



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchungen zur Gewebeverteilung und
Metabolismus von Anthrachinonderivaten“

verfasst von

Petra Mayer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreut von:

a.o.Univ.Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat. Martin Czejka

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit wurde an der Division für klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien verfasst.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei a.o.Univ.Prof. Mag. Dr. Martin Czejka für die Bereitstellung des Themas der Diplomarbeit, die fachliche Betreuung sowie die freundliche Hilfsbereitschaft, die er mir während des gesamten Projekts entgegengebracht hat, bedanken.

Genauso möchte ich Mag.pharm Nairi Baroian sehr danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und mit sehr viel Engagement meine Diplomarbeit betreut hat.

Zutiefst zu Dank verpflichtet bin ich meinen Eltern, die mir meinen Berufswunsch ermöglicht und mich während des gesamten Studiums unterstützt haben.

Danke auch an meinen Freund Eric, an meine beiden Schwestern Christina und Sophia, sowie an alle Freunde, die mich während meines Studiums immer wieder von neuem motiviert und an mich geglaubt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich, Petra Mayer, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Wien, März 2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Thematik	1
1.2 Chemische Struktur und Eigenschaften der SeaLife- Substanzen.....	1
1.3 Wirksamkeit der Verbindungen	2
1.4 Rationale	2
1.5 Gewebefindung	3
1.5.1 Allgemeines.....	3
1.5.2 Beteiligte Faktoren.....	3
1.5.3 Bestimmungsmethoden	3
1.5.4 Vergleich zur Plasmaproteinbindung	4
1.5.5 Pharmakokinetische Auswirkungen der Gewebefindung	5
1.5.6 Verdrängungsreaktionen	5
1.6 Untersuchte Organe	5
1.6.1 Leber	5
1.6.2 Herz.....	6
1.6.3 Niere.....	6
1.7 Mikrosomale Bindung.....	7
1.8 Intestinale Bindung.....	7
1.9 Vergleichssubstanzen	8

2. Experimenteller Teil

2.1 Chemikalien und Reagenzien	9
2.2 Geräte und Materialien	10
2.3 Software.....	11
2.4 Vorbereitungen allgemein.....	12
2.4.1 Herstellen der Eluenten	12
2.4.2 Herstellen verschiedenster Lösungsmittel	13
2.4.3 Herstellen der Waschflüssigkeiten	13
2.5 Gewebefindung	13
2.5.1 Probenvorbereitung	13

2.5.1.1 Herstellen der Stammlösungen für die Gewebehomogenisation.....	13
2.5.1.2 Diosmin.....	15
2.5.1.3 Herstellen des Homogenisats.....	15
2.5.2 Durchführung	16
2.5.2.1 Zusatz der Stammlösung	16
2.5.2.2 Probenentnahme.....	16
2.5.2.3 Zeitpunkte der Probenentnahme.....	16
2.5.2.4 Proteinfällung	17
2.5.2.5 Zentrifugation	17
2.5.2.6 Probenentnahme für die HPLC- Analyse	17
2.5.2.7 Enzymzugabe	18
2.6 Transil XL Kits	19
2.6.1 Prinzip.....	19
2.6.2 Probenvorbereitung (Herstellen der Stammlösungen)	19
2.6.3 Durchführung	20
2.7 HPLC- Analyse.....	21
2.7.1 HPLC- Anlagen	21
2.7.2 HPLC- Systeme.....	22
3. Ergebnisse und Diskussion	23
3.1 Berechnungen für die Gewebehomogenisation.....	23
3.2 Auswertung der Transil XL Kits	24
3.3 Auswertung der einzelnen Substanzen	26
3.3.1 Allgemeines.....	26
3.3.2 Wahl des Eluenten	26
3.3.3 Wichtig SeaLife- Substanzen (SL3, SL5, SL6, SL10, SL11, SL13).....	26
3.3.4 Weitere SeaLife- Substanzen (SL1, SL2, SL8, SL9, SL12).....	44
3.3.5 Vergleichssubstanzen.....	54
4.Zusammenfassung.....	61
5. Conclusio	62
6.Abstract	63

1. Einleitung

1.1 Thematik

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich mit präklinischen Untersuchungen zu neuen Anthrachinonderivaten betreffend der Gewebefindung. Parallel dazu wird auch der Vergleich zu bereits bekannten Vergleichssubstanzen mit unterschiedlichen Bindungsraten und physikochemischen Eigenschaften gezogen.

Bei diesen neuen Substanzen, die von der Firma SeaLife Pharma GmbH in Tulln synthetisiert wurden, handelt es sich um antibakteriell, antiviral, antimykotisch und zytostatisch wirksame Verbindungen. Sie wurden von einem Naturstoff, nämlich einem Altersolanol- Koralleninhaltsstoffes, abgeleitet. Da solche Stoffe bisher noch nicht synthetisiert und untersucht wurden, sind darüber noch keine Daten in der Literatur vorhanden.

1.2 Chemische Struktur und Eigenschaften der SeaLife- Substanzen

Die untersuchten Testsubstanzen werden mit den Codes SL1 bis SL13 bezeichnet. Sie bestehen alle aus einer Anthrachinongrundstruktur und unterscheiden sich jeweils in den drei Resten. Die ursprüngliche Substanz SL5 wurde weiter modifiziert und somit wurden in unseren Experimenten insgesamt 11 verschiedene SeaLife- Substanzen untersucht.

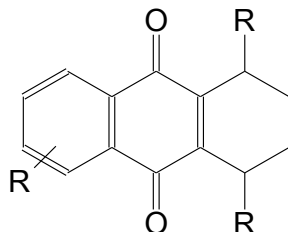


Abbildung 1: Chemische Struktur der untersuchten SeaLife- Substanzen

Ein gemeinsames Merkmal all dieser Verbindungen ist, dass sie alle eine hohe Bindungsrate an Plasmaproteine aufweisen, da diese meist größer als 90 % ist [1]. Des Weiteren sind sie photosensibel, stark lipophil und daher schlecht wasserlöslich. Da sie in Lösung nicht sehr stabil sind, hat dies teilweise große Probleme in der Probenvorbereitung mit sich gebracht. In DMSO bzw. ACN sind sie sehr gut löslich, weshalb bei unseren durchgeführten Versuchen auch hauptsächlich mit diesen beiden Lösungsmitteln gearbeitet wurde. Außerdem haben wir unsere Versuche im neutralen Milieu durchgeführt, da die Verbindungen ab pH 9 ionisierbar sind und daher als Phenolate vorliegen könnten [2].

