, die eine höhere Affinität zu Albumin aufweist, verlangsamt.



**Abb. 48: Proteinbindung der Ephedraalkaloide (mEP: (-)-Ephedrin, pEP: (+)-Ephedrin, rEP: racemisches Ephedrin, pPE: (+)-Pseudoephedrin, mPE: (-)-Pseudoephedrin, rPE: racemisches Pseudoephedrin)**

Daraus folgt, dass (-)-Ephedrin die höhere Proteinbindung haben sollte. Dies konnte im Experiment nicht bestätigt werden. (-)-Ephedrin zeigte mit 23 % einen deutlich geringeren Wert als (+)-Pseudoephedrin mit 60 % Bindung [Abb. 48]. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Bindungsaffinität zu Albumin sehr stark von vorliegenden pH-Wert abhängig ist [110]. Während die kapillarelektrophoretische Messung bei pH 9.0 erfolgte, wurde die Ultrafiltration bei dem physiologischen pH-Wert 7.4 durchgeführt. Dies hat einen starken Einfluss auf den Protonierungsgrad des Albumins und der Ephedrinstereoisomere. Ephedrin und Pseudoephedrin liegen bei pH 7.4 zu über 99 % in der protonierten Form vor, bei pH 9.0 nur zu ca. 81 %. Betrachtet man die Aminosäu-



ren des Albumins tritt hier auch eine deutliche Änderung ihres Protonierungsgrads auf. Dadurch sinkt die rechnerische Nettoladung des Proteins von -16 auf -20 [Tab. 6]. Da ionische Wechselwirkungen der einzelnen Aminosäuren sowohl Auswirkung auf die Faltung des Proteins, als auch auf ionische Wechselwirkungen mit Liganden hat, unterscheiden sich die Bindungsverhältnisse bei beiden pH-Werten deutlich voneinander und somit auch die Proteinbindung.

Aminosäuren	Anzahl	pKa	Seitenkette	Geladener Anteil bei pH 7.4	Ladung * Anzahl	Geladener Anteil bei pH 9.0	Ladung * Anzahl
Arginin	23	13.2	basisch	1.00	23.0	1.00	23.0
Histidin	17	6.05	basisch	0.04	0.7	0.00	0.0
Lysin	59	10.8	basisch	1.00	59.0	0.98	58.1
N-Terminus	1	8.8	basisch	0.96	1.0	0.39	0.4
Asparaginsäure	40	3.9	sauer	1.00	-40.0	1.00	-40.0
Cystein	1*	10.3	sauer	0.00	0.0	0.04	0.0
Glutaminsäure	59	4.32	sauer	1.00	-59.0	1.00	-59.0
Tyrosin	20	10.1	sauer	0.00	0.0	0.08	-1.6
C-Terminus	1	2.33	sauer	1.00	-1.0	1.00	-1.0
<b>Nettoladung des Albumins bei</b>				<b>pH 7.4</b>	<b>-16.3</b>	<b>pH 9.0</b>	<b>-20.1</b>

Tab. 6: Ladung der sauren und Basischen Aminosäuren des BSAs bei pH 7.4 und 9.0 (\* nur die SH-Gruppe des Cys34 liegt frei vor, die restlichen 34 Cysteine sind in Disulfidbrücken gebunden)

Weitere Arbeiten zu diesem Thema von Huang et al. [131], Yang et al. [132] und Till et al [133] zeigten ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse. Huang et al. bestimmten mittels UV- und Fluoreszenzspektroskopie fast gleich große Bindungskonstanten für Pseudoephedrin ( $pK = 4.3$ ) und für Ephedrin ( $pK = 4.4$ ). Allerdings waren diese Bindungskonstanten deutlich verschieden von den hier bestimmten (Pseudoephedrin:  $pK = 3.3$ ; Ephedrin:  $pK = 2.6$ ), was in der Verwendung von humanem Serumalbumin für die Versuche von Huang et al. begründet sein könnte.

Yang et al. untersuchte die Wechselwirkung zwischen Ephedrin und bovinem Serumalbumin mittels Mikrodialyse. Die von ihnen bestimmte Bindungskonstante ( $pK = 4.2$ ) weicht ebenfalls von der hier bestimmten ab, allerdings wurde bei dieser Untersuchung ein 1000-facher Überschuss Ephedrin zu dem Protein gegeben. Dies ist unter physiologischen Bedingungen nie der Fall, da bei Gabe therapeutischer Dosen Albumin im Überschuss vorliegt. Des Weiteren wurde von Yang et al. ebenfalls nicht bei dem physiologischen pH-Wert von 7.4 sondern bei pH 8.0 gemessen, was ebenfalls die Abweichung erklärt.

Till et al. bestimmten die Proteinbindung von Pseudoephedrin mittels Ultrazentrifugation. Sie verwendeten humanes Plasma für die Untersuchung und setzten Pseudoephedrin in Konzentrationen von 0.2-1.8 µg/ml ein, wodurch die Plasmaproteine im Überschuss vorhanden sind. Die Proteinbindung des Pseudoephedrins wurde unter diesen Bedingungen zu 20 (+/- 7.3) % bestimmt. Dieser Wert stimmt ebenfalls nicht mit den 60 % Bindung, die mittels Ultrafiltration bestimmt wurden, überein. Dies könnte in der Verwendung von Plasma begründet liegen, da in diesem endogene Liganden des Albumins wie Fettsäuren vorhanden sind, die die Plasmaproteinbindung beeinflussen können [46, 47]. Die Bindungskonstante wurde von Till et al. nicht angegeben, wodurch ein Vergleich mit den Ergebnissen der anderen Arbeiten schwierig ist. Da für Pseudoephedrin von Till et al. eine ähnlich prozentuale Bindung wie für das (-)-Ephedrin im Ultrafiltrationsexperiment bestimmt wurde und die Bindungskonstante für das Ephedrin hier bei  $pK = 2.6$  lag, ist zu erwarten, dass die Bindungskonstante bei Till et al. in einem ähnlichen Bereich lag. Dieser Wert unterscheidet sich wiederum deutlich von dem von Huang et al. bestimmten Wert ( $pK = 4.3$ ).

Die Enantiomeren (+)-Ephedrin und (-)-Pseudoephedrin weisen beide ein sehr hohe Bindung über 90 % auf. Vergleichswerte aus der Literatur liegen hierfür nicht vor.

Die Messungen beider Racemate ergaben hingegen keine verwertbaren Resultate, da auch bei wiederholter Messung die Werte sehr stark streuten und somit keine sinnvolle Aussage über die Bindung gemacht werden konnte [Abb. 48]. Eine Erklärung hierfür sind möglicherweise die großen Differenzen der jeweiligen Proteinbindungen beider Enantiomeren. Dadurch kann es zu einer Überlagerung beider Bindungen kommen, woraus ein Kurvenverlauf resultiert, der von der Auswertungssoftware nicht mehr sinnvoll analysiert werden kann. Der Kurvenverlauf ist dabei zwischen dem ersten deutlich ausgeprägten sigmoiden Anstieg und der Plateauphase ein weiteres mal - wenn auch weniger deutlich - sigmoid gekrümmt, es ergibt sich eine biphasischer Kurvenverlauf [Abb. 49]. Eine getrennte Betrachtung der beiden sigmoiden Bereiche, wie es bei der Auswertung solcher Kurven üblich ist, kann mit der Software nicht durchgeführt werden. Die manuelle Trennung der beiden Bereiche ist aufgrund der schwachen Ausprägung des zweiten Bereichs schwierig und unterliegt deshalb wahrscheinlich ebenfalls einer starken Schwankung.

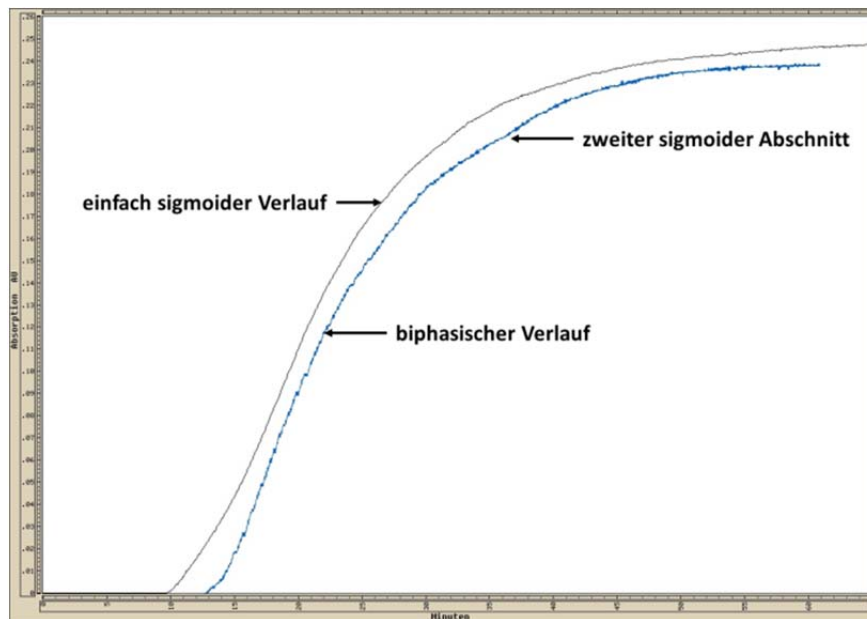


Abb. 49: Vergleich zwischen einfach sigmoidem und biphasischem Kurvenverlauf

Dieses Problem trat auch bei den unter 4.1 beschriebenen Verdrängungsversuchen auf, wenn bei Wellenlängen gemessen wurde, bei denen die Absorptionen beider Stoffe nicht genügend getrennt waren. Da beide Substanzen ein identisches Chromophor aufweisen, ist eine getrennte Beobachtung der Substanzen auf diese Weise unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Tab. 7 fasst die unterschiedlichen Untersuchungen zur Bestimmung Proteinbindung der Ephedraalkaloide zusammen. Die Messungen zeigten zum einen, dass sich die Proteinbindung der einzelnen Stereoisomere des Ephedrins bzw. Pseudoephedrins deutlich in ihrer Plasmaproteinbindung unterscheiden. Zum anderen wird deutlich, wie stark die Bestimmung dieser von der gewählten Bedingungen und der Bestimmungsmethode abhängig ist. Ein Vergleich zwischen den Messergebnissen verschiedener Methoden ist damit sehr schwierig und erklärt auch die zum Teil deutlichen Abweichungen der verschiedenen Literaturwerte zu einzelnen Stoffen.

	(-)-Ephedrin	(+)-Pseudoephedrin	möglicher Grund für Abweichung
Hörst	23 % PB; pK = 2.4	60 % PB; pK = 3.3	Verwendung von BSA
Ye [130]	keine Werte; PB Ephedrin > Pseudoephedrin		Bestimmung bei pH 9.0
Huang [131]	pK = 4.4	pK = 4.3	Verwendung von HSA
Yang [132]	pK = 4.2	Kein Wert	1000-facher Ephedrin-Überschuß, Bestimmung bei pH 8.0
Till [133]	kein Wert	20 % PB	Verwendung von humanem Plasma

Tab. 7: Zusammenfassung der unterschiedlichen Untersuchungen zur Bestimmung Proteinbindung der Ephedraalkaloide

### 4.3. Proteinbindung der Bisnaphthalimide

Die Gruppe der Bisnaphthalimide stellt eine Verbindungsklasse von allosteren Muskarinrezeptormodulatoren da, die zum Teil antitrypanosomale und antiplasmodiale Aktivität zeigen [101, 102, 134]. Als potenzielle Arzneistoffe sollten ihre Plasmaproteinbindungen zur weiteren Optimierung der Stoffe und zur Ableitung von Struktur-Bindungsbeziehungen untersucht werden.

#### 4.3.1. MT02 und MT02-Vorstufe

##### Substanz: MT02

$N^1, N^6$ -Bis(2,2-dimethyl-3-(5-nitro-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isocholin-2(3H)-yl)propyl)- $N^1, N^1, N^6, N^6$ -tetramethylhexan-1,6-diammoniumdibromid

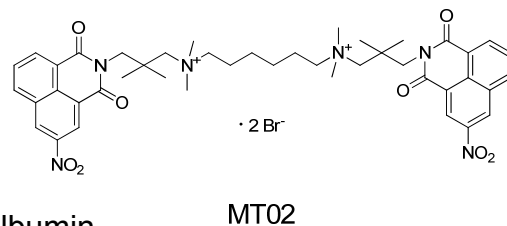
Summenformel:  $C_{44}H_{54}Br_2N_6O_8$

Molare Masse: 954.7 g/mol

Messwellenlänge: 273 nm

Eingesetzte Konzentration: 50 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin



##### Substanz: MT02-Vorstufe

2-(3-Dimethylamino-2,2-dimethyl-propyl)-5-nitro-benzo[de]isocholin-1,3-dion

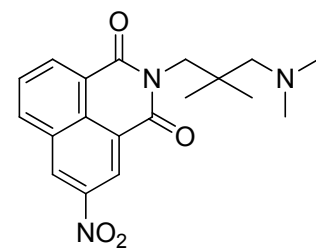
Summenformel:  $C_{19}H_{21}N_3O_4$

Molare Masse: 355.4 g/mol

Messwellenlänge: 273 nm

Eingesetzte Konzentration: 35 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin

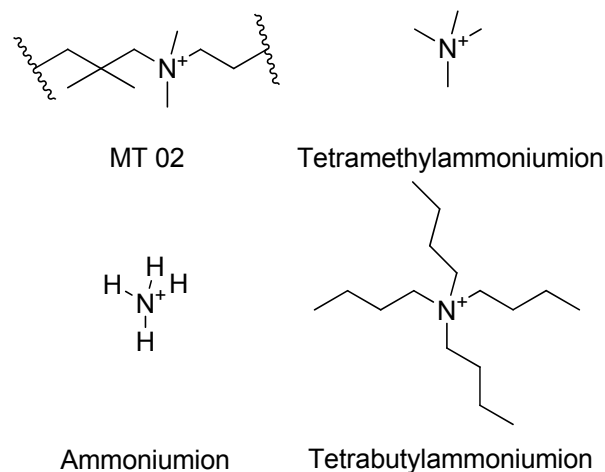


Die in Bezug auf ihre antiplasmodiale Aktivität interessanteste Verbindung war MT02. Bei dem Versuch, die Substanz zu vermessen, fiel auf, dass ihre Absorption auch in Abwesenheit von Albumin nur sehr langsam anstieg und die Plateauphase auch nach mehreren Stunden nicht erreicht wurde. Nach Ausbau der Messzelle wurde eine normale Spülkurve erhalten. Dies bedeutet, dass die Substanz eine starke Adsorption an die aus Polymethylmethacrylat (PMMA) bestehende Messzelle zeigte. Dieses Prob-

lem wurde bereits bei Messungen von zwei Naphthylisochinolin, die von *Albert* durchgeführt wurden, beschrieben [96]. Um die Proteinbindung von MT02 bestimmen zu können, wurde nach Lösungen für dieses Problem gesucht. Allen Strukturen ist die quartäre Ammoniumgruppe gemeinsam. Deshalb wurde vermutet, dass diese für Bindung an die Zelle verantwortlich ist. Als Grund wurden Wechselwirkungen zwischen dem positiven Stickstoff und dem Carbonylsauerstoff der Esterfunktion des Kunststoffes angenommen [Abb. 52].

Ähnliche Phänomene können auch bei der Säulenchromatographie solcher Verbindungen an Kieselgel beobachtet werden. Wird hierbei dem Elutionsmittel Ammoniumnitrat zugegeben, kann dieses die Verbindungen aus der Bindung an das Kieselgel verdrängen. Auf die Bindung an das Polymethylmethacrylat zeigte die Zugabe von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in einem Konzentrationsbereich von 0.2-2 M allerdings keinen Einfluss.

Bei Ammoniumnitrat sind im Gegensatz zu MT02 an den Stickstoff vier Wasserstoffatome gebunden. Um den quartären Stickstoff der Puffersubstanz dem zu untersuchenden Molekül strukturell ähnlicher zu machen, wurde in den nächsten Versuchen das Ammoniumnitrat durch Tetramethylammoniumbromid und Tetrabutylammoniumbromid [Abb. 50], ebenfalls in Konzentrationen von 0.2-2 M, ersetzt. Dies führte aber auch zu keiner Reduktion der Adsorption an die Messzelle.



**Abb. 50: Ammoniumstruktur von MT02 und analoge Verbindungen**

Da ein hohes Angebot an quartären Ammoniumverbindungen keinen Einfluss auf die Bindung an die Zelle hatte, wurde die Vorstufe von MT02 vermessen, die als tertiäres Amin vorliegt. Diese Verbindung zeigte ein nahezu identisches Verhalten, weswegen die Ursache für die Adsorption nicht der permanent positiv geladene Stickstoff sein kann.