1.3 Wirksamkeit der Verbindungen

Aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung vieler Bakterien und Pilze gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen besteht ein dringender Bedarf an neuen Arzneistoffen in diesem Gebiet. Daher wurden von der Firma SeaLife Pharma GmbH diese neuen Anthrachinonderivate mit Wirkung gegen mehrfach wirkstoffresistente Erreger wie z.B. dem methicillinresistentem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* bzw. *faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus* sp. sowie gegen respiratorische Viren aus der Gruppe der humanen Rhinoviren und der Synzytial-Viren entwickelt. Diese Eigenschaft muss jedoch an jeder Modifizierung der Hauptverbindung einzeln getestet werden, da nicht alle Altersolanolderivate antiinfektiv wirken, und es im Vorhinein nicht möglich ist vorherzusagen, ob ein bestimmtes Derivat diese Wirkung besitzt oder nicht. Bereits bekannte Antibiotika aus der Gruppe der Altersolanoide sind z.B. die Anthracycline [3].

Außerdem könnten die Verbindungen auch als Zytostatika eingesetzt werden, wobei deren Wirkmechanismus hauptsächlich auf Interkalation des Moleküls in die Doppelhelix der DNA beruht. Entscheidend über die zytotoxische Aktivität der einzelnen Verbindungen sind dabei bereits geringfügige Unterschiede bei den Ringsubstituenten. Auch diese Wirkung ist von großer Bedeutung, da es bei den Zytostatika ähnliche Tendenzen wie im Bereich der Antiinfektiva gibt, nämlich eine stetige Zunahme von Resistenzen gegen bestehende Therapien aufgrund Überexpression von integralen Membrantransportern der Zelle, die zu einem Efflux von Wirkstoffen aus der Krebszelle führen. Anthrachinone wie z.B. Doxorubicin, Daunorubicin, Idarubicin oder Epirubicin werden bereits seit mehreren Jahren als Zytostatika eingesetzt [3].

1.4 Rationale

Da die Entwicklung neuer Arzneistoffe ein komplexer, kostspieliger und arbeitsintensiver Prozess mit oftmals unsicheren Ergebnissen ist, ist es wichtig die Eigenschaften der Arzneistoffe schon währenddessen zeitgleich zu optimieren. Abgesehen von Wirksamkeit, dem Sicherheitsprofil und anderen speziellen Charakteristika ist daher auch das Vorhersagen der Pharmakokinetik einer neuen Substanz von größter Bedeutung, um bereits während des Entwicklungsprozesses selektiv nur mit denjenigen Substanzen weiterzuarbeiten, die auch wirklich das Potenzial dazu haben erfolgreiche therapeutische Substanzen zu werden [4].

Primäres Ziel der Diplomarbeit war es daher, die Gewebeverteilung sowie Metabolismus der neuen SeaLife- Substanzen zu untersuchen.

Dazu wurden folgende Versuche gemacht:

- Bestimmung der Gewebefixierung: An tierischen Organen (Leber, Herz und Niere)
- Bestimmung der mikrosomalen und intestinalen Bindung: Mithilfe der Transil XL - Testsysteme

1.5 Gewebefindung

1.5.1 Allgemeines

Nach Aufnahme in den Körper verteilt sich ein Arzneistoff schnell in den einzelnen Kompartimenten wie Plasma bzw. den verschiedenen Geweben. Dabei ist nur der freie Arzneistoffanteil wirksam, da dieser an verschiedenste Zielstrukturen wie Enzymen, Proteinen oder Rezeptoren binden und somit pharmakologische Effekte erzielen kann. Man muss beachten, dass es diesen freien Anteil nicht nur im Plasma, sondern auch in der interstitiellen Gewebsflüssigkeit gibt [6].

Viele Arzneistoffe liegen im Gewebe sogar in höheren Konzentrationen als im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit vor. Dies beruht teilweise auf aktiven Transport ins Gewebe, größtenteils jedoch auf der Gewebefindung [7]. Diese ist oftmals reversibel und dürfte bei vielen Arzneistoffen über eine weite Spanne in einem linearen Verhältnis zur Arzneistoffkonzentration stehen [7,8]. Änderungen in der Proteinbindung bezüglich Plasma oder Gewebe können daher die Beziehung zwischen der Plasmakonzentration und dem Ausmaß der pharmakologischen Effekte wesentlich verändern [6]. Wenn ein großer Anteil des Arzneistoffs gewebegebunden vorliegt, könnte dies auch als ein Reservoir dienen um eine verlängerte Wirkung zu erzielen [7].

Um den freien Anteil eines Arzneistoffes bzw. die Konzentration im Zielgewebe, in dem er wirken soll, im Körper bestimmen zu können, ist es somit unumgänglich, auch die Gewebefindung für den jeweiligen Arzneistoff zu kennen [8].

1.5.2 Beteiligte Faktoren

Das Wissen über die Bestimmungsfaktoren der Gewebefindung ist noch nicht sehr groß. Verschiedenste Forschungsergebnisse zeigen eine allgemein wichtige Rolle für Phosphatidylserinbindungen, die die Gewebeverteilung für basische oder gewisse andere Arzneistoffe bestimmen [6]. Des Weiteren wird auch über Bindungen an Aktin, Myosin, Melanin, Tubulin und an Membranlipiden berichtet [6,8]. Das Ausmaß der Gewebefindung eines Arzneistoffes ist abhängig von der Summe der Bindungskräfte zu den Gewebebestandteilen im Vergleich zu den Bindungen zu Plasmaproteinen, unter der Voraussetzung, dass der Arzneistoff sofort ins Gewebe penetrieren kann. Dabei ist natürlich der Aufbau der einzelnen Gewebe von großer Bedeutung [5]. Die Gewebegängigkeit eines Arzneistoffes generell ist abhängig von der Größe des Arzneistoffmoleküls, der Affinität zu wässrigen oder lipophilen Gewebe, Gewebeporosität, systemische Zirkulation, Proteinbindung und pH-Wert [7]. Des Weiteren könnte die Arzneistoffmenge, die plasma- bzw. gewebegebunden vorliegt, auch durch den Albuminwert, endogene Substanzen, der Temperatur, Co-Einnahme weiterer Arzneistoffe oder dem Vorhandensein einer Krankheit beeinflusst werden [6].

1.5.3 Bestimmungsmethoden

Mithilfe verschiedener Methoden und der Verwendung der isolierten Organdurchblutung, Gewebeschnitte oder- homogenisate, bzw. isolierte

subzelluläre Organellen versucht man die Menge eines Arzneistoffes, der an oder im Gewebe bindet, zu bestimmen [8]. Wesentliche Arbeitsschritte sind dabei das Lösen, Homogenisieren und Inkubieren [6].

Dadurch kann für viele Arzneistoffe die Menge der Bindung an intaktes Muskelgewebe in- vivo von in- vitro Daten mithilfe eines Gewebehomogenisats hochgerechnet werden, da eine lineare Korrelation zwischen Gewebebindung im Homogenisat und der Menge der Proteinkonzentration in diesem besteht [8].

Gewebebindungsversuche sind jedoch nicht so einfach, da der Zugang zum Gewebe schwierig ist und um gebundenen von ungebundenem Arzneistoff zu trennen das Gewebe zertrennt werden muss, was ein Nachteil aller dieser Methoden ist, da es dadurch zerstört wird [6, 9].

Eine weitere Möglichkeit wäre, verschiedenste Organe zu isolieren und mit einem Puffer, der den Arzneistoff enthält, zu durchspülen. So erhält man den gewebegebundenen Arzneistoffanteil bzw. die freie Konzentration im Perfusat. Einige neuere Methoden um die Gewebebindung zu bestimmen, wären die in- vivo-Mikrodialyse, Magnetresonanzspektroskopie und Positronen-Emissions-Tomographie [6].

1.5.4 Vergleich zur Plasmaproteinbindung

Gewebebindung ist ein Prozess, der ident zur Serumproteinbindung abläuft. Jedoch existiert eine größere Menge und Vielfalt an Proteinen in den verschiedenen Geweben als im Plasma [10]. Über die Gewebebindung ist im Vergleich zur Plasmaproteinbindung noch nicht viel bekannt, da die experimentelle in- vivo Bestimmung dieser Bindung viel schwieriger ist und auch nicht wie die Plasmaproteinbindung direkt gemessen werden kann [8, 9]. Es ist gut beobachtbar, dass saure Komponenten eher an Plasmaproteine und basische eher ans Gewebe binden. Für strukturell ähnliche Arzneistoffe gibt es daher ähnliche Bindungsschemata [8].

Der Anteil des Arzneistoffes, der sich im Plasma befindet, ist sowohl von der Plasmaproteinbindung, als auch von der Gewebebindung abhängig. So können auch Arzneistoffe mit einer hohen Affinität für Plasmaproteine hauptsächlich im Gewebe verteilt sein, wenn die Affinität für Gewebebestandteile noch stärker ist [9]. Auf die Gewebebindung kann man auch durch Messen der Plasmaproteinbindung zurückschießen und unter freien Diffusionsmöglichkeiten ist das gebundene Gewebe-Plasma-Verhältnis eines Arzneistoffes im Gleichgewicht äquivalent zum ungebundenen Gewebe-Plasma-Anteil [6, 10].

Im Gegensatz zur Plasmaproteinbindung gibt es in der Gewebebindung an Muskeln keine Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies [8]. Es ist bekannt, dass Gewebebindung noch mehr als die Plasmaproteinbindung in sehr hohe scheinbare Verteilungsvolumina resultiert, die die physiologischen Volumina um einiges überschreiten. Des Weiteren werden durch die Gewebebindung durch Interaktionen mit verschiedenen Zielstrukturen, wie z.B. Enzyme, Arzneistofftransporter und Rezeptorproteine auch Arzneistoffeffekte vermittelt, da diese normalerweise in bestimmten Kompartimenten des Körpers und nicht im

Plasma lokalisiert sind. Versuche zeigen außerdem, dass es keine direkte Korrelation zwischen Gewebe und Plasmaproteinbindung gibt [6].

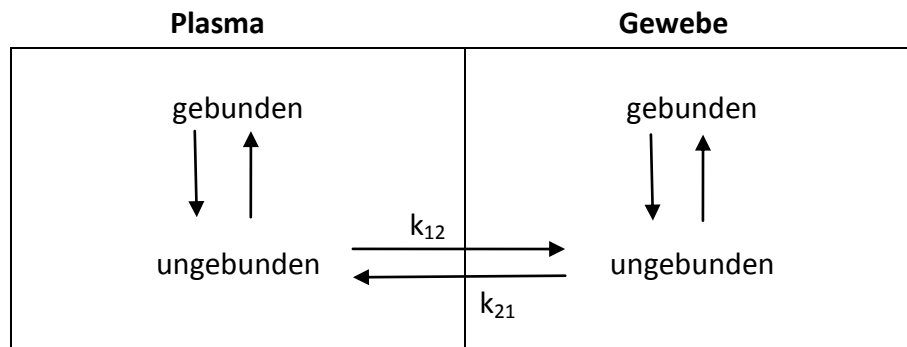


Abbildung 2: Gleichgewichtsverteilung

Im Gleichgewicht hängt die Verteilung [k_{12} , k_{21}] eines Arzneistoffes von der Bindung an Plasmaproteine und an Gewebeproteine ab. Nur der ungebundene Arzneistoffanteil kann von einem Kompartiment ins andere wechseln [9]. (k = Transferrate bzw. Gleichgewichtskonstante)

1.5.5 Pharmakokinetische Auswirkungen der Gewebefindung

Es gibt 3 pharmakokinetische Hauptfaktoren, die den weiteren Verlauf eines Arzneistoffes nach seinem Eintritt in den Körper und im weiteren seine Wirksamkeit bestimmen: Verteilungsvolumen, Clearance und Halbwertszeit [6]. Arzneistoffe mit einer höheren Gewebefindung haben ein größeres Verteilungsvolumen und somit auch eine längere Halbwertszeit. Die Clearance wird durch die Gewebefindung nicht beeinflusst [8].

1.5.6 Verdrängungsreaktionen

Wenn es zu Verdrängungsreaktionen verschiedenster Arzneistoffe an Gewebefindungsstellen kommt, könnte es dadurch zu einem Abfall der gewebegebundenen Arzneistoffkonzentration kommen [8]. Arzneistoffinteraktionen, wie z.B. Verdrängungsreaktionen von Albumin, liegen nämlich in ähnlicher Weise auch in vielen Geweben vor [6].