Eine weitere Gemeinsamkeit der Substanzen ist, dass sie relativ große lipophile Aromaten enthalten. Sind diese für die Bindung an die Zelle verantwortlich, müsste diese bei der Verbindung WB64 [Abb. 51] reduziert sein. Dieses Derivat von MT02 ist am Ringsystem nicht nitrosubstituiert und weist auch nicht den quartären Kohlenstoff in der Linkerkette der Ringe auf. Beides reduziert die Lipophilie der Verbindung deutlich.

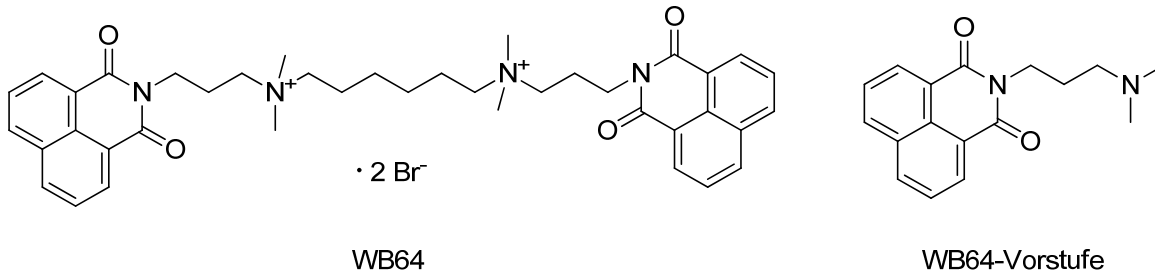


Abb. 51: WB64 und seine Synthesevorstufe

Sowohl WB64 als auch dessen Vorstufe zeigten nahezu keine Adsorption an die Zelle. Die hohe Affinität der Substanzen MT02 und MT02-Vorstufe zu PMMA wird somit durch Wechselwirkungen mit den Nitrogruppen verursacht. Zur Verminderung dieser wurde in den folgenden Versuchen dem Puffer 10 % DMSO zugesetzt. Dies sollte die Affinität der Substanzen zur Pufferlösungen erhöhen und dadurch die Anlagerung an das Material der Messzelle vermindern. Dies konnte nur zum Teil erreicht werden. Die UV-Absorption am Detektor stieg dadurch schneller an, aber die Plateauphase wurde nach wie vor nicht erreicht.

Eine weitere Verbesserung konnte folglich nur noch durch die Veränderung der Messzelle selbst erfolgen. MT02 zeigte keine Adsorption an Kunststoffschläuche der Messanlage. Diese bestehen aus Polytetrafluorethylen (PTFE), einem vollständig fluorierten Kohlenwasserstoff [Abb. 52], der aufgrund seiner hohen Indifferenz gegenüber einer Vielzahl von Substanzen breite Anwendung bei der Herstellung von Laborgeräten findet.

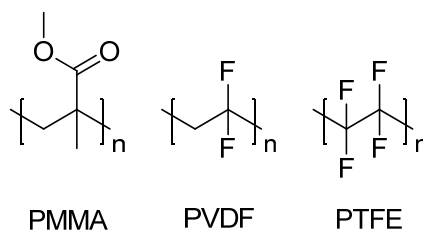


Abb. 52: Strukturen der Kunststoffe für die Herstellung der Messzellen

Die Fertigung einer Messzelle aus PTFE war nicht möglich. Das Material ist für diese Anwendung zu weich und die für den Anschluss an die Anlage nötigen Gewindebohrungen waren aufgrund zu hohen Abriebs nicht beständig.

Daraufhin wurde die unter 2.1.3.2 beschriebene Zelle aus Polyvinylidenfluorid (PVDF [Abb. 52]) hergestellt. Dieses Material besteht aus zum Teil fluorierten Kohlenwasserstoffen, ist chemisch ebenfalls inerte als PMMA, aber weniger inert als PTFE. Es weist aber dafür eine höhere Härte auf. Die Zelle stellt somit einen Kompromiss zwischen der geforderten verminderten Adsorption und Einschränkung der Konstruktion dar.

Mit dieser Zelle stieg die Absorption von MT02 normal an und erreichte die Plateauphase. Die Bestimmung der Proteinbindung war dennoch nicht möglich. Die Wirkstofflösung war über den Zeitraum der Messung nicht beständig und verfärbte sich nach unterschiedlichen Zeiten rosa und schließlich blassgelb. Hierdurch konnten keine auswertbaren Kurven erhalten werden.

Der Grund für diese Zersetzung und welche Reaktionen hierbei ablaufen, wurde an dieser Stelle nicht untersucht. Allerdings ist dies im Moment Gegenstand der Arbeit von Dr. E. El-Hossary.

#### **4.4. Proteinbindung der Naphthylisochinoline**

Die Pflanzen der Familien Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae enthalten eine Reihe von Alkaloiden von Naphthylisochinolin-Typ. Derivate dieser Alkaloide zeigen Bioaktivität gegen parasitäre Erreger wie Leishmanien. Ihre Synthese ist Gegenstand der Forschung der Arbeitsgruppe Bringmann [135, 136].

Von einer Vielzahl dieser Verbindungen wurde bereits von *Albert* die Proteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration bestimmt [96, 137]. Hierbei traten die schon unter 4.3 erwähnte Probleme der Adsorption der Substanz an die Messzelle der Anlage auf. Da hierfür eine Lösung durch Verwendung eines anderen Zellenmaterials gefunden wurde, sollte die Proteinbindung der zuvor nicht messbaren Substanzen, GB-AP05 und GB-AP143 mit Hilfe dieser Zelle bestimmt werden.

## 4.4.1. GB-AP05

**Substanz: GB-AP05**

6,8-Dimethoxy-1,3-dimethyl-2-(naphthalen-1-yl)isochinolin-2-iumperchlorat

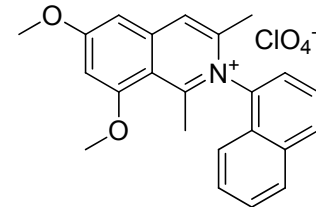
Summenformel:  $C_{23}H_{22}ClNO_6$ 

Molare Masse: 443.9 g/mol

Messwellenlänge: 264 nm

Eingesetzte Konzentration: 13 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin



GB-AP05

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	99.90	6.36	6.18	47.50	3.65	---
2	99.80	6.31	6.13	24.40	3.28	---
3	99.90	6.89	6.71	53.50	4.41	---
4	99.80	6.17	6.00	38.30	3.36	---
5	99.50	6.74	6.56	64.10	3.92	---
<b>Mittelwert</b>	<b>99.78</b>	<b>6.49</b>	<b>6.32</b>	<b>45.56</b>	<b>3.72</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.16</b>	<b>0.31</b>	<b>0.30</b>	<b>15.09</b>	<b>0.46</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.16</b>	<b>4.71</b>	<b>4.80</b>	<b>33.12</b>	<b>12.34</b>	<b>---</b>

Die Substanz ließ sich durch die Verwendung der PVDF-Zelle problemlos messen. Die Proteinbindung ist mit 99.8 % im Gegensatz zu den von *Albert* vermessenen Substanzen deutlich höher [Tab. 8].

Substanz	Proteinbindung [%]	sdv
GB-AP 89	63.0	5.4
GB-AP 94	35.7	7.4
GB-AP101	61.2	9.4
GB-AP104	56.4	2.0
GB-AP107	51.3	10.9
GB-AP110	69.2	7.9
GB-AP149	61.3	7.8
GB-AP186	63.4	10.1
GB-AP187	32.6	7.7
GB-AP189	53.5	6.2
GB-AP197	52.8	7.6

Tab. 8: Proteinbindung der Naphtylisochinoline [96]

Der Grund hierfür ist evtl. der gleiche wie für die Adsorption an PMMA. Eine Substanz, die eine sehr hohe Affinität zu diesem Material hat, das hauptsächlich Esterfunktionen für Wechselwirkungen zu Verfügung stellt, bindet scheinbar auch stark an



ein Molekül wie Albumin, das neben dieser Funktion viele weitere potenzielle Bindungspartnern aufweist.

#### 4.4.2. GB-AP143

**Substanz:**

**GB-AP143**

2,2'-([1,1'-Biphenyl]-4,4'-diyl)bis(6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinolin-2-ium) trifluoracetat

Summenformel:

$C_{42}H_{38}F_6N_2O_6$

Molare Masse:

812.8 g/mol

Messwellenlänge:

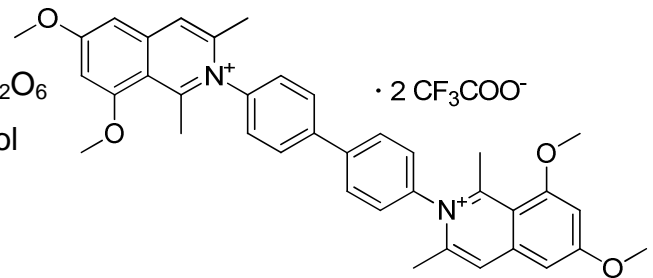
271 nm

Eingesetzte Konzentration:

11 mg/l

Verwendetes Protein:

Bovines Serumalbumin



GB-AP143

Die Substanz GB-AP143 war auch mit der PVDF-Zelle nicht messbar, sie zeigte weiterhin die starke Bindung an das Material der Messzelle. Dies zeigt, dass PVDF trotz der teilweisen Fluorierung nicht vollständig inert ist.

Die Methode kann durch die Weiterentwicklung der Zelle breiter angewendet werden, ist trotz allem nicht für alle Substanzen geeignet [vgl. 4.5].

## 4.5. Proteinbindung der Fluorchinolone

Fluorchinolone werden seit 1980er als Hemmstoffe der bakteriellen Topoisomerase-II (Gyrase) bei Infektionen angewendet. Ausgehend von Norfloxacin konnte durch strukturelle Veränderungen in den letzten 30 Jahren eine Reihe von Antiinfektiva entwickelt werden, die über ihre ursprüngliche Indikation „Harnwegsinfekte“ hinaus bei zahlreichen Erkrankungen Einsatz finden, wie z.B. bei Infektionen mit Pseudomonaden oder bei Typhus. Hierbei wurde das Wirkspektrum von vorwiegend gramnegativen Erregern erweitert, so dass neuere Substanzen wie Moxifloxacin auch zusätzlich gute Aktivität bei grampositiven, anaeroben und atypischen Erregern zeigen [1, 138].

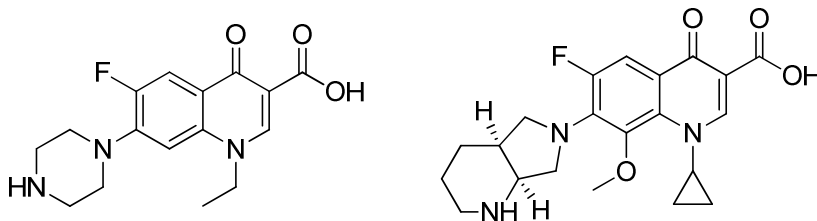


Abb. 53: Norfloxacin (links) und Moxifloxacin (rechts)

Die Erweiterung des Wirkspektrums dieser Substanzklasse ist weiter Gegenstand aktueller Forschung. Neuere Vertreter dieser Stoffklasse zeigen Aktivität gegen Viren und Trypanosomen [104, 105, 139] und könnten somit zukünftig für diese Indikationen angewendet werden.

Die nachfolgend beschriebenen Substanzen wurden im Zuge dieser Untersuchungen von *Hiltensperger*, *Kugelmann* und *Niedermeier* entwickelt und synthetisiert. Als potenzielle antitrypanosomale Wirkstoffe sollte ihre Plasmaproteinbindungen bestimmt werden, um Dosierungen für *in vivo* Testungen berechnen zu können und um Aussagen über das Bindungsverhalten anhand der Struktur einer Verbindungen treffen zu können.

### 4.5.1. Fluorchinolone mit Amid-Funktion

**Substanz:**
**GHQ49**

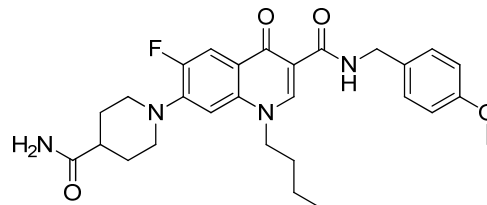
1-Butyl-7-(4-carbamoylpiperidin-1-yl)-6-fluor-N-(4-methoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid

Summenformel:

 $C_{28}H_{33}FN_4O_4$ 

Molare Masse:

508.6 g/mol


**Substanz:**
**GHQ63**

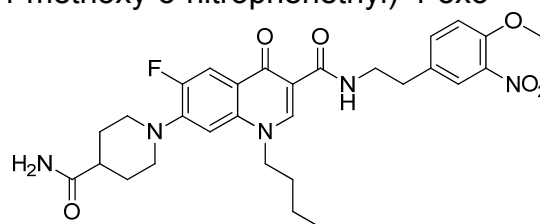
1-Butyl-7-(4-carbamoylpiperidin-1-yl)-6-fluor-N-(4-methoxy-3-nitrophenethyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid

Summenformel:

 $C_{29}H_{34}F_6N_5O_6$ 

Molare Masse:

567.6 g/mol



GHQ49

GHQ63

**Substanz:**
**QPD15a12**

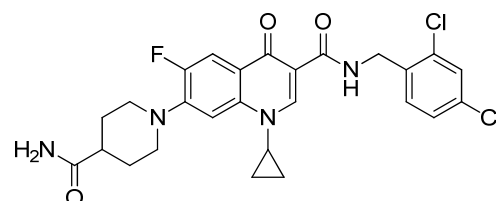
7-(4-Carbamoylpiperidin-1-yl)-1-cyclopropyl-N-(2,4-dichlorobenzyl)-6-fluor-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid

Summenformel:

 $C_{26}H_{25}Cl_2FN_4O_3$ 

Molare Masse:

531.41 g/mol


**Substanz:**
**GHEK15**

N-(2,4-Dichlorobenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-7-((2-hydroxyethyl)amino)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid

Summenformel:

 $C_{25}H_{19}Cl_2F_2N_3O_3$ 

Molare Masse:

517.1 g/mol

Messwellenlänge:

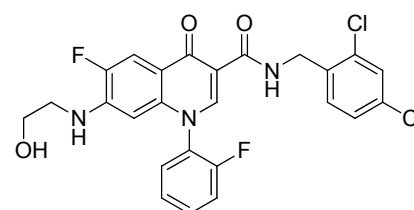
---

Eingesetzte Konzentration:

---

Verwendetes Protein:

---



QPD15a12

GHEK15

Die Verbindungen GHQ49, GHQ63 und QPD15a12 konnten nicht vermessen werden, da sie nicht ausreichend im Puffer löslich waren. Auch durch die Zugabe von 10 % DMSO konnte keine Verbesserung der Löslichkeit erreicht werden. GHEK15 ließ sich auf diese Weise lösen, zeigte aber ein ähnlich adhäsives Verhalten wie die oben erwähnten Substanzen MT02, GB-AP05 und GB-AP143 [vgl. 4.3, 4.4].

### 4.5.2. Fluorchinolone mit saurer Funktion

**Substanz: GHQ215**

Natrium 3-(Benzylcarbamoyl)-1-butyl-6-fluor-7-morpholino-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-4-olat

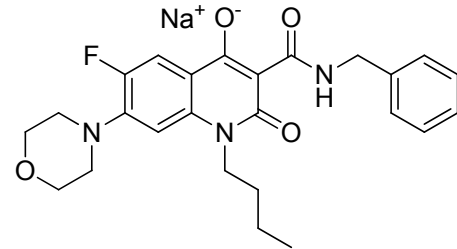
Summenformel:  $C_{25}H_{27}FN_3NaO_4$

Molare Masse: 475.5 g/mol

Messwellenlänge: 281 nm

Eingesetzte Konzentration: 6.5 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin



GHQ215

GHQ215 war nicht messbar. Die Substanz löste sich nur unter Zugabe einer höheren Menge Natriumhydroxids, wodurch der pH-Wert der Wirkstofflösung auf über 10 anstieg. Bei der anschließenden Messung war daraufhin der Proteindurchgang zu stark erhöht, was auf Denaturierung des Proteins oder auf Angriff der Filtermembran, bzw. der Zelldichtung zurückgeführt wurde.