1.6 Untersuchte Organe

Generell nimmt die Gewebefindung folgendermaßen ab: Leber > Niere > Lunge > Muskel [8].

1.6.1 Leber

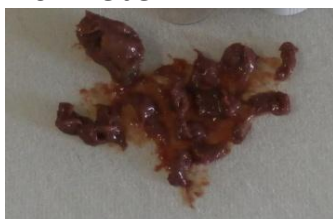


Abbildung 3: Schweineleber, fein geschnitten für die Gewebefindung

Die Leber produziert 15 % der gesamten Proteine im Körper und 90 % der Plasmaproteine [11, 12]. 50 % dieser Proteine, die in der Leber synthetisiert werden, werden dabei sezerniert und die andere Hälfte wird zu strukturellen Proteinen und Enzymen der Leberzellen [12]. Da die Leber eine zentrale Rolle im Arzneistoffmetabolismus einnimmt, ist es nicht verwunderlich, dass sich viele Arzneistoffe in Verbindungen umwandeln, die zu Leberschäden führen können. Dies geschieht hauptsächlich durch kovalente Bindungen von reaktiven Metaboliten an verschiedenste Strukturen der Leber, bzw. durch oxidativen Stress [13].

Das Model der Arzneistoff- Plasmaalbumin- Bindung zeigt Ähnlichkeiten mit der Bindungskapazität der Leberproteine. In der Leber wurde eine hohe unspezifische Bindung von verschiedenen NSAIDs (Bsp. Acetylsalicylsäure oder Ibuprofen) beobachtet, die verschiedenste kationische und anionische Substanzen wie Warfarin oder Clonidin von deren Bindungsstellen in- vitro verdrängt [6].

1.6.2 Herz



Abbildung 4: Schweineherz [22]

Das Herz ist ein überwiegend aus Muskelfasern bestehendes Hohlorgan, das durch Kontraktion und Erschlaffen den Blutstrom durch die Blutgefäße und damit die Durchblutung sämtlicher Körpergewebe und Organe sicherstellt [14].

Da die Herzzelle eine Arbeitszelle ist, besteht sie aus viel ATP und vielen Proteinen. Daraus lässt sich eine hohe Gewebefixierung verschiedenster Arzneistoffe ans Herz beobachten, wie dies z.B. bei Anthracyclinen der Fall ist, die dadurch eine Langzeittoxizität fürs Herzen aufweisen.

1.6.3 Niere



Abbildung 5: Schweineniere, teilweise schon in Stücke geschnitten für die Gewebefixierung

Die Niere hält durch Regulierung des Wasserhaushalts sowie durch Osmo- und Ionenregulation die Homöostase aufrecht [15]. Die Bindung ans Nierengewebe ist besonders bei renal eliminierten Arzneistoffen von großer Bedeutung.

Man muss generell sehr vorsichtig mit Arzneistoffen sein, die eine hohe Plasma- bzw. Gewebefindung aufweisen. So hat z.B. Gentamycin eine hohe Affinität für das Nierengewebe und kann daher in höheren Dosen lokal nierentoxisch wirken [7].

1.7 Mikrosomale Bindung

Ein weiterer wesentlicher Faktor bei Gewebefindungsversuchen, ist die Bestimmung der mikrosomalen Bindung, da in den Mikrosomen die freie Arzneistoffkonzentration durch Metabolisierung mithilfe von CYP- Enzymen reduziert werden kann.

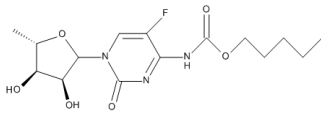
Zusätzlich kann man anhand dieser Bindung z.B. die freie intrazelluläre in- vivo Konzentration verschiedenster Arzneistoffe in der Leber abschätzen. Diese Bindung wurde mithilfe der Transil XL Kits untersucht [4].

1.8 Intestinale Bindung

Durch den Transil XL Intestinal Absorption Kit lassen sich auch der intestinale Permeabilitätskoeffizient sowie die Gewebefindung eines Arzneistoffes im Gastrointestinaltrakt voraussagen, was besonders für oral applizierten Arzneistoffen von großer Bedeutung ist [5].

1.9 Vergleichssubstanzen

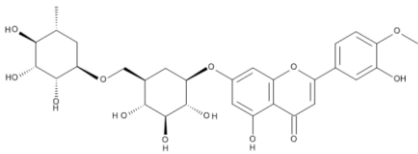
Capecitabin



Pentyl N- N-{1-[(2R,3R,4S,5R)- 3,4-dihydroxy-5 methyloxolan-2-yl]-5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl}carbamate

Capecitabin hat eine Proteinbindung von 54 % laut Literatur und wird als Zytostatikum eingesetzt [17].

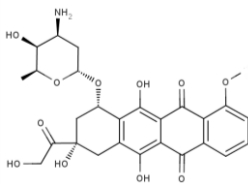
Diosmin



4H-1-Benzopyran-4-on,7-[[6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- 6-D-glucopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)

Die Substanz Diosmin besitzt eine Proteinbindung von 31 % und zeigt eine venenstärkende, gefäßschützende sowie antioxidative Wirkung [18].

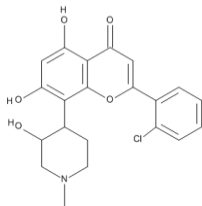
Doxorubicin



5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy}-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracene-5,12-dione

Doxorubicin hat eine Proteinbindung von 75 % und wirkt zytostatisch [19].

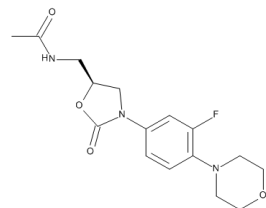
Flavopiridol



2-(2-chlorophenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(3S,4R)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-4-yl]-4H-chromen-4-one

Flavopiridol wirkt ebenfalls zytostatisch und hat eine Proteinbindung von 90 % [20].

Linezolid



N-[[[(5S)-3-[3-fluoro-4-(morpholin-4-yl)phenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl]methyl]acetamide

Linezolid weist eine Proteinbindung von 30 % auf und wird als Antibiotikum eingesetzt [21].

2. Experimenteller Teil

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Analyisierte Substanzen

Substanzen	Typ	Herstellungsfirma
SL1		SeaLife Pharma GmbH, Tulln
SL3		SeaLife Pharma GmbH, Tulln
SL5		SeaLife Pharma GmbH, Tulln
SL6		SeaLife Pharma GmbH, Tulln
SL10		SeaLife Pharma GmbH, Tulln
SL11		SeaLife Pharma GmbH, Tulln
SL12		SeaLife Pharma GmbH, Tulln
SL13		SeaLife Pharma GmbH, Tulln
Capecitabin	Capecitabine MRS (Xeloda) Lot No: RC09126135	Roche
Diosmin	Lot No: #SLBC3987V	Sigma-Aldrich
Doxorubicin	Chargennr.:40157001	Ebewe Pharma (Novartis)
Flavopiridol	F 3055	Sigma- Aldrich
Linezolid	Lot No: H620M4707V	Sigma-Aldrich

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Typ	Herstellungsfirma
Acetonitril	LiChrosolv	Merck KG
Aqua bidestillata		Department für Pharmakognosie, Universität Wien
Dimethylsulfoxid	D8418 (100 ml)	Sigma-Aldrich
	D8418 (50ml)	Sigma-Aldrich
	M8, 180-2	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	99 %	Sigma-Aldrich
Methanol		Merck KG
Phosphatpuffer pH-Wert 7,4	10 mmol NaHPO ₄ / H ₃ PO ₄	Sigma- Aldrich
Phosphorsäure 8,5 %		Sigma- Aldrich
Enzyme		
Collagenase	Type 4: from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich
Trypsin	Type 2: crude, from porcine pancreas	Sigma-Aldrich

2.2 Geräte und Materialien

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Typ	Herstellungsfirma
Analysenwaage	Sartorius H110	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Caps (HPLC)	8-SC	CHROMACROL®
Decapper		Micronic
Edelstahlkugeln	D5, 250 g	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Einmal-Latexhandschuhe	Class 1, AQL 1,5	VWR International
Eppendorf Gefäße	Micro Tubes, Plastibrand, 1,5 ml	BRAND GmbH, Deutschland
Eppendorf Pipetten (versch. Größen)		Research Plus
Extraktionsgefäß	IKA Tube, 20ml Pat. Pend.	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Finnpipette	Digital 2-10ml	
Gewebehomogenisator	IKA Ultra Turrax®, Tube Drive Control	IKA®-Werke GmbH. & Co. KG
Kühlschrank		
Magnetrührer	MR 300 1 K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Mikroeinsätze		biolab
Mikropipetten	Eppendorf Research 2-20 µl, 2-200 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf A
Mini-Shaker	Vortex Mixer	VELP® SCIENTIFICA
Parafilm	Laboratory Film „M“	Bemis Company, Neenah
Pasteurpipette aus Glas	150 mm Gesamtlänge	Assistent, Deutschland
Pasteurpipette aus Glas	150 mm Gesamtlänge	VWR
Pasteurpipette aus Plastik	153 mm, LOT 09	Serobac HandelsgmbH
pH-Meter	ORION 2 STAR pH Benchtop	Thermo Scientific
Pipettensauger		
Pipettenspitzen	Universal blue Tipps, 50-1000 µl	VWR® INTERNATIONAL
Pipettenspitzen	Universal yellow Tipps, 2-200 µl	VWR® INTERNATIONAL
Pipettenspitzen	Finntip 63 for volume range 2-10 ml	Thermo Scientific®
Plate Shaker	Mix Mate PCB-11	Eppendorf
Reaganzgläser	100 x 16 mm	Assistent, Deutschland
Rinderleber		Lebensmittelhandel

Schweineherz		Lebensmittelhandel
Schweineleber		Lebensmittelhandel
Schweineniere		Lebensmittelhandel
Septum für Sampler Fläschchen (HPLC)	8-ST15	CHROMACROL® (biolab)
HPLC- Fläschchen		biolab
Sezierbesteck		Labor Siebert
Tiefkühlschrank	UF755G	Dometic
Transil® XL Intestinal Binding Kit	Lot No: DJCN	Sovicell
Transil® XL Microsomal Binding Kit	Lot No: GHKU	Sovicell
Ultraschallbad	BANDELIN SONOREX RK 510	BANDELIN electronic GmbH Co. KG
Waage	Sartorius M-prove AY612	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Vials (HPLC)	p336	CHROMACROL®
Zentrifuge	Labofuge 400 FUNCTION Line	Heraeus Instruments GmbH

2.3 Software

- Microsoft® Office Exel
- Microsoft® Office Word
- Transil Kits XL Sovicell
- GraphPad Prism 5

2.4 Vorbereitungen allgemein

2.4.1 Herstellen der Eluenten

Eluent isokratisch 1:

= ACN : H₂O (60:40, V/V), pH-Wert 4,4

0,8 g KH₂PO₄ (Aldrich) werden in 800 ml Aqua dest. gelöst und dazu 5 min auf dem Magnetrührer gerührt. Danach wird mit dem pH-Meter der pH-Wert bestimmt und mithilfe 8,5 %iger Phosphorsäure auf pH 4,4 gebracht. Nun werden noch 1200 ml ACN hinzugesetzt.

Eluent isokratisch 2:

= ACN : H₂O (40:60, V/V), pH-Wert 4,4

0,4 g KH₂PO₄ (Aldrich) werden in 600 ml Aqua dest. gelöst und 5 min auf dem Magnetrührer gerührt. Anschließend wird mit dem pH-Meter der pH-Wert gemessen und mithilfe 8,5 %iger Phosphorsäure auf pH 4,4 gebracht. Danach werden 400 ml ACN zugesetzt.

Eluent für Capecitabin:

Bei diesem Eluenten wird eine Mischung von MeOH : H₂O im Verhältnis von 50 : 50 angefertigt.

Eluent für Doxorubicin:

Dafür werden 0,5 g KH₂PO₄ mit 500 ml Aqua dest., 250 ml ACN und 250 ml MeOH versetzt.

Eluent für Linezolid:

Zuerst werden 1,6 g Na- Monoacetat in 3,2 ml Wasser gelöst. 750 ml Aqua dest. werden anschließend mit dieser Na- Monoacetat- Lösung auf pH 4 gebracht. Dazu wird die Lösung am Magnetrührer gerührt und mithilfe des pH-Meters wird auch in diesem Fall der pH-Wert gemessen.

Alle Eluenten werden anschließend gut durchgeschüttelt, die Flaschen mit Parafilm verschlossen und 30 min zur Entgasung ins Ultraschallbad gestellt.