**Substanz: GHQ267**

1-Butyl-6-fluor-N-(4-(methylsulfonamido)benzyl)-7-morpholino-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid

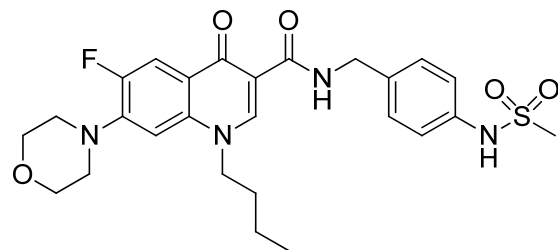
Summenformel:  $C_{26}H_{31}FN_4O_5S$

Molare Masse: 530.6 g/mol

Messwellenlänge: 279 nm

Eingesetzte Konzentration: 8 mg/l

Verwendetes Protein: Humanes Serumalbumin



GHQ267

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	81.24	3.86	---	78.02	3.77	---
2	80.81	3.85	---	77.08	3.75	---
3	80.63	3.84	---	71.09	3.61	---
4	77.71	3.55	3.35	77.11	3.75	---
5	66.43	3.36	3.01	64.55	3.50	---
<b>Mittelwert</b>	<b>77.36</b>	<b>3.69</b>	<b>3.18</b>	<b>73.57</b>	<b>3.68</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>6.27</b>	<b>0.23</b>	<b>0.24</b>	<b>5.75</b>	<b>0.12</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>8.10</b>	<b>6.14</b>	<b>7.56</b>	<b>7.81</b>	<b>3.19</b>	<b>---</b>

### 4.5.3. Fluorchinolone mit basischer Funktion

**Substanz:** GHQ171

*N*-Benzyl-1-butyl-7-(4-ethylpiperazin-1-yl)-6-fluor-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid

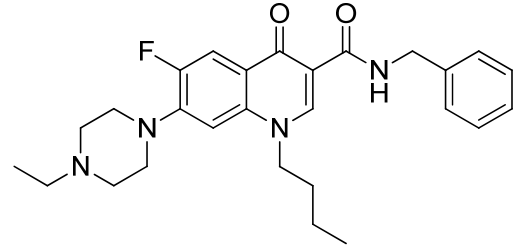
Summenformel:  $C_{27}H_{32}FN_4O_2$

Molare Masse: 464.57 g/mol

Messwellenlänge: 318 nm

Eingesetzte Konzentration: 15 mg/l

Verwendetes Protein: Bovines Serumalbumin



GHQ171

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen		Abhängige Bindungsstellen	
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>
1	92.97	4.34	91.55	4.1
2	91.78	4.08	87.82	4.22
3	99.51	5.88	98.57	5.55
4	99.99	6.48	99.94	5.61
5	99.99	6.86	99.97	7.51
6	99.99	4.26	99.94	3.99
<b>Mittelwert</b>	<b>97.37</b>	<b>5.32</b>	<b>96.30</b>	<b>5.16</b>
<b>sdv</b>	<b>3.89</b>	<b>1.24</b>	<b>5.28</b>	<b>1.36</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>4.00</b>	<b>23.27</b>	<b>5.49</b>	<b>26.35</b>

**Substanz:** GHQ242

4-((1-Butyl-6-fluor-7-morpholino-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamido)methyl)pyridin-1-iumoxalat

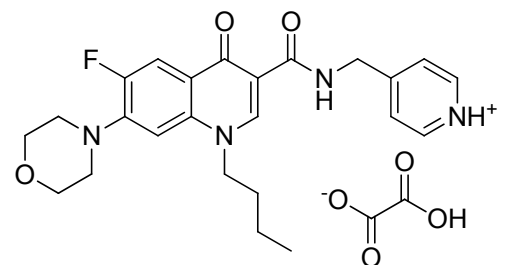
Summenformel:  $C_{26}H_{29}FN_4O_7$

Molare Masse: 528.5 g/mol

Messwellenlänge: 278 nm

Eingesetzte Konzentration: 4.5 mg/l

Verwendetes Protein: Humanes Serumalbumin



GHQ242Ox

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	99.97	6.52	6.34	66.31	3.52	---
2	99.95	6.31	6.01	56.87	3.34	---
3	99.92	6.12	5.94	53.97	3.29	---
4	99.95	6.33	6.15	59.50	3.39	---
5	99.96	6.36	6.19	62.11	3.44	---
<b>Mittelwert</b>	<b>99.95</b>	<b>6.33</b>	<b>6.13</b>	<b>59.75</b>	<b>3.40</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>0.02</b>	<b>0.14</b>	<b>0.16</b>	<b>4.75</b>	<b>0.09</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>0.02</b>	<b>2.26</b>	<b>2.56</b>	<b>7.95</b>	<b>2.62</b>	<b>---</b>

**Substanz: GHQ243**

2-(3-(Benzylcarbamoyl)-6-fluor-7-morpholino-4-oxochinolin-1(4H)-yl)-N,N-dimethylethanaminiumoxalat

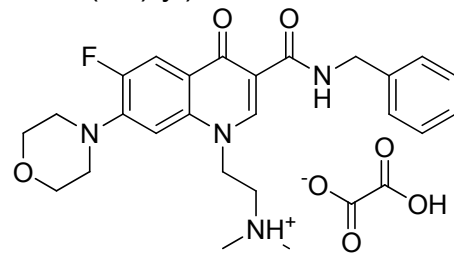
Summenformel: C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

Molare Masse: 542.6 g/mol

Messwellenlänge: 278 nm

Eingesetzte Konzentration: 3.5 mg/l

Verwendetes Protein: Humanes Serumalbumin



GHQ243Ox

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	49.00	3.00	2.78	47.84	3.18	---
2	40.03	2.85	2.60	38.14	3.05	---
3	50.73	3.12	2.61	49.55	3.21	---
4	44.29	3.06	2.27	43.52	3.11	---
5	45.59	2.92	2.75	41.06	3.07	---
<b>Mittelwert</b>	<b>45.93</b>	<b>2.99</b>	<b>2.60</b>	<b>44.02</b>	<b>3.12</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>4.19</b>	<b>0.11</b>	<b>0.20</b>	<b>4.71</b>	<b>0.07</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>9.11</b>	<b>3.54</b>	<b>7.78</b>	<b>10.70</b>	<b>2.21</b>	<b>---</b>

**Substanz: GHEK07**

*N*-(2,4-Dichlorobenzyl)-6-fluor-1-(2-fluorphenyl)-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid-Hydrochlorid

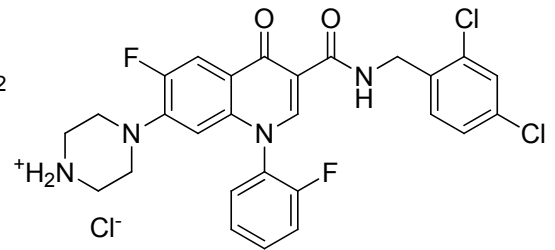
Summenformel:  $C_{27}H_{23}Cl_3F_2N_4O_2$

Molare Masse: 579.9 g/mol

Messwellenlänge: ---

Eingesetzte Konzentration: ---

Verwendetes Protein: ---



GHEK07

GHEK07 konnte durch Zugabe von 10 % DMSO zum Puffer und Anlösen mit 0.1 M HCl gelöst werden. Die Substanz zeigte ebenfalls Adsorption an die Bestandteile der Messanlage.

**Substanz: GHQ232HCl**

*N*-Benzyl-1-butyl-6-fluor-7-morpholino-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboximidamid Hydrochlorid

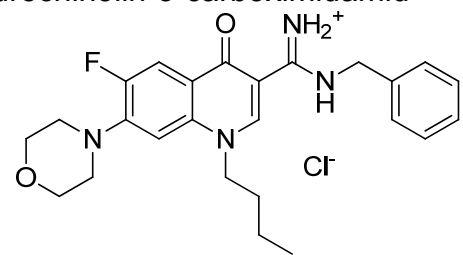
Summenformel:  $C_{25}H_{30}ClFN_4O_2$

Molare Masse: 473.0 g/mol

Messwellenlänge: 286 nm

Eingesetzte Konzentration: 5 mg/l

Verwendetes Protein: Humanes Serumalbumin



GHQ232HCl

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen		Abhängige Bindungsstellen	
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>
1	86.79	4.04	63.59	2.98
2	82.86	3.97	68.58	3.56
3	90.43	3.87	53.37	3.28
4	78.34	3.78	74.65	3.69
5	90.73	4.21	89.88	4.17
<b>Mittelwert</b>	<b>85.83</b>	<b>3.97</b>	<b>70.01</b>	<b>3.54</b>
<b>sdv</b>	<b>5.27</b>	<b>0.16</b>	<b>13.57</b>	<b>0.45</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>6.14</b>	<b>4.14</b>	<b>19.38</b>	<b>12.65</b>

**Substanz: GHQ237Ox**

3-(Benzylcarbamoyl)-1-butyl-7-morpholino-4-oxo-1,4-dihydro-1,6-naphthyridin-6-iumoxalat

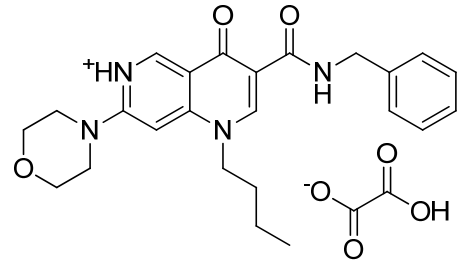
Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>

Molare Masse: 510.5 g/mol

Messwellenlänge: 292 nm

Eingesetzte Konzentration: 2.5 mg/l

Verwendetes Protein: Humanes Serumalbumin



GHQ237Ox

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	73.41	3.55	3.02	72.50	3.64	---
2	65.26	3.27	3.10	71.46	3.62	---
3	61.35	3.23	2.97	60.29	3.4	---
4	69.33	3.40	3.10	67.54	3.54	---
5	68.56	3.43	2.97	67.29	3.54	---
<b>Mittelwert</b>	<b>67.58</b>	<b>3.38</b>	<b>3.03</b>	<b>67.82</b>	<b>3.55</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>4.53</b>	<b>0.13</b>	<b>0.07</b>	<b>4.80</b>	<b>0.09</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>6.71</b>	<b>3.81</b>	<b>2.16</b>	<b>7.08</b>	<b>2.66</b>	<b>---</b>

**Substanz: GHQ250Ox**

2-(4-((1-Butyl-6-fluor-7-morpholino-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamido)-methyl)phenoxy)-N,N-dimethylethanaminiumoxalat

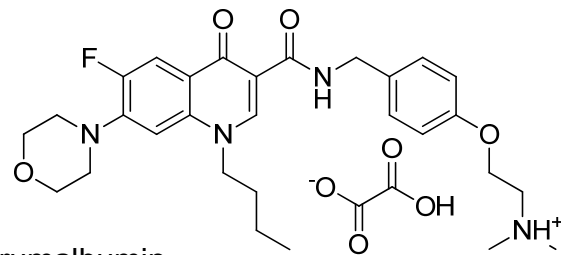
Summenformel: C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>

Molare Masse: 614.7 g/mol

Messwellenlänge: 279 nm

Eingesetzte Konzentration: 6 mg/l

Verwendetes Protein: Humanes Serumalbumin



GHQ250Ox



Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen		Abhängige Bindungsstellen	
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>
1	78.98	3.80	69.10	3.57
2	77.78	3.77	77.64	3.76
3	88.11	4.09	82.63	3.90
4	82.82	3.91	77.64	3.76
5	68.00	3.55	67.28	3.54
<b>Mittelwert</b>	<b>79.14</b>	<b>3.82</b>	<b>74.86</b>	<b>3.71</b>
<b>sdv</b>	<b>7.42</b>	<b>0.20</b>	<b>6.45</b>	<b>0.15</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>9.37</b>	<b>5.18</b>	<b>8.62</b>	<b>4.04</b>

**Substanz:****GHQ257Ox**

2-((4-((1-Butyl-6-fluor-7-morpholino-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamido)-methyl)phenoxy)methyl)pyridin-1-iumoxalat

Summenformel:

C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>

Molare Masse:

634.7 g/mol

Messwellenlänge:

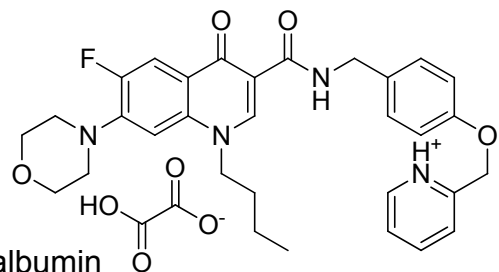
279 nm

Eingesetzte Konzentration:

6 mg/l

Verwendetes Protein:

Humanes Serumalbumin



GHQ257Ox

Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	92.97	4.13	3.93	92.78	4.33	---
2	95.80	4.58	---	94.20	4.43	---
3	95.43	4.54	---	92.04	4.29	---
4	91.35	4.04	3.82	91.35	4.25	---
5	92.45	4.09	3.90	92.10	4.29	---
<b>Mittelwert</b>	<b>93.60</b>	<b>4.28</b>	<b>3.88</b>	<b>92.49</b>	<b>4.32</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>1.93</b>	<b>0.26</b>	<b>0.06</b>	<b>1.08</b>	<b>0.07</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>2.07</b>	<b>6.12</b>	<b>1.46</b>	<b>1.17</b>	<b>1.59</b>	<b>---</b>

#### 4.5.4. GHQ168

GHQ168 gehört ebenfalls zu der Gruppe der Chinolone mit Amid-Funktion, nimmt aber eine Sonderstellung ein. Es zeigt eine wesentlich höhere Aktivität gegen Trypanosomen als die anderen erwähnten Fluorchinolone. Deshalb war die Proteinbindung von besonderem Interesse. Allerdings zeigte es ebenfalls wie die unter 4.5.1 beschriebenen Substanzen eine schlechte Löslichkeit in der Pufferlösung. Daher wurde eine Methode entwickelt, bei der auch sehr hydrophobe Moleküle in ausreichender Menge in Lösung gebracht und vermessen werden können.

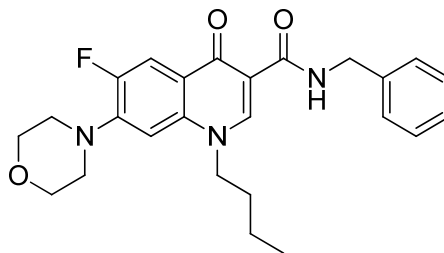


Abb. 54: GHQ168

### Entwicklung der mizellaren Methode

Die Versuche GHQ168 mit Hilfe von DMSO-Zusatz zu lösen, blieben ohne Erfolg. Auch nach Zugabe von 10 % DMSO konnte keine klare Lösung erhalten werden. Höhere Konzentrationen können nicht verwendet werden, da dies zu Konformationsänderung bis hin zur Denaturierung des Albumins führen würde [96, 140-142]. Um die Polarität des Puffermediums zu senken und somit die Löslichkeit der Substanz zu verbessern, wurden weitere organische Lösungsmittel [Tab. 9], sowie organische Puffersubstanzen [Tab. 10] für die Pufferherstellung verwendet.

Lösungsmittel	Konzentration [%]	Klare Lösung	Proteinfällung
Dimethylformamid	< 15	nein	nicht getestet
	> 15	ja	ja
Methanol	< 40	nein	nicht getestet
Ethanol	< 40	nein	nicht getestet
Acetonitril	< 40	nein	nicht getestet
	> 40	ja	ja

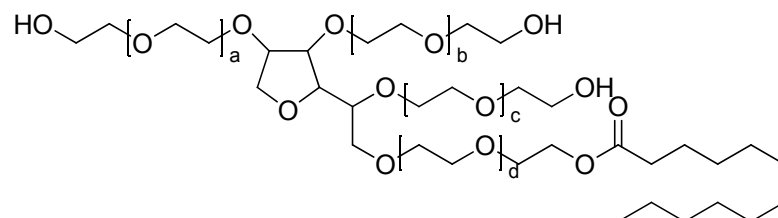
Tab. 9: Lösungsversuche von GHQ168 mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln

Puffersubstanz	DMSO [%]	Klare Lösung
TRIS-HCl	---	nein
	10	nein
HEPES	---	nein
	10	nein
TAPS	---	nein
	10	nein
Barbital	---	nein
	10	nein

Tab. 10: Lösungsversuche mit organischen Puffersubstanzen mit und ohne DMSO-Zusatz (TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, TAPS: N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonsäure)

Beide Ansätze führten nicht zum erwünschter Ergebnis. Mit Hilfe von DMF und ACN konnten zwar klare Lösungen mit einer für die Messung ausreichenden Konzentration von GHQ168 (0.42 µg/ml) hergestellt werden, allerdings verursachten diese Präzipitationen beim Kontakt mit der Albuminlösung. Die Verwendung von organischen Puffersubstanzen hatte auch bei Zugabe von DMSO keine sichtbare Verbesserung der Löslichkeit zur Folge. Die Pufferlösung war folglich weiterhin zu polar.