Abbildung 6: pH- Meter



Abbildung 7: Ultraschallbad

2.4.2 Herstellen verschiedenster Lösungsmittel

PBS

1 Tablette "phosphat buffered tablet" wird in 200 ml Aqua destillata für etwa 1 Stunde gelöst und anschließend der fertige Puffer gut durchgeschüttelt.

DMSO - Lösungen:

5 %ig: 5 Teile DMSO 100% werden mit 95 Teilen PBS versetzt

32 %ig: 32 Teile DMSO 100% werden mit 68 Teilen PBS versetzt

60 %ig: 60 Teile DMSO 100% werden mit 40 Teilen PBS versetzt

2.4.3 Herstellen der Waschflüssigkeiten

Waschflüssigkeit bei Proben mit ACN:

20 Teile H₂O werden mit 80 Teilen ACN versetzt.

Waschflüssigkeit bei Proben mit MeOH:

20 Teile H₂O werden mit 80 Teilen MeOH versetzt.

2.5 Gewebehomogenisation

2.5.1 Probenvorbereitung

2.5.1.1 Herstellen der Stammlösungen für die Gewebehomogenisation

Falls nicht anders angegeben, werden die einzelnen Substanzen jeweils in einer Epruvette in einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO 32 % gelöst. Die Epruvette wird dazu kurz gevortext, mit Parafilm verschlossen und zum Lichtschutz mit Alufolie umwickelt.



Abbildung 8: Vortexmischer

Falls die Substanz anders gelöst wird bzw. zum Lösen ins Ultraschallbad gehalten werden muss, wird dies nun separat aufgelistet:

Tabelle 4: Lösungsvorgang der einzelnen Substanzen für die Gewebehomogenisation

Substanz	Beurteilung der Löslichkeit	Lösungsmittel (falls nicht DMSO 32 %)	Ultra- schallbad (Zeit)
SL 1	schlecht löslich		45 min
SL 2	schlecht löslich		1,5 h
SL 3	gut löslich Substanz jedoch sehr klebrig, daher wird der Arbeitsprozess erschwert		30 min
SL 5	<u>VS:</u> in 60 Teilen DMSO 100 % lösen (Lösung schön rötlich) + 40 Teile PBS → Lösung fällt aus und wird schwarz		1,5 h
SL 6	gut löslich		30 min
SL 8	sehr gut löslich		5 min
SL 9	sehr gut löslich		3 min
SL 10	wird eine klare Lösung <u>VS:</u> in 60 Teilen DMSO 100 % lösen (Lösung schön gelb) + 40 Teile PBS → Lösung fällt aus und wird trüb		60 min
SL 11	leicht und gut löslich		20 min
SL 12	schwerlöslich		2 h
SL 13	löst sich nicht in DMSO 32 %	zuerst in 60 Teilen DMSO 100% lösen, dann 40 Teile PBS zusetzen	
Capecitabin	gut löslich		20 min
Diosmin	schlecht löslich	32 Teile DMSO 100 % + 68Teile PBS	
Flavopiridol	gut und schnell löslich		

2.5.1.2 Diosmin

Diosmin ist eine Problemsubstanz, was die Löslichkeit und den raschen Zerfall betrifft.

VS: Eine Spatzenspitze Diosmin in einem Erlenmeyerkolben lösen:

- a) in 32 Teilen DMSO 100 % lösen + mit 68 Teilen PBS verdünnen $\Rightarrow$ Lösung ist gleich nach dem Lösen knallgelb (gutes Zeichen), verblasst jedoch nach einiger Zeit (Lösung ist nach ca. 10 min nicht mehr so stark gelb und trüb)
- b) in DMSO 100 % $\Rightarrow$ Lösung nicht so gelb wie bei a)
- c) in DMSO 32 % lösen $\Rightarrow$ Lösung fast nicht gelb und trüb



Abbildung 9: Diosmin nach dem Lösen*



Abbildung 10: Diosmin gelöst nach 30 min*

* v.l.n.r.: Diosmin in DMSO 100 %, Diosmin in DMSO 100 % + mit PBS auf 32 %, Diosmin in DMSO 32 %

Fazit: Wir sind zum Entschluss gekommen, dass wir Diosmin in 32 Teilen DMSO 100 % lösen und anschließend 68 Teile PBS zusetzen. Das Ultraschallbad sollte man eher vermeiden, da auch dabei ein Verblasen der Farbe beobachtet wurde und in weiterer Folge niedrigere Konzentrationen der Substanz bei der HPLC-Analyse festgestellt wurden.

2.5.1.3 Herstellen des Homogenisats

Zuerst wird ein Extraktionsgefäß mit drei kleinen Edelstahlkugeln befüllt und auf der Waage austariert.



Abbildung 11: Extraktionsgefäß



Abbildung 12: Ultraturrax

Nun wird das verwendete Organ (Leber, Herz oder Niere) mithilfe eines Seziermessers in kleine Stücke geschnitten (Durchmesser: ca. 0,5 cm). Man befüllt das Extraktionsgefäß mit ca. 2 g dieser Stücke und füllt es anschließend mit DMSO 5 % auf 10 g auf. Nun wird zur Homogenisation 2 min am Ultraturrax bei 4000 U/min gerührt.

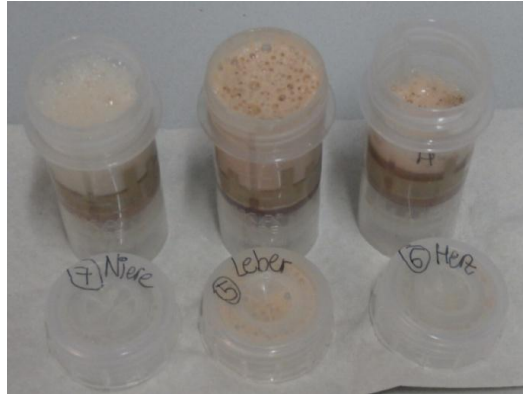


Abbildung 13: Homogenisat der einzelnen Organe

2.5.2 Durchführung:

2.5.2.1 Zusatz der Stammlösung

Als erstes wird 1 ml der zuvor hergestellten Stammlösung mit einer Eppendorfpipette, die tief in das Extraktionsgefäß getaucht wird, zugesetzt. Nun wird das Gefäß für 2 min bei 4000 U/min auf den Ultraturrax gestellt.

2.5.2.2 Probenentnahme

Vor jeder Probenentnahme (Ausnahme = 1. Entnahme nach Zusatz der Stammlösung) wird die Probe 1 min bei 4000 U/min am Ultraturrax erneut homogenisiert. Dann werden aus dem Extraktionsgefäß mithilfe einer Eppendorfpipette 500 µl Homogenisat entnommen und in eine Epruvette überführt. Dabei muss man aufpassen, dass man die Probe vom unteren Bereich des Gefäßes entnimmt, da sich weiter oben auch viele Luftblasen befinden, die das entnommene Volumen verfälschen würden und man hätte dadurch weniger Substanz als vorgesehen in der Probe.

2.5.2.3 Zeitpunkte der Probenentnahme

Eine Probe wird dann jeweils direkt nach der Arzneistoffzugabe (aufgrund der Ultraturraxvermischung ist dieser Zeitpunkt genau genommen erst 2 min nach der Arzneistoffzugabe), sowie 15 min und 30 min danach entnommen.

2.5.2.4 Proteinfällung

Zur Proteinfällung versetzt man die entnommene Probe mit 2,5 ml ACN und vortext die Epruvette anschließend für ca. 5 Sekunden. Dabei muss man aufpassen, dass das Homogenisat nicht im oberen Bereich der Epruvette kleben bleibt.

2.5.2.5 Zentrifugation

Anschließend wird die Probe 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert, damit sich die Feststoffe des Gewebehomogenisats mit den gefällten Proteinen absetzen und somit die Arzneistofflösung mit dem freien Arzneistoffanteil als Überstand entnommen werden kann.

Falls sich eine ungerade Anzahl an Epruvetten in der Zentrifuge befindet, ist darauf zu achten ein Gegengewicht, anhand einer mit 3 ml Wasser befüllten Epruvette, in die Zentrifuge zu stellen.



Abbildung 14: Zentrifuge von außen



Abbildung 15: Zentrifuge von Innen

2.5.2.6 Probenentnahme für die HPLC- Analyse



Abbildung 16: Epruvette mit Homogenisat nach Zentrifugation

Als letzter Schritt wird mithilfe einer Pasteurpipette der Überstand des Zentrifugats aufgesaugt und damit ein Mikroinsert für HPLC-Fläschchen bis zur Mitte der vorgegebenen blauen Wellen- Markierung befüllt.

Anmerkung: Es werden Mikroeinsätze befüllt, da man dadurch weniger Volumen benötigt als wenn man die Probe direkt in die HPLC- Fläschchen füllt und somit nicht so leicht kleine Partikel des Homogenisats mit der Pipette aufgesaugt werden. Es befindet sich außerdem nach der Zentrifugation auch eine Art „Platte“ mit den Feststoffen des Homogenisats über dem Zentrifugat, die man beim Eintauchen mit der Pasteurpipette vorsichtig zur Seite schieben muss. (Siehe Abbildung 16)

Die Mikroeinsätze werden in beschriftete HPLC-Fläschchen gesteckt und in den Sampler der HPLC- Anlage zur Analyse gestellt.



Abbildung 17: HPLC- Fläschchen, Mikroeinsatz und Cap mit Septum

2.5.2.7 Enzymzugabe

Nach der letzten Probenentnahme wird jeweils 1 Spatelspitze des Enzyms Kollagenase und Trypsin ins Extraktionsgefäß beigegeben und anschließend 2 min am Ultraturrax homogenisiert.

Die Probenentnahmen finden jeweils 30 min und 45 min nach der Enzymzugabe statt.

2.6 Transil XL Kits

2.6.1 Prinzip

Bei den Transil XL Kits Testsystemen handelt es sich um winzig kleine Silikatkügelchen mit einer aufgetragenen immobilisierten natürlichen Phosphatidylcholinmembran, die sich in einem 50 µM Phosphatpuffer mit pH 7,4 befinden. Pro Test gibt es jeweils 6 Wells mit steigender Anzahl an Silikatkügelchen sowie 2 Wells, die nur Phosphatpuffer enthalten und als Referenzwerte dienen, um auch eventuell auftretende unspezifische Bindungen erfassen zu können. Somit kann man die Bindung einer gleichbleibenden Testsubstanzkonzentration im Verhältnis zu verschiedenen Konzentrationen an Membranoberfläche messen, indem man die im Überstand enthaltene verbleibende freie Konzentration an Substanz mittels HPLC- Analyse quantifiziert.

2.6.2 Probenvorbereitung

(Herstellen der Stammlösungen)

Es werden für das Herstellen der Stammlösungen jeweils die Einwaagen der einzelnen Substanzen anhand des Molekulargewichts berechnet:

Capecitabin

1 mol = 359,35 g

1 µmol = 359,35 µg

80 µmol = 28748 µg

⇒ = 28,75 mg/ 1000 ml = 2,87 mg/ 100 ml = 1,44 mg/ 50 ml DMSO 32 %

Diosmin

1 mol = 608,54 g

1 µmol = 608,54 µg

80 µmol = 48 683 µg

⇒ = 48,7 mg/ 1000 ml = 4,87 mg/ 100 ml = 2,44 mg/ 50 ml LM

LM= 32 Teile DMSO 100 % + 68 Teile PBS schrittweise zugeben

Flavopiridol

1 mol = 401,84 g

1 µmol = 401,84 µg

80 µmol = 32 147 µg

⇒ = 32,15 mg/ 1000 ml = 3,21 mg/ 100 ml = 1,61 mg/ 50 ml DMSO 32 %

Linezolid

1 mol = 337,35 g

1 µmol = 337,35 µg

80 µmol = 26 988 µg

⇒ = 26,99 mg/ 1000 ml = 2,70 mg/ 100 ml = 1,35 mg/ 50 ml DMSO 32 %

2.6.3 Durchführung

Eine Transil XL Kits Platte besteht aus 96 wells, wobei es jeweils eine zusammenhängende Reihe mit 8 wells pro Versuch für die mikrosomale bzw. intestinale Bindung gibt. Für das Experiment wird eine Reihe vom Gefrierschrank entnommen und entweder über Nacht im Kühlschrank bzw. 3 Stunden bei Raumtemperatur langsam aufgetaut.