Um schwer wasserlöslichen Verbindung in wässrigen Systemen zu lösen, werden in der Kapillarelektrophorese detergentienhaltige Puffer oder Mikroemulsionen verwendet [143]. In beiden Fällen werden in einer polaren Lösung wasserfreie hochlipophile Kompartimente erzeugt, in die sich lipophile Substanzen einlagern können, ohne dass der vorwiegend wässrige Charakter der Lösung verloren geht. So verwendeten Liu et al. [76] für die Bestimmung der Proteinbindung polyzyklischer Aromaten mittels Kapillarelektrophorese eine 2.00-6.25 mM Polysorbat-20-Lösung [Abb. 55].



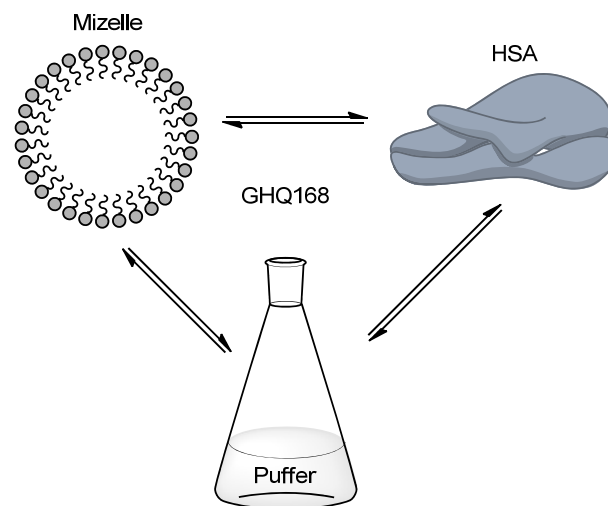
$$a + b + c + d = 16$$

Abb. 55: Polysorbat 20

Damit konnte GHQ168 in dem verwendeten Phosphatpuffer in Lösung gebracht werden. Hierzu wurde die Substanz zu 1 mg/ml DMF gelöst und 420 µl dieser Lösung mit

dem 2 mM Polysorbat 20 enthaltenden Puffer zu 100 ml verdünnt. Mit der Proteinlösung war die so erhaltene Wirkstofflösung ebenfalls kompatibel.

Die Anwesenheit von Polysorbat 20 kann ebenso wie die von DMSO die Eigenschaften von Proteinen verändern. In der Literatur ist die Bildung von Komplexen zwischen Polysorbat 20 und Albumin beschrieben [144]. Dies mindert die Mizellbildung des Detergenzes [145, 146] und reduziert ebenso die Bindungsaffinität des Proteins [147]. Des Weiteren wird durch die Mizellen ein weiterer Verteilungsraum geschaffen, worin sich eine Substanz aufhalten kann. Hierdurch muss nicht nur die Verteilung zwischen Protein und Puffer betrachtet werden, sondern auch die zwischen Mizelle und Protein [Abb. 56]. Liu et al. konnten allerdings zeigen, dass diese Effekte im Falle des Warfarins nur einen geringen Einfluss auf dessen Proteinbindung haben [76].



**Abb. 56: Verteilung der Substanz GHQ168 zwischen der Kompartimenten des Puffers**

Um den Einfluss von Polysorbat 20 auf die Bestimmung mittels Ultrafiltration zu bestimmen, wurde zunächst nach einer Substanz mit ähnlichen Eigenschaften wie GHQ168 gesucht, die als Modellsubstanz verwendet werden konnte und deren Proteinbindung bekannt war.

Um eine möglichst hohe Ähnlichkeit aufzuweisen, sollte diese die folgenden Eigenschaften aufweisen:

- Amidstruktur
- mehrere Aromaten
- heterozyklische Ringssysteme
- Absorptionsmaximum über 260 nm
- hohe Lipophilie und schlechte Wasserlöslichkeit
- kein basisches oder saures Zentrum

Nach diesen Kriterien wurden die Substanzen Carbamazepin und Nifedipin ausgewählt [Abb. 57].

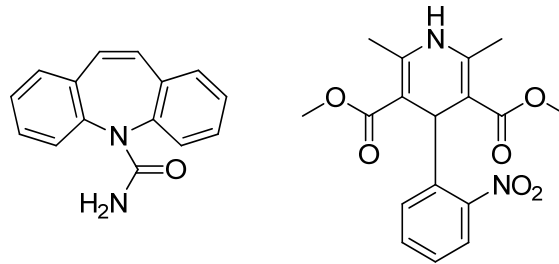


Abb. 57: Carbamazepin (links) und Nifedipin (rechts)

Beide Verbindungen sind praktisch unlöslich in Wasser [113] und konnten analog zu der Verbindung GHQ168 nach Lösen in DMF mit dem modifizierten Puffer verdünnt und vollständig gelöst werden, ohne dass es sie wieder aus der Lösung ausfielen.

Die Nifedipinlösung war nicht stabil und zeigte mit der Zeit starke Veränderung ihres UV-Spektrums. Dies wurde auf die Oxidationsempfindlichkeit der Verbindung zurückgeführt [112], weshalb nur Carbamazepin weiter untersucht wurde.

Bei der anschließenden Messung traten verschiedene Probleme auf. Zum einen stieg der Druck in der Messzelle bereits im 1. Schritt der Messung stark an und zum anderen war der Proteindurchgang im 3. Schritt zu stark, um eine auswertbare Messung durchführen zu können.

Hierfür sind mehrere Ursachen denkbar. Zum einen könnte das Protein während der Messung denaturieren, wodurch Fragmente entstehen, die den Filter verstopfen. Dies würde sowohl den hohen Proteindurchgang, als auch den Druckanstieg erklären, allerdings nicht den Druckanstieg im 1. Schritt.

Zum anderen sind die Mizellen unter Umständen größer als die Ausschlussgröße der Ultrafiltrationsmembran. Da diese aber bedingt verformbar sind, könnten sie begrenzt durch den Filter gepresst werden und erzeugen durch ihren Rückstau an der Membran lokal einen erhöhten osmotischen Druck, den die Anlage durch Anlegen eines höheren Druckes ausgleichen muss. Ist dieser Druck stärker als die Belastungsgrenze der Membran, wäre dies der Grund für den Proteindurchgang.

Die Membran kann bis zu einem Druck von 4.7 bar eingesetzt werden [99]. Die Anlage war so eingestellt, dass bei 4.0 bar die Pumpe automatisch ausgeschaltet wurde. Dies konnte somit nicht die Ursache für die aufgetretenen Probleme sein.

Um die Theorie der Fragmentbildung zu überprüfen wurde, das Protein mit der Polysorbat-Lösung wie in der Versuchsdurchführung beschrieben gelöst und anschließend

mittels SDS-Gelelektrophorese mit dem unbehandelten Protein verglichen. Bei einer stattgefundenen Fragmentierung müssten sich beide in ihrer Wanderungstrecke im Gel unterscheiden, bzw. es müssten neue Banden entstehen.

Dies war nicht der Fall. Sowohl BSA als auch HSA zeigten nach der Polysorbatbehandlung das gleiche Migrationsverhalten im elektrischen Feld wie die unbehandelten Proteine [Abb. 58].

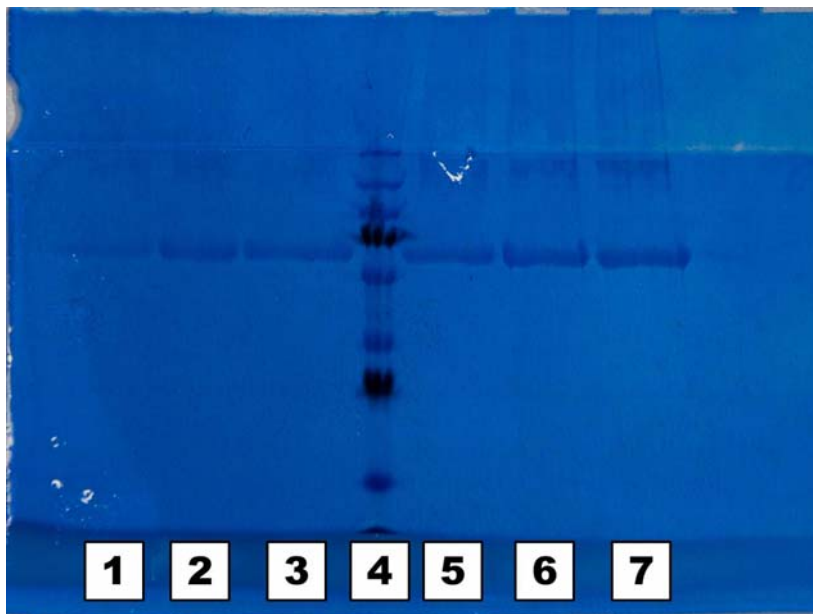
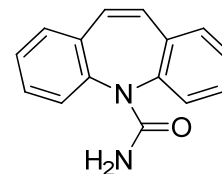


Abb. 58: SDS Gelelektrophorese der Proteine HSA und BSA (1: HSA unbehandelt, 2+3: HSA mit Polysorbat 20 behandelt, 4: Laufstandard, 5: BSA unbehandelt, 6+7: BSA mit Polysorbat 20 behandelt)

Da weder das Protein noch die Membran Ursache für die Probleme waren, wurde der unter 2.1.3.5 beschriebene Dichtigkeitstest der Messzelle durchgeführt. Dieser konnte zeigen, dass das Protein nach der Injektion nicht durch die Membran gedrückt wurde, sondern durch den Dichtungsring an dieser vorbei. Das bedeutet, dass in der Messzelle aufgrund des oben beschriebenen Mizellrückstaus der Druck soweit anstieg, dass diese dem Druck nicht mehr standhalten konnte und Leckagen auftraten. Dieses Problem konnte durch den Bau der Zelle wie unter 2.1.3.3 beschrieben gelöst werden. Allerdings stieg der Druck während der Messung immer noch auf Werte über 4.0 bar an, was zum Abbruch der Einzelmessungen führte. Da die Polysorbat-20-Mizellen hierfür verantwortlich sind, wurde die Konzentration von 2 mM auf 1 mM gesenkt, wodurch die Löslichkeit der erforderlichen Mengen von GHQ168 und Carbamazepin für die Messung immer noch ausreichend war. Zusätzlich wurde das Polysorbat nur noch zur Wirkstofflösung gegeben, was in den Schritten 2, 3 und 5 die Mizellkonzentration in der Zelle nicht weiter erhöhte. Durch die Verwendung zweier unterschiedlich zusammengesetzter Puffer, musste allerdings eine Messwellenlänge über 250 nm

gewählt werden, da darunter der Absorptionsunterschied beider Lösungen deutlich über den Grundrauschen des Detektors liegt und eine störungsfreie Messung nicht möglich wäre.

<b>Substanz:</b>	<b>Carbamazepin</b>
Summenformel:	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
Molare Masse:	236.3 g/mol
Messwellenlänge:	285 nm
Eingesetzte Konzentration:	8.5 mg/l
Verwendetes Protein:	Humanes Serumalbumin
Bindung laut Literatur:	60-80 % [1]



Carbamazepin

#### Messungen:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen		
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
1	79.20	3.78	2.44	79.29	3.81	---
2	79.15	3.78	2.45	79.11	3.80	---
3	72.21	3.54	2.92	71.97	3.63	---
4	84.58	3.93	2.81	83.25	3.92	---
5	84.73	3.96	---	88.21	4.09	---
6	85.19	3.91	3.16	84.93	3.97	---
7	80.56	3.79	2.91	80.50	3.84	---
8	76.97	3.72	2.46	77.20	3.75	---
<b>Mittelwert</b>	<b>80.32</b>	<b>3.80</b>	<b>2.74</b>	<b>80.56</b>	<b>3.85</b>	<b>---</b>
<b>sdv</b>	<b>4.49</b>	<b>0.14</b>	<b>0.29</b>	<b>4.98</b>	<b>0.14</b>	<b>---</b>
<b>rel sdv [%]</b>	<b>5.59</b>	<b>3.58</b>	<b>10.50</b>	<b>6.18</b>	<b>3.67</b>	<b>---</b>

Mit der oben beschriebenen Methode wurde die Proteinbindung von Carbamazepin mit 80 % bestimmt. Diese liegt im oberen Bereich seiner Bindung unter physiologischen Bedingungen. Die Anwesenheit des Polysorbat 20 hat somit keinen nennenswerten Einfluss auf die Bestimmung und die Methode kann für die Messung schlecht wasserlöslicher Verbindungen verwendet werden.

Die Messung der Substanz GHQ168 war allerdings auch mit dieser Methode nicht möglich, da die Substanz ein ähnlich adhäsives Verhalten wie MT02 [siehe 4.3] zeigte. Nur bindet GHQ168 nicht an die Messzelle, sondern an die Ultrafiltrationsmembran. Die Verwendung von Membranen aus den Materialien Polycarbonat (PC) und Polyethersulfon (PES) machten die Messung ebenfalls nicht möglich. PC-Membrane waren nicht mit passender Porengröße erhältlich. Das Protein konnte nicht stark genug

zurückgehalten werden, eine Bindung an das Material erfolgte in diesem Fall allerdings nicht.

An PES zeigte die Substanz ebenfalls eine starke Bindung. Aufgrund der kleineren Oberfläche der PES-Membran in Vergleich zu den regenerierten Cellulosemembranen wurde diese vor dem Experiment mit der Wirkstofflösung über Nacht inkubiert. Mit der so gesättigten Membran konnten anschließend normale Spülkurven mit und ohne Protein erhalten werden.

**Substanz: GHQ168**

*N*-Benzyl-1-butyl-6-fluor-7-morpholino-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-carboxamid

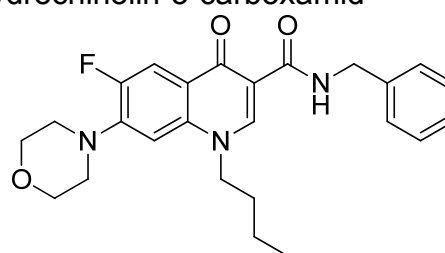
Summenformel: C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

Molare Masse: 437.5 g/mol

Messwellenlänge: 282 nm

Eingesetzte Konzentration: 4.2 mg/l

Verwendetes Protein: Humanes Serumalbumin



GHQ168

Messung:

Messung	Unabhängige Bindungsstellen			Abhängige Bindungsstellen				
	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	Proteinbindung [%]	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
1	80.51	3.51	3.34	3.16	80.34	3.83	---	---

Weitere Messungen wurden nicht durchgeführt, da diese Art der Durchführung sehr substanzintensiv war und die Bestimmung der Proteinbindung in Anwesenheit eines Bindungspartners erfolgte, zu dem die Substanz eine höhere Affinität aufwies als zum Protein. Die Aussagekraft des erhaltenen Wertes ist folglich fragwürdig, da nicht beurteilt werden kann, ob tatsächlich die Bindung an Albumin, oder die Bindung an nicht besetzte Membranstellen erfolgt ist.

**4.5.5. Diskussion**

Die Proteinbindung der vermessenen Fluorchinolone lag bei den meisten Substanzen bei 80 % oder darüber [Abb. 59]. Die einzigen zwei Verbindungen, die eine deutlich geringere Bindung aufwiesen sind GHQ243 (45.93 %) und GHQ237 (67.58 %). Beide unterscheiden sich strukturell nur wenig von den anderen Verbindungen, weshalb es schwer ist eine Struktur-Bindungsbeziehung aus den Messungen abzuleiten.



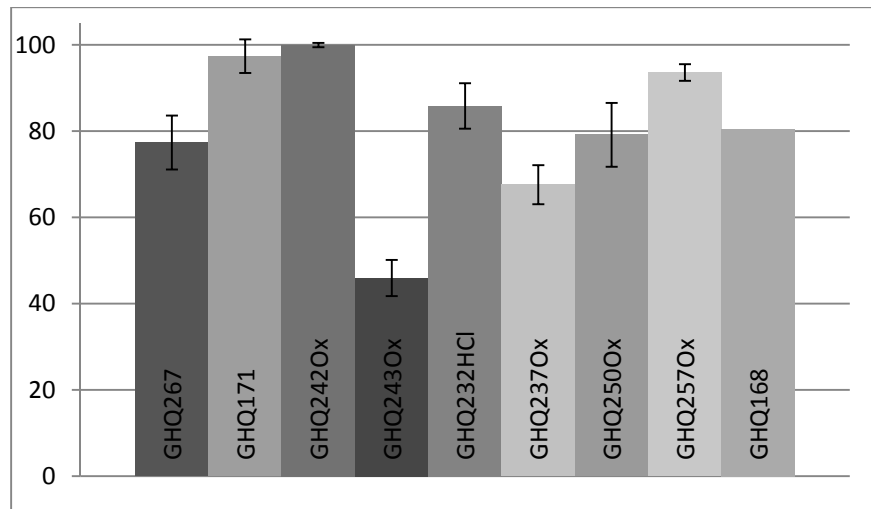


Abb. 59: Proteinbindung der bestimmten Fluorchinolone

Die auffälligsten Unterschiede der beiden Verbindungen sind, dass GHQ237 kein Fluorchinolon, sondern ein Naphthyridin-Derivat mit einem Stickstoff an der Position 6 ist und dass GHQ243 statt einer *n*-Butyl- eine *N,N*-Dimethylaminoethylseitenkette an Position 1 aufweist [Abb. 60]. GHQ168 müsste folglich eine deutlich höhere Bindung als die beiden anderen Substanzen aufweisen, da es in diesen beiden Positionen so substituiert ist, wie es bei den höher bindenden Verbindungen der Fall ist [Abb. 60]. Die Messergebnisse deuten darauf hin, dass dies so ist. Allerdings basiert die Messung von GHQ168, wie oben erläutert, auf einer wenig aussagekräftigen Einzelmessung [4.5.4].

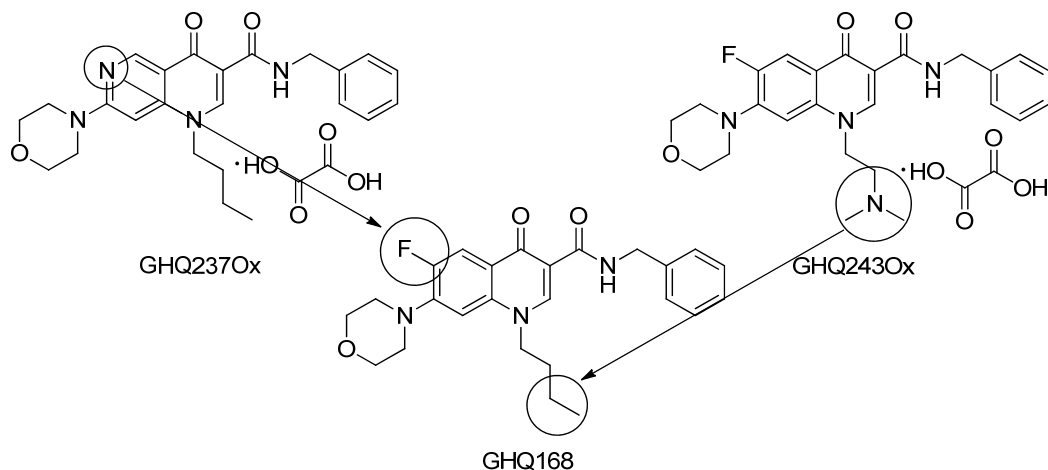


Abb. 60: Strukturelle Unterschiede der Verbindungen GHQ237Ox, GHQ243OX und GHQ168

Eine Vorhersage für die wahrscheinliche Proteinbindung anhand der Struktur eines Fluorchinolons ist somit nicht möglich.



## 5. Zusammenfassung

Die Plasmaproteine dienen dem Körper u.a. als Transportproteine. Dem Serumalbumin kommt hierbei die größte Bedeutung zu. Aufgrund seiner Aufgabe weist es eine Reihe unterschiedlicher Bindungsstellen für eine Vielzahl unterschiedlichster Liganden auf, wobei die Bindung von Substanzen sowohl an spezifischen Stellen als auch unspezifisch erfolgen kann. Das Ausmaß dieser Bindungen hat Einfluss auf andere pharmakokinetische Parameter, wie die Bioverfügbarkeit und die Elimination eines Arzneistoffes.

Treten mehrere Stoffe in Wechselwirkung mit dem Albumin, so können sich diese gegenseitig in ihrer Bindung beeinflussen. Das Ausmaß der Beeinflussung ist von der Höhe der Bindung der einzelnen Stoffe und dem zugrunde liegenden Bindungsmechanismus abhängig. Die klinische Relevanz der Beeinflussung hängt von der therapeutischen Breite und von zusätzlich auftretenden Wechselwirkungen, der Substanzen wie z.B. wechselseitige Inhibition der Stoffwechsellzyme der Substanzen ab.

Für die experimentelle Bestimmung der Proteinbindung stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die sich im Messprinzip, dem apparativen Aufwand und der Simulation der physiologischen Bedingungen unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurde die kontinuierliche Ultrafiltration verwendet. Diese stellt die Bedingungen im Körper nach und ermöglicht die Bindungskinetik besser zu betrachten als andere Verfahren, da durch die Titration des Albumins mit der Arzneistofflösung die Wechselwirkung zwischen Arzneistoff und Protein über einen breiten Konzentrationsverlauf beobachtet werden.

Die Methode wurde von *Heinze* etabliert, von *Albert* weiterentwickelte und jetzt optimiert. Durch die Konstruktion neuer Messzellen sowie der Entwicklung eines neuen Puffersystems konnte sie für Substanzen zugänglich gemacht werden, die aufgrund ihrer hohen Lipophilie und ihrer starken Adsorption an die Messzellen bisher nicht messbar waren.

Darüber hinaus wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

a) Es wurde die gegenseitige Verdrängung von zwei Arzneistoffen aus der Proteinbindung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich eine Reihe basischer Arzneistoffe durch saure Arzneistoffe verdrängen ließ, so z.B. Imipramin-HCl durch Phenprocoumon. Das dem Phenprocoumon strukturell sehr ähnliche Warfarin rief diese Verdrängung hingegen nicht hervor. Tryptophan, das in HPLC-Experimenten die Bindung von Imipramin-HCl verringerte [117], hatte im Ultrafiltrationsexperiment keinen Einfluss auf dessen Bindung. Die gegenseitige Beeinflussung zweier Stoffe kann folg-

lich sehr unterschiedlich sein und ist schwer vorhersagbar. Des Weiteren sind die Ergebnisse solcher Bestimmungen stark von der gewählten Methode abhängig und dadurch nur schwer zu vergleichen. Aufgrund der komplexen und uneinheitlichen Wechselwirkungen der basischen und sauren Arzneistoffe in Bezug auf ihre Bindung, kann davon ausgegangen werden, dass basische Arzneistoffe eine Bindestelle an Albumin besitzen. Jedoch lässt sich aus der vorliegenden Messung nicht beurteilen, wie spezifisch basische Stoffe an Albumin binden.

b) Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Derivate des Acetylcysteins, die kovalent an Cys34 binden können, unterschiedliche Veränderung im Bindungsverhalten von Albumin hervorrufen. So nahm die Bindung des Diphenhydraminhydrochlorids in Gegenwart von äquimolaren Mengen Acetylcystein und Cysteamin ab, während die Anwesenheit von Acetylcysteamin den gegenteiligen Effekt hatte. Dies zeigt, dass der Veränderung der Bindung ein komplexerer Zusammenhang als die reine Belegung des Cys34 zugrunde liegen muss.

c) Unterschiede in der Proteinbindung von Ephedrin und seiner Stereoisomere konnten mittels kontinuierlicher Ultrafiltration bestätigt werden. Die Abweichungen in den Ergebnissen in Bezug auf andere Bestimmungsmethoden [130-132] zeigten erneut, wie stark die Messung der Proteinbindung von den Versuchsbedingungen abhängt.

d) Für die Messung des antiinfektiven Bisnaphthalimids MT02 wurde eine Messzelle aus PVDF konstruiert, die weniger Wechselwirkungen mit adsorbierenden Arzneistoffen zeigt. Aufgrund der Unbeständigkeit der Substanz unter den Versuchsbedingungen war die Messung dennoch nicht möglich.

e) Die Proteinbindung des Naphthylisochinolins GB-AP05 konnte mit Hilfe der bereits erwähnten neu konstruierten Messzelle bestimmt werden. Die Bindung war deutlich höher als bei anderen Vertretern dieser Gruppe. Die Ursache hierfür könnte in der Adsorption der Substanz an die Messzellen begründet sein. Da GB-AP05 stark an den Kunststoff PMMA binden kann, der aufgrund seiner Beschaffenheit vorwiegend Wasserstoffbrückenbindungen für eine Adsorption bereitstellen kann, ist eine hohe Bindung an Albumin, das eine Vielzahl von Bindestellen mit unterschiedlichen chemischen Gruppen aufweist, nicht unwahrscheinlich.

f) Für eine Reihe von Fluorchinoloncarboxamiden wurde das Ausmaß ihrer Proteinbindung bestimmt. Dieses lag in fast allen Fällen bei 80 % oder höher. Die einzigen Ausnahmen, GHQ237Ox und GHQ243Ox, legen den Schluss nahe, dass eine basi-

sche Seitenkette in Position 1 und das Fehlen des Fluorsubstituenten in Position 6 die Bindung reduzieren können.

Da nicht alle Substanzen in der Pufferlösung gelöst werden konnten, wurde neben dem bereits durch *Albert* etablierten DMSO-haltigen Puffer ein Polysorbat-20-haltiger entwickelt, in dem hoch lipophile Substanzen mizellar gelöst werden können. Durch Bestimmung der Proteinbindung von Carbamazepin konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der Mizellen keinen Einfluss auf die Bindung hat, d.h. im Umkehrschluss dass die Methode zur Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung geeignet ist.

## 6. Summary

Amongst others, plasma proteins serve as transport proteins in the human body, serumalbumin being the most important of them. Serumalbumin features a set of different binding sites for numerous different ligands, enabling the binding of substances either to specific binding sites or in unspecific manners. The extent of protein binding affects other pharmacokinetic parameters such as bioavailability and the elimination of a drug.

In the case several substances interact with albumin simultaneously, they can mutually interfere with their respective binding behaviors. The degree of interference depends on the extent of the protein binding of the single substances and the underlying binding characteristics. The clinical relevance depends on the therapeutic index and on additional interactions of the substances with corresponding enzymes. In order to evaluate the protein binding experimentally, a number of different methods can be used which differ in the principle of the determination, technical effort and the simulation of the physiological conditions. The measurements in this present thesis were performed using the continuous ultra filtration (CUF). CUF is able to imitate the conditions within the human body and displays binding kinetics in a better way than other available procedures do. This is because titration of albumin with a drug solution allows studying of the interactions between the active substance and the protein within a wide range of concentration.

In the context of this thesis, the procedures established by Heinze and refined by Albert were optimized. By constructing of new measuring cells as well as developing a new buffer system, the procedure could be expanded onto substances which could previously not be measured due to their high lipophilicity and their strong adsorption to the measuring cells.

Apart from that, the following measurements were conducted:

a) The mutual displacements of two pharmaceuticals from protein bindings were analyzed. It could be shown that a number of cationic drugs can be displaced by acidic drugs, e.g. imipramin-HCl can be displaced by phenprocoumon. In turn, Warfarin resembling phenprocoumon did not cause a displacement. Tryptophan, though being able to reduce binding of Imipramin-HCl in HPLC experiments, had no impact on the binding of Imipramin-HCl when ultra-filtrated [117]. Mutual displacement of two substances can therefore take place in quite different ways and is difficult to predict. Furthermore, the results of these measurements strongly depend on the chosen procedure which makes it difficult to compare them to each other. Due to the complex and



inconsistent interactions between albumin and anionic acidic drugs with regard to their bindings, it can be assumed that cationic basic drugs have a binding site for albumin. The measurement, however, could not show a specific affinity between the binding site and cationic substances.

b) It could be shown that different derivatives of acetylcysteine, which are able to bind covalently to Cys34, can cause different changes in the binding behaviors of albumin. The affinity of diphenhydramin-HCl to albumin, for instance, decreased in the presence of equimolar amounts of acetylcysteine and cysteamine whereas the presence of acetylcysteamine has an opposite effect. This shows that the changing of the binding must be caused by a more complex process than the simple occupation of Cys34 only.

c) Differences in the protein binding of ephedrine and its stereoisomers could be confirmed by using CUF. Comparing the results of CUF with those of other methods [130-132] again revealed that the extent of protein binding is highly dependent on the experimental conditions.

d) The measurement of the antiinfective bisnaphthalimide MT02 needed the design of a new ultra filtration cell with a lower degree of interaction with adsorbing pharmaceuticals. However, the measurements failed due to the instability of the substance under test conditions.

e) The extent of protein binding of naphthylisoquinoline GB-AP05 could be determined using the aforementioned ultra filtration cell. The binding was significantly higher than those of other compounds of this group. However this was due to the adsorption of the substance to the ultra filtration cell. Because GB-AP05 has a strong preference to bind to the synthetical PMMA which mainly provides hydrogen bonds for adsorption it is quite likely for GB-AP05 to bind to albumin which has numerous binding sites for various chemical groups.

f) Finally the degree of protein binding of fluoroquinolonecarboxamids was determined. Mostly the extent of protein binding was up to 80% and higher. The only exceptions, GHQ237Ox and GHQ243Ox suggest that a basic side group in position 1 and the missing of a fluorine substituent in position 6 reduce the binding.

Due to the fact that some of the substances could not be dissolved in the buffer solution, a buffer containing polysorbate-20 was developed which enables the micellar dissolving of highly lipophilic substances. By determination of the protein binding of

## Summary

---

carbamazepin it could be shown that the presence of the micell had no impact on the binding and this buffer can be used for determination of the extent of protein binding.

## 7. Anhang

## 7.1. Veröffentlichungen

### Posterpräsentationen:

Hörst A.<sup>1</sup>, Ohlsen K.<sup>2</sup>, Holzgrabe U.<sup>1</sup>

„Determination of quaternary naphthalimide derivatives in plasma”

<sup>1</sup> Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg

<sup>2</sup> Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg

DPhG-Jahrestagung 2009 in Jena, D

Hörst, A.<sup>1</sup>, Albert, C.<sup>2</sup>, Holzgrabe, U.<sup>1</sup> Bringmann, G.<sup>2</sup>

“Testing of ultrafiltration cells made of polyvinylidene fluoride for determination of protein binding of quaternary and bisquaternary compounds”

<sup>1</sup> Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg

<sup>2</sup> Lehrstuhl für Organische Chemie, Universität Würzburg

DPhG-Jahrestagung 2010 in Braunschweig, D

## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetylcystein	HSA	Humanes Serumalbumin
ACN	Acetonitril	$K_a$	Proteinbindungskonstante
AGP	$\alpha_1$ -Glykoprotein	MNBS	4-Mercapto-2-nitrobenzoesäure
BSA	bovines Serumalbumin	MTX	Methotrexat
CE	Kapillarelektrophorese	MWCO	Molecular weight cut off
COX	Cyclooxygenase	PC	Polycarbonat
Cys	Cystein	PC	Personal computer
Da	Dalton	PES	Polyethersulfon
DAD	Diodenarray-Detektor	pK <sub>s</sub>	Säurekonstante
DMF	Dimethylformamid	PMMA	Polymethylmethacrylat
DMSO	Dimethylsulfoxid	PVDF	Polymethylmethacrylat
et al.	et alia (und andere)	PTFE	Polytetrafluorethylen
*-HCl	*hydrochlorid	SDS	Natriumdodecylsulfat
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	Trp	Tryptophan
HMA	Humanes Mercaptalbumin	UV	Ultraviolett
HNA	Humanes Nonmercaptalbumin	Vis	Visible
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie		

## 7.3. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Bindung exogener Liganden an die Bindestellen des Albumins
- Tab. 2: Unterschiedliche Zusammensetzung von HSA und BSA [14]
- Tab. 3: Scheinbare Verteilungsvolumina einiger Arzneistoffe [1]
- Tab. 4: Beispiele klinisch relevanter Wechselwirkungen bei denen eine Verdrängungen auftritt [59]
- Tab. 5: pK<sub>s</sub>-Werte der vermessenen Substanzen
- Tab. 6: Ladung der sauren und Basischen Aminosäuren des BSAs bei pH 7.4 und 9.0 (\* nur die SH-Gruppe des Cys34 liegt frei vor, die restlichen 34 Cysteine sind in Disulfidbrücken gebunden)
- Tab. 7: Zusammenfassung der unterschiedlichen Untersuchungen zur Bestimmung Proteinbindung der Ephedraalkaloide
- Tab. 8: Proteinbindung der Naphtylisochinoline [96]
- Tab. 9: Lösungsversuche von GHQ168 mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln
- Tab. 10: Lösungsversuche mit organischen Puffersubstanzen mit und ohne DMSO-Zusatz (TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, TAPS: N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonsäure)

## 7.4. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Verteilungsräume des Körpers und Zusammensetzung des Plasmaräumes [1]  
Abb. 2: Aminosäuresequenz des humanen Serumalbumins, unterteilt in drei Domänen und sechs Subdomänen [12, 13]  
Abb. 3: Dreidimensionale Strukturen des humanen (links) und bovinen (rechts) Serumalbumins [15, 16]  
Abb. 4: Reaktionsgleichung der Proteinbindung  
Abb. 5: Scatchard-Plot für eine Bindungsstelle (links) und zwei Bindungsstellen (rechts), die Steigungen  $m$  entsprechen den negativen Bindungskonstanten  
Abb. 6: Verdrängung von Warfarin aus der Bindung zu HSA durch Phenylbutazon  
Abb. 7: Reduktion der Bindung von Warfarin an HAS durch Modulation mit Myristinsäure  
Abb. 8: Blockade des aktiven Zentrums der COX durch Acetylsalicylsäure  
Abb. 9: Schematische Darstellung der Gleichgewichtsdialyse (links), der Ultrazentrifugation (Mitte) und der Ultrafiltration (rechts), [A]: Arzneistoff, [P]: Protein, [AP]: Arzneistoff-Protein-Komplex  
Abb. 10: Chromatogramme der Frontalanalyse mit mobilem (A) und immobilisiertem (B) Protein; 1: freies Protein, 2: Protein-Wirkstoffkomplex, 3: freier Wirkstoff  
Abb. 11: Migrationsreihenfolge bei der Frontalanalyse eines kationisch (links) und eines anionisch (rechts) vorliegenden Arzneistoffes [A<sup>+</sup>]: Arzneistoff kationisch, [A<sup>-</sup>]: Arzneistoff anionisch, [AP]: Arzneistoff-Proteinkomplex, [P]: freies Protein  
Abb. 12: Chromatogramm der Bestimmung mittels Hummel-Dreyer-Methode  
Abb. 13: Schematischer Aufbau der Messanlage zur kontinuierlichen Ultrafiltration  
Abb. 14: Belegung der Positionen des 6-Wege-Ventils  
Abb. 15: Positionen des Injektionsventils  
Abb. 16: Schematischer Aufbau der Messzellen  
Abb. 17: Funktion der Rührscheibe in Draufsicht (links) und Seitenansicht (Mitte) des Unterteils; Messzelle eingespannt in die Zellenhalterung (rechts)  
Abb. 18: Modifizierte Zelle für Messungen bei höherem Druck (links); schlecht durchmischte Totzone bei der Verwendung der PMMA-Zellen  
Abb. 19: Strukturen von Polycarbonat (links) und Polyethersulfon (rechts)  
Abb. 20: Das Protein wird teilweise zurückgehalten (links), der Proteindurchgang ist erhöht, ohne dass ein undichte Stelle direkt zu erkennen ist (rechts).  
Abb. 21: Das Protein wird teilweise zurückgehalten (links), der Proteindurchgang ist erhöht, das am Filter vorbeifließende Protein ist in der Aufsicht deutlich zu erkennen (rechts).  
Abb. 22: Das Protein wird nicht zurückgehalten (links), der Proteindurchgang ist erhöht. Das Protein fließt über weite Teile der an der Membran vorbei (rechts).  
Abb. 23: Steuerung der Anlage  
Abb. 24: Aufbau der Menüfunktionen "Dateneingabe", "Datenänderung" und "Datenaufnahme"  
Abb. 25: Aufbau und Funktion der "Methoden-Erstellung" am Beispiel der Substanz- und Protein-Datenmaske  
Abb. 26: Aufbau des "Test-Programms"  
Abb. 27: Entscheidungsbaum für die Herstellung der Wirkstofflösung  
Abb. 28: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs  
Abb. 29: Wirkstoffkurve (oben) und Spülkurve (unten) aus Versuchsteil 3

- Abb. 30: Beispiele für Proteinspülkurven
- Abb. 31: Wirkstoffkurve mit und ohne Protein übereinander gelegt, die Fläche zwischen beiden Kurven gibt das Ausmaß der Proteinbindung an.
- Abb. 32: Graphische Darstellung der Titrationskurvenberechnung; T: Titrationskurven [schwarz gepunktet: experimentell, schwarz durchgezogen: theoretisch], B: -lg(gebundene Wirkstoffkonzentration) [hellblau], D: Differenzkurve [rot], 1: Bindungskonstante [schwarz]
- Abb. 33: Scatchard-Plot; S: Messpunkte [gepunktet] und Regressionsgerade [durchgezogen]
- Abb. 34: UV-Spektrum des Diphenhydramin-HCl und der Salicylsäure
- Abb. 35: Proteinbindungen der kationischen Arzneistoffe in der Einzelmessung und im Verdrängungsexperiment; Verdrängungspartner in Klammern. (AM: Ambroxol-HCl, DP: Diphenhydramin-HCl, DY: Dipyridamol, Fu: Furosemid, IM: Imipramin-HCl, NE: Nefopam-HCl, PH: Phenprocoumon, PI: Piroxicam, SA: Salicylsäure, TR: Tryptophan, WA: Warfarin)
- Abb. 36: Schematische Darstellung der Verdrängungsexperimente der Paare Diphenhydramin-HCl/Salicylsäure, Ambroxol-HCl/Furosemid [A], Dipyridamol/Piroxicam [B] und Salicylsäure/Ibuprofen [C], (S1: Sudlow-I; S2: Sudlow-II)
- Abb. 37: Schematische Darstellung der Verdrängungsexperimente der Paare Imipramin-HCl/Phenprocoumon [A] und Paare Imipramin-HCl/Warfarin bzw. Paare Imipramin-HCl/Tryptophan [B], (S1: Sudlow-I; S2: Sudlow-II)
- Abb. 38: Schematische Darstellung des Verdrängungsexperiments des Paares Ambroxol-HCl/Nefopam-HCl, (S1: Sudlow-I; S2: Sudlow-II)
- Abb. 39: Cys34 im Mercaptalbumin [HMA], Nonmercaptalbumin [HNA] und oxidiert zu Sulfin- und Sulfonsäure
- Abb. 40: Reversible und irreversible Bindung von Substanzen an Cys34 des Albumins
- Abb. 41: MNBS (links) Thiosalicylsäure (rechts)
- Abb. 42: Synthese des Nicotinsäureamids des Cysteins
- Abb. 43: Acetylcystein und seine First-Pass-Metabolite
- Abb. 44: Proteinbindungen der kationischen Arzneistoffe in der Einzelmessung und im Verdrängungsexperiment; Verdrängungspartner in Klammern. (ACA: Acetylcysteamin, ACC: Acetylcystein, AM: Ambroxol-HCl, CA: Cysteamin, DP: Diphenhydramin-HCl, DY: Dipyridamol, EA: Etacrynsäure)
- Abb. 45: Acetylcysteamin (links), Acetylcystein (Mitte) und Cysteamin (rechts)
- Abb. 46: Addukte von ACC, Cysteamin und Acetylcysteamin mit Cys34 bei pH 7.4
- Abb. 47: Übersicht der Ephedraalkaloide und ihre stereochemische Beziehung zueinander
- Abb. 48: Proteinbindung der Ephedraalkaloide (mEP: (-)-Ephedrin, pEP: (+)-Ephedrin, rEP: racemisches Ephedrin, pPE: (+)-Pseudoephedrin, mPE: (-)-Pseudoephedrin, rPE: racemisches Pseudoephedrin)
- Abb. 49: Vergleich zwischen einfach sigmoidem und biphasischem Kurvenverlauf
- Abb. 50: Ammoniumstruktur von MT02 und analoge Verbindungen
- Abb. 51: WB64 und seine Synthesevorstufe
- Abb. 52: Strukturen der Kunststoffe für die Herstellung der Messzellen
- Abb. 53: Norfloxacin (links) und Moxifloxacin (rechts)
- Abb. 54: GHQ168
- Abb. 55: Polysorbat 20
- Abb. 56: Verteilung der Substanz GHQ168 zwischen den Kompartimenten des Puffers
- Abb. 57: Carbamazepin (links) und Nifedipin (rechts)

Abb. 58: SDS Gelelektrophorese der Proteine HSA und BSA (1: HSA unbehandelt, 2+3: HSA mit Polysorbat 20 behandelt, 4: Laufstandard, 5: BSA unbehandelt, 6+7: BSA mit Polysorbat 20 behandelt)

Abb. 59: Proteinbindung der bestimmten Fluorchinolone

Abb. 60: Strukturelle Unterschiede der Verbindungen GHQ237Ox, GHQ243OX und GHQ168



## 7.5. SOP M-A4-001



SOP M-A4-001  
Bestimmung der Proteinbindung

Autor: Hörst/Bruhn  
Seitenzahlen: 7

### Inhalt

1 Zweck	1
2 Einsatzbereich	2
3 Meßprinzip, Grundlagen	2
4 Verfahrenskenndaten, Validierung	2
5 Geräte, Geräte-Einstellungen und Material	2
6 Chemikalien	2
6.1 Medien	2
6.2 Chemikalien	3
7 Durchführung der Messung	3
7.1 Auswertung	4
7.2 Angabe der Ergebnisse	5
7.3 Mögliche Störungen	5
8 Validierung / Qualitätssicherung	7
8.1 Kontrollen	7
8.2 Abweichungen	7
8.3 Reproduzierbarkeit	7
9 Mitgeltende Unterlagen	7
10 Literatur	7
11 Anlagen	8

## 1 Zweck

Untersuchung der Proteinbindung von Substanzen.

## 2 Einsatzbereich

Der Test ist für alle im SFB synthetisierten Substanzen anwendbar, sofern sie unter den Versuchsbedingungen löslich sind.

## 3 Meßprinzip, Grundlagen

Durch die Bindung der Substanzen an Plasmaprotein, das in einer Messzelle zurückgehalten wird, eluieren die Substanzen je nach Stärke der Bindung unterschiedlich schnell aus der Messzelle. Die Proteinbindung kann dann durch Vergleich der Elutionszeiten aus einer Messzelle, die kein Plasmaprotein enthält, mit einer Messzelle, die Plasmaprotein enthält, bestimmt werden.

## 4 Verfahrenskenndaten, Validierung

Die Wirkstoffe können in Breichen vermessen werden, in denen ihre Lösungen in Phosphat-Puffer (vgl. 6.1). eine Absorption zwischen 0,2 bis 0,8 AU zeigen.

## 5 Geräte, Geräte-Einstellungen und Material

6-Wege-Ventil	Rheodyne, Modell 5011 (Cotati, CA, USA)
Pumpe	Bischoff, Modell 2250 (Leonberg, Deutschland)
Injektionsventil	Rheodyne, Modell 7010 (Cotati, CA, USA)
Ultrafiltrationszelle	Werkstatt Institut f. Pharmazie und LMC
Ultrafiltrationsmembran	Millipore (Bedford, MA, USA)
UV-Detektor	Knauer, Modell M87 (Berlin, Deutschland) Bischoff, Modell DAD-3L (Leonberg, Deutschland)
Magnetrührer	IKA Labortechnik, RCT basic (Staufen, Deutschland)
pH-Meter	PHM220 Lab pH-Meter Radiometer Analytical SAS (Lyon, Frankreich)
Waage	Kern 770, Forchtenberg, Deutschland
Ultraschallbad	Branson 2510 Heinemann Labortechnik (Schwäbisch Gmünd, Deutschland)

## 6 Chemikalien

### 6.1 Medien

#### Phosphatpuffer

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Dihydrat 4,025 g/l Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Dihydrat 0,800 g/l Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natriumchlorid 5,844 g/l Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

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.

### 6.2 Chemikalien

#### Bovines Serum-Albumin

- Fluka, BioChemika, Fraction V, ≥ 96,0% Art.-Nr. 05488

- Fluka, BioChemika, Fraction V, ≥ 95,0% Art.-Nr. 05484

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

#### Humanes Serum-Albumin

- Calbiochem, Fraction V, High Purity Art.-Nr. 126658

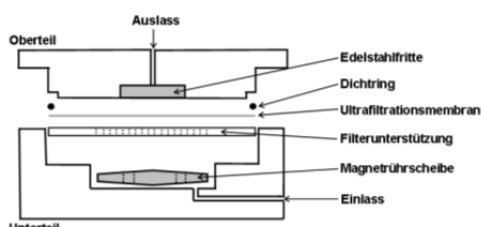
Bezogen über: VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

- Sigma, Fraction V, 96-99% Art.-Nr. A1653

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

DMSO p.a. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

## 7 Durchführung der Messung



**Grafik 1**

Alle Lösungen (Puffer, Wirkstofflösung und Millipore-Wasser) für 30 min. im Ultraschallbad entgasen. Die Fritten für die Position 1, 4, 5 und 6 in Millipore-Wasser, die Fritte der Position 2 in die Wirkstofflösung und die Fritte für die Position 3 in den Puffer hängen. Geräte (Controller, Steuergerät, Pumpe, Detektor und Injektionsventil) einschalten. Pumpe und Controller auf „ext.“ stellen. Programm „Protein WsA“ starten. „Test-Menü“ auswählen und Ventil auf Position 3 (Puffer) schalten. Zelle laut Grafik 1 zusammenbauen. Pumpe im „Test-Menü“ einschalten und Zelle spülen, bis eine konstante Absorption angezeigt wird. Während-

dessen Protein abwägen. Proteineinwaage im Menü „Methodenerstellung“ unter „Protein“ und „ändern“ durch Aufrufen der Datenmaske (Maske 1 = BSA, Maske 2 = HSA) eingeben. Wirkstoffdaten analog unter „Methodenerstellung“ unter „Substanz“ und „ändern“ eingeben. Messwellenlänge am Detektor einstellen. Messzeiten unter „Methodenerstellung“ unter „Hauptversuch“ und „ändern“ eingeben. „Methodenerstellung“ verlassen. Menü „Dateneingabe“ und „neue Serie“ wählen; Versuchsdaten kontrollieren und bestätigen. Bei Erreichen der konstanten Absorption, „Zero“-Taste am Detektor drücken und mit dem Menüpunkt „Datenaufnahme“ den Versuch starten. Versuch stoppt bei Proteininjektion, Protein in Puffer durch leichtes Schwenken (Schaumbildung!!!) lösen. Protein blasenfrei in eine Spritze aufziehen, in das Injektionsventil injizieren und dieses auf „inject“ stellen. Proteininjektion am Computer bestätigen. Gegen Ende des Spülschrittes Injektionsventil auf „load“ zurückstellen. Nach Ende des Versuchs Zelle ausbauen und mit Millipore-Wasser spülen, Ultrafiltrationsmembran für 10 min. in 0,1 M NaOH waschen, über Nacht in 10%iger EtOH-Lösung aufbewahren. Injektionsventil gründlich mit Millipore-Wasser spülen.

### 7.1 Auswertung

Versuchsdaten in Ordner Nickel kopieren

Programm htbWin öffnen

„continue“ drücken

Drucker bestätigen, Alt+F2 drücken

Programm NPBUW03.prg auswählen und mit „Auswahl ok“ 2mal bestätigen

Drucker bestätigen

Schwarz-Weiß-Drucker auswählen und bestätigen

versuch umformatieren auswählen und mit „Auswahl ok“ bestätigen

Ordner Nickel auswählen und den entsprechenden Datensatz auswählen mit „ok“ bestätigen

Datensätze nochmals auswählen und mit „Auswahl ok“ bestätigen

Speicherbuchstabe auswählen und mit „Auswahl ok“ bestätigen

Error 177 bestätigen

Programm Ende bestätigen

Frage nach den Ausdrucken mit „Nein“ beantworten

Arbeiten mit dem Programm beenden auswählen und mit „Auswahl ok“ und ja bestätigen

Versuchsdaten in Ordner Nickel kopieren

Programm htbWin öffnen

„continue“ drücken

Drucker bestätigen, Alt+F2 drücken

Programm Npbw127.prg auswählen und mit „Auswahl ok“ 2mal bestätigen

Drucker bestätigen

Schwarz-Weiß-Drucker auswählen und bestätigen

„Proteinbindung aus Ultrafiltrationskurven berechnen“ auswählen und mit „Auswahl ok“ bestätigen

Versuchsordner und Versuch wählen und mit „ok“ bestätigen

„Versuch auswerten: Parameter frei wählen“ auswählen und mit „Auswahl ok“

Kurven mit „Ja“ bestätigen

Wahl der zu druckenden Grafiken auswählen und mit Auswahl „ok“ und „nein“ bestätigen

1. Fenster ausdrucken und „Ende“ drücken (dieses fasst die Versuchsdaten und die Iterationen zusammen)

2. Fenster ausdrucken und „Ende“ drücken (dieses gibt die Anzahl und Art der Bindungsstellen an, die die niedrigste Standardabweichung aufweisen)

Die Iteration mit der niedrigsten Standardabweichung auswählen und auf dem Bildschirm alle Fragen, nach ausdrucken mit „nein“ beantworten, bis die zur gewollten Iteration erscheinen, diese mit „Ja“ ausdrucken. (Der Ausdruck gibt die Proteinbindung in Prozent an.) Scatchard Plot ausdrucken (gibt Bindungskonstante an) und Ausdruck von weiteren Seiten/Grafiken mit Nein beantworten

Bearbeitung beenden auswählen und mit „Auswahl ok“ bestätigen

Arbeiten mit diesem Programm beendet auswählen und mit „Auswahl ok“ und ja bestätigen

Den Ausdrucken, die Anzahl der unabhängigen und abhängigen Bindungsstellen sowie die Bindungskonstanten und die Gesamtbindung entnehmen. Von diesen wird jeweils der Durchschnitt aus 6 Einzelmessungen und die Standardabweichung bestimmt.

## 7.2 Angabe der Ergebnisse

Als Ergebnis wird die Proteinbindung in %, die Anzahl der abhängigen und unabhängigen Bindungsstellen der Substanzen an das Protein, sowie deren pK-Werte angegeben.

## 7.3 Mögliche Störungen

### Abfall des Pumpendrucks während der Messung

Ursache: Verstopftes 6-Wege-Ventil

Lösung: 6-Wege-Ventil reinigen, hierzu die 3 Schrauben des Ventils lösen und das Oberteil nach vorne abziehen. Danach die Einzelteile mit einem Pinsel vom Abrieb befreien.

Anschließend das Oberteil wieder aufsetzen und festschrauben, hierbei darauf achten, dass die Schrauben nicht zu fest angezogen werden, da dies Abrieb und somit Verstopfungen begünstigt. Anschließend das Purgeventil der Pumpe öffnen, den 3-Wege-Hahn auf die Leere Position stellen und an dieser mit Hilfe eine Einmalspritze Flüssigkeit ansaugen. Dies in allen 6 Stellungen des 6-WegeVentils wiederholen. Anschließend sich evtl. in den Leitungen befindliche Blasen durch anschalten der Pumpe herauspülen. Zum Schluss ggf. Pumpe abschalten und Purgeventil schließen.

### **Anstieg des Pumpendrucks während der Messung**

Ursache: Verstopfung eines Bauteils

Lösung: Lokalisierung der Verstopfung durch schrittweisen Abbau der Einzelteile. Verantwortliches Bauteil entweder ersetzen oder durch manuelles Spülen mit Hilfe einer Einmalspritze reinigen. Ist das 6-Wege-Ventil verstopft wie oben beschrieben vorgehen.

### **Proteindurchgang nach der Injektion ist zu hoch**

Ursache: Defekte Membran oder undichte Zelle

Lösung: Ist die Membran defekt, eine neue nach den Angaben des Herstellers konditionieren und die Messung mit dieser wiederholen. Ist die Messzelle undicht, Messzelle auseinanderbauen und reinigen. Danach den Versuch wiederholen.

### **Keine Kommunikation zwischen Controller und den Bauteilen Anlage**

Ursache: „ext/int“-Schalter des Bauteils steht auf „int“

Lösung: Schalter auf „ext“ stellen

### **Formatierung der Messdaten bricht mit der Meldung „overflow“ ab**

Ursache: Formatierungsordner enthält zu viele Datensätze

Lösung: Nicht mehr benötigte Datensätze in einen anderen Ordner verschieben.

## **8 Validierung / Qualitätssicherung**

### **8.1 Kontrollen**

Die Proteinbindung von Phenprocoumon (Wörwag Pharma GmbH & Co. KG, Böblingen, Deutschland) wird einmal monatlich bestimmt und mit den bisherigen Bestimmungen verglichen. Die Abweichung der Proteinbindung darf nicht mehr als 1% abweichen.

Flußkontrolle der Pumpe wird täglich überprüft. Nach 60 min. Anlagenbetrieb wird geprüft, ob 30 ml Pufferlösung im Abfallgefäß aufgefangen wurden.

Die Detektoren werden halbjährlich nach der Vorschrift 2.2.25 UV-Vis-Spektroskopie des Ph.Eur.6.0 (Europäisches Direktorat für Qualität von Arzneimitteln des Europarats, Strassburg, Frankreich, 2008) geprüft.

Die Waage wird täglich kalibriert und jährlich durch den Hersteller überprüft.

### **8.2 Abweichungen**

Abweichungen vom hier beschriebenen Vorgehen bzw. Auffälligkeiten während der Messung werden ausführlich in der Ergebnisdatei protokolliert und der Projektleiter hiervon in Kenntnis gesetzt. Bei offensichtlichen Fehlern, die das Ergebnis beeinflussen, wird die Untersuchung wiederholt. Die Beurteilung der Abweichung liegt im Ermessen und in der Verantwortung des Projektleiters. Es werden die Ursachen der Abweichung analysiert und Maßnahmen definiert, um die Abweichung in Zukunft zu vermeiden.

### **8.3 Reproduzierbarkeit**

Die Präzision der Messung wird wie oben beschrieben durch die Bestimmung der Proteinbindung von Phenprocoumon ermittelt.

## **9 Mitgeltende Unterlagen**

Füllt QM aus

### **10 Literatur**

Nicht belegt

### **11 Anlagen**

Nicht belegt





## 8. Literaturverzeichnis

1. Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, **2009**, 9. Auflage, Elsevier GmbH, München
2. Schmidt, R., Lang, F., Heckmann, M., *Physiologie des Menschen*, **2010**, 31. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg
3. Klinke, R., Pape, H., Kurtz, A., Silbernagel, S., *Physiologie*, **2010**, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
4. Schmid, K., *Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma*, J. Am. Chem. Soc., **1950**, 72, 2816
5. Hochepleid, T., Berger, F.G., Baumann, H., Libert, C.,  *$\alpha$ 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties*, Cytokine Growth Factor Rev., **2003**, 14(1), 25-34
6. Fournier, T., Medjoubi, N.N., Porquet, D., *Alpha-1-acid glycoprotein*, Biochim Biophys Acta, **2000**, 1482(1-2), 157-171
7. Kremer, J.M.H., Wilting, J., Janssen, L.H.M., *Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease*, Pharmacol. Rev., **1988**, 40(1), 1-47
8. Chauvelot-Moachon, L., Tallet, F., Durlach-Misteli, C., Giroud, J.P., *Delipidation of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. Propranolol binding to this glycoprotein and its modification by extracted material and exogenous lipids*, J. Pharmacol. Methods, **1988**, 20(1), 15-28
9. Appelgren, C., Borg, K.O., Elofsson, R., Johansson, K.A., *Binding of adrenergic beta receptor antagonists to human serum albumin*, Acta Pharm. Suec., **1974**, 11(4), 325-332
10. Hein, K.L., Kragh-Hansen, U., Morth, J.P., Jeppesen, M.D., Otzen, D., Moller, J.V., Nissen, P., *Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin*, J. Struct. Biol., **2010**, 171(3), 353-360
11. Taheri, S., Cogswell, L.P., III, Gent, A., Strichartz, G.R., *Hydrophobic and ionic factors in the binding of local anesthetics to the major variant of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein*, J. Pharmacol. Exp. Ther., **2003**, 304(1), 71-80
12. Meloun, B., Moravek, L., Kostka, V., *Complete amino acid sequence of human serum albumin*, FEBS Lett., **1975**, 58(1), 134-137
13. Dugaiczky, A., Law, S.W., Dennison, O.E., *Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **1982**, 79(1), 71-75
14. Peters, T., *All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, **1996**, 1. Auflage, Academic Press, SanDiego
15. Majorek, K.A., Porebski, P.J., Dayal, A., Zimmerman, M.D., Jablonska, K., Stewart, A.J., Chruszcz, M., Minor, W., *Structural and immunologic*

- characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins*, Mol. Immunol., **2012**, 52(3-4), 174-182
16. 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(6), 439-446
  17. He, X.M., Carter, D.C., *Atomic structure and chemistry of human serum albumin*, Nature (London), **1992**, 358(6383), 209-215
  18. Jacobsen, J.G., *Binding of bilirubin to human serum albumin; determination of the dissociation constants*, FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett., **1969**, 5(2), 112-114
  19. Richardson, K.S.C., Nowaczynski, W., Genest, J., *Specific aldosterone-binding proteins in human plasma: partial characterization*, J. Steroid Biochem., **1977**, 8(9), 951-957
  20. 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(9), 827-835
  21. Sudlow, G., Birkett, D.J., Wade, D.N., *Characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin*, Mol. Pharmacol., **1975**, 11(6), 824-832
  22. Sudlow, G., Birkett, D.J., Wade, D.N., *Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin*, Mol. Pharmacol., **1976**, 12(6), 1052-1061
  23. Kragh-Hansen, U., *Evidence for a large and flexible region of human serum albumin possessing high affinity binding sites for salicylate, warfarin, and other ligands*, Mol. Pharmacol., **1988**, 34(2), 160-171
  24. Anton, A.H., *Drug-protein binding. IV. Modulation of binding. Increasing activity of sulfonamides with displacing agents: a review*, Ann N Y Acad Sci, **1973**, 226, 273-292
  25. Pinkerton, T.C., Koeplinger, K.A., *Determination of warfarin-human serum albumin protein binding parameters by an improved Hummel-Dreyer high-performance liquid chromatographic method using internal surface reversed-phase columns*, Anal. Chem., **1990**, 62(19), 2114-2122
  26. Montero, M.T., Pouplana, R., Valls, O., Garcia, S., *On the binding of cinmetacin and indomethacin to human serum albumin*, J. Pharm. Pharmacol., **1986**, 38(12), 925-927
  27. Kragh-Hansen, U., *Molecular aspects of ligand binding to serum albumin*, Pharmacol Rev, **1981**, 33(1), 17-53
  28. Honore, B., Brodersen, R., *Albumin binding of antiinflammatory drugs. Utility of a site-oriented versus a stoichiometric analysis*, Mol. Pharmacol., **1984**, 25(1), 137-150

29. Meisner, H., Taylor, S., *Antilipolytic effects of chlorophenoxyisobutyrate and warfarin in adipocytes*, J Lipid Res, **1978**, 19(8), 1025-1031
30. Fehske, K.J., Schlaefer, U., Wollert, U., Mueller, W.E., *Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone*, Mol. Pharmacol., **1982**, 21(2), 387-393
31. Yamasaki, K., Maruyama, T., Takadate, A., Suenaga, A., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M., *Characterization of site I of human serum albumin using spectroscopic analyses: Locational relations between regions Ib and Ic of site I*, J. Pharm. Sci., **2004**, 93(12), 3004-3012
32. 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
33. Bertucci, C., Nanni, B., Raffaelli, A., Salvadori, P., *Chemical modification of human albumin at Cys34 by ethacrynic acid: structural characterization and binding properties*, J. Pharm. Biomed. Anal., **1998**, 18(1,2), 127-136
34. Cohen, M.P., *Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin*, Arch. Biochem. Biophys., **2003**, 419(1), 25-30
35. Ascenzi, P., Bolli, A., di Masi, A., Tundo, G.R., Fanali, G., Coletta, M., Fasano, M., *Isoniazid and rifampicin inhibit allosterically heme binding to albumin and peroxynitrite isomerization by heme-albumin*, JBIC, J. Biol. Inorg. Chem., **2011**, 16(1), 97-108
36. Nakamura, K., Era, S., Ozaki, Y., Sogami, M., Hayashi, T., Murakami, M., *Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy*, FEBS Lett., **1997**, 417(3), 375-378
37. Kosa, T., Maruyama, T., Otagiri, M., *Species differences of serum albumins: I. Drug binding sites*, Pharm. Res., **1997**, 14(11), 1607-1612
38. Schmidt, S., Gonzalez, D., Derendorf, H., *Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics*, J. Pharm. Sci., **2010**, 99(3), 1107-1122
39. Gibaldi, M., Koup, J., *Pharmacokinetic concepts—drug binding, apparent volume of distribution and clearance*, European journal of clinical pharmacology, **1981**, 20(4), 299-305
40. Bertucci, C., Nanni, B., Salvadori, P., *Reversible binding of ethacrynic acid to human serum albumin: difference circular dichroism study*, Chirality, **1999**, 11(1), 33-38
41. Scatchard, G., *The attraction of proteins for small molecules and ions*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **1949**, 51, 660-672

42. Aggeler, P.M., O'Reilly, R.A., Leong, L., Kowitz, P.E., *Potential of anticoagulant effect of warfarin by phenylbutazone*, N. Engl. J. Med., **1967**, 276(9), 496-501
43. 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(1), 38-52
44. Ascenzi, P., Fasano, M., *Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin*, Biophys. Chem., **2010**, 148(1-3), 16-22
45. Rome, L.H., Lands, W.E., Roth, G.J., Majerus, P.W., *Aspirin as a quantitative acetylating reagent for the fatty acid oxygenase that forms prostaglandins*, Prostaglandins, **1976**, 11(1), 23-30
46. Solomon, H.M., Schrogie, J.J., Williams, D., *Displacement of phenylbutazone-14C and warfarin-14C from human albumin by various drugs and fatty acids*, Biochem. Pharmacol., **1968**, 17(1), 143-151
47. Chakrabarti, S.K., *Cooperativity of warfarin binding with human serum albumin induced by free fatty acid anion*, Biochem. Pharmacol., **1978**, 27(5), 739-743
48. O'Reilly, R.A., Goulart, D.A., *Comparative interaction of sulfinpyrazone and phenylbutazone with racemic warfarin: alteration in vivo of free fraction of plasma warfarin*, J. Pharmacol. Exp. Ther., **1981**, 219(3), 691-694
49. O'Reilly, R.A., Trager, W.F., Motley, C.H., Howald, W., *Stereoselective interaction of phenylbutazone with [12C/13C]warfarin pseudoracemates in man*, J Clin Invest, **1980**, 65(3), 746-753
50. 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(6), 669-675
51. O'Reilly, R.A., *Stereoselective interaction of trimethoprim-sulfamethoxazole with the separated enantiomorphs of racemic warfarin in man*, N. Engl. J. Med., **1980**, 302(1), 33-35
52. Sellers, E.M., Koch-Weser, J., Lang, M.L., *Potential of warfarin-induced hypoprothrombinemia by chloral hydrate*, N. Engl. J. Med., **1970**, 283(16), 827-831
53. Udall, J.A., *Clinical implications of warfarin interactions with five sedatives*, Am J Cardiol, **1975**, 35(1), 67-71
54. Hansen, J.M., Christensen, L.K., *Drug interactions with oral sulphonylurea hypoglycaemic drugs*, Drugs, **1977**, 13(1), 24-34
55. Pond, S.M., Birkett, D.J., Wade, D.N., *Mechanisms of inhibition of tolbutamide metabolism: phenylbutazone, oxyphenbutazone, sulfaphenazole*, Clin. Pharmacol. Ther., **1977**, 22(5, Pt. 1), 573-579

56. Liegler, D.G., Henderson, E.S., Hahn, M.A., Oliverio, V.T., *Effect of organic acids on renal clearance of methotrexate in man*, Clin. Pharmacol. Ther., **1969**, 10(6), 849-857
57. Stewart, C.F., Fleming, R.A., Germain, B.F., Seleznick, M.J., Evans, W.E., *Aspirin alters methotrexate disposition in rheumatoid arthritis patients*, Arthritis Rheum, **1991**, 34(12), 1514-1520
58. Perucca, E., Hebdige, S., Frigo, G.M., Gatti, G., Lecchini, S., Crema, A., *Interaction between phenytoin and valproic acid: plasma protein binding and metabolic effects*, Clin. Pharmacol. Ther., **1980**, 28(6), 779-789
59. Rolan, P.E., *Plasma protein binding displacement interactions - why are they still regarded as clinically important?*, Br. J. Clin. Pharmacol., **1994**, 37(2), 125-128
60. Benet, L.Z., Hoener, B.-A., *Changes in plasma protein binding have little clinical relevance*, Clin. Pharmacol. Ther. (St. Louis, MO, U. S.), **2002**, 71(3), 115-121
61. Behm, H.L., Wagner, J.G., *Errors in interpretation of data from equilibrium dialysis protein binding experiments*, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., **1979**, 26(1), 145-160
62. Kochansky, C.J., McMasters, D.R., Lu, P., Koeplinger, K.A., Kerr, H.H., Shou, M., Korzekwa, K.R., *Impact of pH on Plasma Protein Binding in Equilibrium Dialysis*, Mol. Pharmaceutics, **2008**, 5(3), 438-448
63. van Liempd, S., Morrison, D., Sysmans, L., Nelis, P., Mortishire-Smith, R., *Development and validation of a higher-throughput equilibrium dialysis assay for plasma protein binding*, Jala, **2011**, 16(1), 56-67
64. Villarroel, M.C., Pratz, K.W., Xu, L., Wright, J.J., Smith, B.D., Rudek, M.A., *Plasma protein binding of sorafenib, a multi kinase inhibitor: in vitro and in cancer patients*, Invest. New Drugs, **2012**, 30(6), 2096-2102
65. Wenlock, M.C., Barton, P., Austin, R.P., *A kinetic method for the determination of plasma protein binding of compounds unstable in plasma: Specific application to enalapril*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2011**, 55(3), 385-390
66. Nakashima, M., Takeuchi, N., Hamada, M., Matsuyama, K., Ichikawa, M., Goto, S., *In vivo microdialysis for pharmacokinetic investigations: a plasma protein binding study of valproate in rabbits*, Biol. Pharm. Bull., **1994**, 17(12), 1630-1634
67. Luo, Y., Wu, S., Li, X., Li, P., *LC-ESI-MS-MS Determination of Rat Plasma Protein Binding of Major Flavonoids of Flos Lonicerae Japonicae by Centrifugal Ultrafiltration*, Chromatographia, **2010**, 72(1-2), 71-77
68. Kongshaug, M., Rimington, C., Evensen, J.F., Peng, Q., Moan, J., *Hematoporphyrin diethers. V. Plasma protein binding and photosensitizing efficiency*, Int. J. Biochem., **1990**, 22(10), 1127-1131

69. Fortuna, A., Alves, G., Falcao, A., Soares-da-Silva, P., *Binding of licarbazepine enantiomers to mouse and human plasma proteins*, *Biopharm. Drug Dispos.*, **2010**, 31(5-6), 362-366
70. Goudah, A., Hasabelnaby, S., *Pharmacokinetics and Bioavailability of Moxifloxacin in Calves following Different Routes of Administrations*, *Chemotherapy (Basel, Switz.)*, **2010**, 56(1), 26-31
71. Martinez-Gomez, M.A., Escuder-Gilabert, L., Villanueva-Camanas, R.M., Sagrado, S., Medina-Hernandez, M.J., *Evaluation of enantioselective binding of propanocaine to human serum albumin by ultrafiltration and electrokinetic chromatography under intermediate precision conditions*, *J. Chromatogr., B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2012**, 889-890, 87-94
72. Anger, G.J., Piquette-Miller, M., *Impact of hyperlipidemia on plasma protein binding and hepatic drug transporter and metabolic enzyme regulation in a rat model of gestational diabetes*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2010**, 334(1), 21-32
73. Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G., *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden*, **2007**, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
74. Hage, D.S., Jackson, A., Sobansky, M.R., Schiel, J.E., Yoo, M.J., Joseph, K.S., *Characterization of drug-protein interactions in blood using high-performance affinity chromatography*, *J. Sep. Sci.*, **2009**, 32(5-6), 835-853
75. Kurlbaum, M., Hoegger, P., *Plasma protein binding of polyphenols from maritime pine bark extract (USP)*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2011**, 54(1), 127-132
76. Liu, S., Wang, H., Song, M., Yin, J., Jiang, G., *Study of protein binding and micellar partition of highly hydrophobic molecules in a single system using capillary electrophoresis*, *Electrophoresis*, **2008**, 29(14), 3038-3046
77. Chu, Y.H., Avila, L.Z., Biebuyck, H.A., Whitesides, G.M., *Use of affinity capillary electrophoresis to measure binding constants of ligands to proteins*, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35(15), 2915-2917
78. Wood, G.C., Cooper, P.F., *The application of gel filtration to the study of protein-binding of small molecules*, *Chromatogr Rev*, **1970**, 12(1), 88-107
79. Shibukawa, A., Sawada, T., Nakao, C., Izumi, T., Nakagawa, T., *High-performance frontal analysis for the study of protein binding of troglitazone (CS-045) in albumin solution and in human plasma*, *J. Chromatogr., A*, **1995**, 697(1 + 2), 337-343
80. Yang, J., Hage, D.S., *Role of binding capacity versus binding strength in the separation of chiral compounds on protein-based high-performance liquid chromatography columns. Interactions of D- and L-tryptophan with human serum albumin*, *J. Chromatogr., A*, **1996**, 725(2), 273-285

81. Loun, B., Hage, D.S., *Chiral Separation Mechanisms in Protein-Based HPLC Columns. 1. Thermodynamic Studies of (R)- and (S)-Warfarin Binding to Immobilized Human Serum Albumin*, Anal. Chem., **1994**, 66(21), 3814-3822
82. 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
83. 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
84. Soltes, L., *The Hummel-Dreyer method: Impact in pharmacology*, Biomed. Chromatogr., **2004**, 18(4), 259-271
85. Hummel, J.P., Dreyer, W.J., *Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration*, Biochim. Biophys. Acta, **1962**, 63, 530-532
86. Thuaud, N., Sebille, B., Livertoux, M.H., Bessiere, J., *Determination of diazepam-human serum albumin binding by polarography and high-performance liquid chromatography at different protein concentrations*, J. Chromatogr., **1983**, 282, 509-518
87. Kraak, J.C., Busch, S., Poppe, H., *Study of protein-drug binding using capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr., **1992**, 608(1-2), 257-264
88. Neyroz, P., Bonati, M., *In vitro amiodarone protein binding and its interaction with warfarin*, Experientia, **1985**, 41(3), 361-363
89. Caruso, I.P., Vilegas, W., Fossey, M.A., Cornelio, M.L., *Exploring the binding mechanism of Guaijaverin to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy and computational approach*, Spectrochim. Acta, Part A, **2012**, 97, 449-455
90. Zhu, S., Liu, Y., *Spectroscopic analyses on interaction of Naphazoline hydrochloride with bovine serum albumin*, Spectrochim. Acta, Part A, **2012**, 98, 142-147
91. 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**, 37(3-4), 191-197
92. Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C., *Interaction of Quercetin and Its Conjugate Quercetin 3-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside with Albumin as Determined by NMR Relaxation Data*, J. Nat. Prod., **2008**, 71(2), 175-178
93. Ma, C.-Y., Yang, S.-Y., Zhang, H., Xiang, M.-L., Huang, Q., Wei, Y.-Q., *Prediction models of human plasma protein binding rate and oral bioavailability derived by using GA-CG-SVM method*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2008**, 47(4-5), 677-682



94. Yang, W., *Free-energy-simulation-based protein-protein binding prediction*, Abstracts of Papers, 232nd ACS National Meeting, San Francisco, CA, United States, Sept. 10-14, 2006, **2006**, BIOT-169
95. Heinze, A., Holzgrabe, U., *Determination of the extent of protein binding of antibiotics by means of an automated continuous ultrafiltration method*, International journal of pharmaceutics, **2006**, 311(1), 108-112
96. Albert, C., *Die kontinuierliche Ultrafiltration als Screeningtechnik zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2009**
97. Illy, H.J.J., *Optimierung eines rechnergesteuerten Verfahrens zur Bestimmung der Protein-Bindung von Arzneistoffen*, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **1991**
98. 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(4,5), 847-858
99. <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/pf1401en00>. *Data Sheet Ultracel PLC Membranes*. **2012**, Merck-Millipore, Billerica
100. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal Biochem, **1976**, 72(1-2), 248-254
101. Muth, M., Bender, W., Scharfenstein, O., Holzgrabe, U., Balatkova, E., Traenkle, C., Mohr, K., *Systematic Development of High Affinity Bis(ammonio)alkane-type Allosteric Enhancers of Muscarinic Ligand Binding*, J. Med. Chem., **2003**, 46(6), 1031-1040
102. Tischer, M., Sologub, L., Pradel, G., Holzgrabe, U., *The bisnaphthalimides as new active lead compounds against Plasmodium falciparum*, Bioorg. Med. Chem., **2010**, 18(9), 2998-3003
103. Gulder, T., *Neuartige Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten: N,C-gekuppelte Naphthylisochinolin-Alkaloide*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2008**
104. Hiltensperger, G., Jones, N.G., Niedermeier, S., Stich, A., Kaiser, M., Jung, J., Puhl, S., Damme, A., Braunschweig, H., Meinel, L., Engstler, M., Holzgrabe, U., *Synthesis and Structure-Activity Relationships of New Quinolone-Type Molecules against Trypanosoma brucei*, J. Med. Chem., **2012**, 55(6), 2538-2548
105. Niedermeier, S., Singethan, K., Rohrer, S.G., Matz, M., Kossner, M., Diederich, S., Maisner, A., Schmitz, J., Hiltensperger, G., Baumann, K., Holzgrabe, U., Schneider-Schaulies, J., *A Small-Molecule Inhibitor of Nipah Virus Envelope Protein-Mediated Membrane Fusion*, J. Med. Chem., **2009**, 52(14), 4257-4265

106. Farhadieh, B., *Determination of CMC [critical micelle concentration] and partial specific volume of Polysorbates 20, 60, and 80 from densities of their aqueous solutions*, J. Pharm. Sci., **1973**, 62(10), 1685-1688
107. Oehlmann, M., *Bestimmung der Blut-Eiweißbindung von Suramin und Analogen*, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **1996**
108. Campion, D.S., Olsen, R., *Measurement of drug displacement by continuous ultrafiltration*, J. Pharm. Sci., **1974**, 63(2), 249-252
109. Rehse, K., Ehlert, K., *Determination of the protein binding of drugs by continuous ultrafiltration. VIII. In vitro quantification of the interaction between phenprocoumon, warfarin or methylsulfinylwarfarin (MSW) and phenylbutazone with human serum albumin*, Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.), **1986**, 319(3), 271-274
110. Mueller, W., Wollert, U., *Influence of pH on the benzodiazepine-human serum albumin complex. Circular dichroism studies*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **1974**, 283(1), 67-82
111. Ammon, H., *Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen*, **2001**, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
112. Eger, K., Troschütz, R., Roth, J., *Arzneistoffanalyse*, **2006**, 5. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart
113. Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Schulz, V., *Hagers Enzyklopädie der Drogen und Arzneistoffe*, **2007**, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
114. Kragh-Hansen, U., Brennan, S.O., Galliano, M., Sugita, O., *Binding of warfarin, salicylate, and diazepam to genetic variants of human serum albumin with known mutations*, Mol. Pharmacol., **1990**, 37(2), 238-242
115. Viani, A., Cappiello, M., Silvestri, D., Pacifici, G.M., *Binding of furosemide to albumin isolated from human fetal and adult serum*, Dev Pharmacol Ther, **1991**, 16(1), 33-40
116. Carter, D.C., Ho, J.X., Wang, Z., *Albumin binding sites for evaluating drug interactions and methods of evaluating or designing drugs based on their albumin binding properties*, WO 2004/102151 A2 PCT/US2004/014046, **2004**
117. Yoo, M.J., Smith, Q.R., Hage, D.S., *Studies of imipramine binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography*, J. Chromatogr., B Anal. Technol. Biomed. Life Sci., **2009**, 877(11+12), 1149-1154
118. Hayashi, T., Era, S., Kawai, K., Imai, H., Nakamura, K., Onda, E., Yoh, M., *Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract*, Pathophysiology, **2000**, 6(4), 237-243

119. Lissi, E., Alicia Biasutti, M., Abuin, E., Leon, L., *A fluorescence study of human serum albumin binding sites modification by hypochlorite*, J. Photochem. Photobiol., B, **2009**, 94(2), 77-81
120. Kashiba-Iwatsuki, M., Miyamoto, M., Inoue, M., *Effect of nitric oxide on the ligand-binding activity of albumin*, Arch. Biochem. Biophys., **1997**, 345(2), 237-242
121. Kawakami, A., Kubota, K., Yamada, N., Tagami, U., Takehana, K., Sonaka, I., Suzuki, E., Hirayama, K., *Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions*, Febs J., **2006**, 273(14), 3346-3357
122. Noort, D., Hulst, A.G., Jansen, R., *Covalent binding of nitrogen mustards to the cysteine-34 residue in human serum albumin*, Arch. Toxicol., **2002**, 76(2), 83-88
123. Oetli, K., Stauber, R.E., *Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties*, Br. J. Pharmacol., **2007**, 151(5), 580-590
124. Harada, D., Naito, S., Otagiri, M., *Kinetic Analysis of Covalent Binding Between N-Acetyl-L-Cysteine and Albumin Through the Formation of Mixed Disulfides in Human and Rat Serum in Vitro*, Pharm. Res., **2002**, 19(11), 1648-1654
125. Otagiri, M., Chuang, V.T.G., *Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin*, Biol. Pharm. Bull., **2009**, 32(4), 527-534
126. Pierre-Fabre-Pharma-GmbH, *Fluimucil® Antidot 20% Injektionslösung*, **2001**, FachInfo-Service, Berlin
127. Donovan, J.W., White, T.M., *Alkaline hydrolysis of the disulfide bonds of ovomucoid and of low molecular weight aliphatic and aromatic disulfides*, Biochemistry, **1971**, 10(1), 32-38
128. Drauz, K., Krimmer, H.P., *Preparation of N-acylated mercapto amino acids using nitriles as acylating agents*, DE 3727897 A1 DE 1987-3727897, **1987**
129. Hänsel, R., Sticher, O., *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, **2009**, 9. Auflage, Springer Medizinverlag, Heidelberg
130. Ye, N., Gu, X., Luo, G., *Chiral Separation of Ephedrine Isomers by Capillary Electrophoresis Using Bovine Serum Albumin as a Buffer Additive*, J. Chromatogr. Sci., **2007**, 45(5), 246-250
131. Huang, Q., Zhang, A.-p., Hao, J., Zheng, M.-d., Yang, J.-y., Mao, H.-s., *Study on the interaction of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride with human serum albumin by spectroscopy*, Fenxi Kexue Xuebao, **2011**, 27(4), 447-450
132. Yang, R., Zeng, H.-J., Li, J.-J., Zhang, Y., Li, S.-J., Qu, L.-B., *Capillary electrophoresis coupled with end-column electrochemiluminescence for the*

- determination of ephedrine in human urine, and a study of its interactions with three proteins*, Luminescence, **2011**, 26(5), 374-379
133. Till, A.E., Benet, L.Z., *Renal excretion of pseudoephedrine in the rat*, J. Pharmacol. Exp. Ther., **1979**, 211(3), 555-560
134. Muth, M., Hoerr, V., Glaser, M., Ponte-Sucre, A., Moll, H., Stich, A., Holzgrabe, U., *Antitrypanosomal activity of quaternary naphthalimide derivatives*, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2007**, 17(6), 1590-1593
135. Francois, G., Timperman, G., Eling, W., Assi, I.A., 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(11), 2533-2539
136. Francois, G., Timperman, G., Holenz, J., Assi, L.A., 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(2), 115-123
137. 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
138. Steinhilber, D., Schubert-Zsilavec, M., Roth, H., *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe: Targets - Arzneistoffe - Chemische Biologie*, **2010**, 2. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart
139. Kugelmann, E., *Random Chemistry - Leitstruktursuche mittels Fentons Reagenz*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2011**
140. Tjernberg, A., Markova, N., Griffiths, W.J., Hallen, D., *DMSO-related effects in protein characterization*, J. Biomol. Screening, **2006**, 11(2), 131-137
141. Arakawa, T., Kita, Y., Timasheff, S.N., *Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide*, Biophys. Chem., **2007**, 131(1-3), 62-70
142. 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 Struct., Funct., Genet., **1997**, 29(4), 492-507
143. Poole, C., *The Essence of Chromatography*, **2003**, 1. Auflage, Elsevier, Amsterdam
144. Yamazaki, T., Ishida, M., Yamaguchi, A., Sakai, H., Abe, M., *Effects of Tween-type surfactant on solution properties of bovine serum albumin*, Mater. Technol. (Tokyo, Jpn.), **2001**, 19(5), 209-214

145. Liu, J., Xu, G.-Y., Liu, J., Yu, L., Zhang, H.-L., Yu, X.-F., *Interaction between Tween-20 and BSA*, *Wuli Huaxue Xuebao*, **2005**, 21(8), 862-866
146. Ruiz-Pena, M., Oropesa-Nunez, R., Pons, T., Louro, S.R.W., Perez-Gramatges, A., *Physico-chemical studies of molecular interactions between non-ionic surfactants and bovine serum albumin*, *Colloids Surf., B*, **2010**, 75(1), 282-289
147. Zhang, M., Ferrari, M., *Reduction of albumin adsorption onto silicon surfaces by Tween 20*, *Biotechnol. Bioeng.*, **1997**, 56(6), 618-625