Sobald sie aufgetaut ist, wird sie 5 Sekunden bei 2100 U/min zentrifugiert. Danach öffnet man sich mit dem Decapper eine Reihe mit 8 wells und pipettiert jeweils 15 µl der zuvor hergestellten Stammlösung hinein. Die wells werden wieder verschlossen und am Plate Shaker für 12 min bei 1000 U/min inkubiert. Nun wird die Platte wieder für 10 min bei 2100 U/min zentrifugiert, damit sich die in den wells vorhandenen Feststoffe bzw. Proteine absetzen.



Abbildung 18: Platte mit wells, teilweise geöffnet mithilfe Decapper



Abbildung 19: Plate Shaker

Zur Probenentnahme werden die wells wieder mit dem Decapper geöffnet und es werden pro well ca. 80 µl Überstand mit einer Pasteurpipette entnommen, wobei man aufpassen muss, dass nicht auch das Protein aufgesaugt wird.

Diese 80 µl werden in Mikroeinsätze überführt und die Mikroeinsätze dadurch wieder bis zur Mitte der blauen Wellenlinien befüllt. Man steckt die Mikroeinsätze in HPLC- Fläschchen, verschließt sie mit einem Cap und stellt sie anschließend zur Analyse in die HPLC- Anlage.

2.7 HPLC- Analyse

2.7.1 HPLC- Anlagen



Abbildung 20: HPLC-2 System

Tabelle 5: Parameter des HPLC-2 Systems von der Firma MERCK HITACHI®

Autosampler	L-7200 La Chrom
Heizsystem	CTO- 10A Firma SHIMADZU
Thermostat	Peltier Sample Thermostat
Säulentemperatur	$36 \pm 1^\circ\text{C}$
Pumpe	L-7120 La Chrom
UV Detektor	L-7400 La Chrom
Degaser	Model 2003, Firma VWR

Tabelle 6: Parameter des HPLC-3 Systems von der Firma MERCK HITACHI®

Autosampler	L-7200 LaChrom
Thermostat	Column- Thermostat Jetstream 2
Säulentemperatur	$36 \pm 1^\circ\text{C}$
Pumpe inkl. Degaser	L-7100 LaChrom
Dioden Array Detektor	L-7450 La Chrom, MERCK HITACHI

Tabelle 7: Parameter des HPLC-4 Systems von der Firma VWR HITACHI®

Autosampler	5210
Heizsystem	5310
Säulentemperatur	$36 \pm 1^\circ\text{C}$
Pumpe	5110
UV Detektor	5410

2.7.2 HPLC- Systeme

Tabelle 8: HPLC- Systeme

Substanz	HPLC- Anlage	Säule	Injektions- volumen [μl]	Eluent	Fluss [ml/min]	Wellen- länge [nm]	RT [min]
SL1	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 1	0,75	270	5,4
SL3	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 2	0,75	270	5,6
SL5	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 1	0,75	270	7,7
SL6	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 1	0,75	270	4,7
SL8	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 1	0,75	270	4
SL9	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 1	0,75	270	5,3
SL10	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 1	0,75	270	8
SL11	HPLC 4	ACE*	40	isokratisch 1	0,75	270	3,4
SL11	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 2	0,75	270	7,5
SL12	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 1	0,75	270	8,5
SL13	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 1	0,75	270	5,8
Capecitabin	HPLC 4	LiChr.**	40	Eluent für CCB	0,60	240	5,2
Diosmin	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 2	0,80	345	2,7
Doxorubicin	HPLC 4	Lichr.**	10	Eluent Doxorubicin	0,60	485	3,3
Flavopiridol	HPLC 2	ACE*	40	isokratisch 2	0,75	250	3,6
Linezolid	HPLC 3	Sym.***	20	Eluent Linezolid	0,80	254	1,7

* ACE 3C8 150 × 4,6 mm id

** LiChrospher® 100 RP-18e (5 μm)

*** Symmetry® C8 3,5 μm

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Gewebehomogenisation: Berechnungen

Berechnung der Konzentration unserer SeaLife- Substanzen (laut Arbeitsvorschrift) im Probenvolumen:

10 ml Homogenisat (ca. 2 g geschnittenes Organ + mit PBS auf 10 g auffüllen)
+ 1 ml Arzneistoff- Lösung (Konz. = 1 mg/ml)

$$\Rightarrow \text{Konz.} = 1 \text{ mg in } 11 \text{ ml} \\ = 1\,000 \mu\text{g} / 11\,000 \mu\text{l}$$

$$\Rightarrow \text{wir nehmen } 500 \mu\text{l Homogenisat für die Probenvorbereitung heraus:} \\ = 45,45 \mu\text{g Substanz (wenn nichts bindet) (Konz. } = 90,9 \mu\text{g/ml)}$$

$$\Rightarrow 500 \mu\text{l Homogenisat} + 2500 \mu\text{l ACN (=1:6 bzw 1+5)} \\ = 45,45 \mu\text{l Substanz in } 3000 \mu\text{l Homogenisat} \\ = \underline{15,15 \mu\text{g/ml}} \text{ (= maximale Konz. der Substanz in unserer Probe wenn nichts bindet)}$$

Auswertung:

● **Berechnung des freien Arzneistoffanteils der Probe in $\mu\text{g/ml}$, abhängig vom Standard:**

$$\mu\text{g/ml} = \frac{\mu\text{g/ml Standard} * \text{Peakfläche Versuch} (\mu\text{g gesucht})}{\text{Peakfläche Standard}}$$

● **Berechnung des freien Arzneistoffanteils in %, abhängig vom Standard:**

$$15,15 \mu\text{g/ml} \quad = 100\% \\ \mu\text{g/ml von Probe} \quad = ? \%$$

$$\% = \frac{\mu\text{g/ml (Probe)} * 100}{15,15 \mu\text{g/ml}}$$

3.2 Transil XL Kits: Auswertung

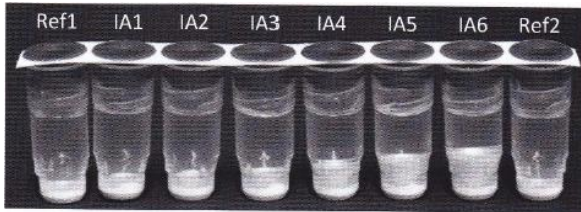


Abbildung 21: eine Reihe mit den 8 wells (mit Silikatkügelchen und Phosphatpuffer gefüllt) [5]

Bei den Transil XL Kits Versuchen werden die Affinitäten der einzelnen Testsubstanzen zur Phosphatidylcholinmembran gemessen und damit auch weitere essentielle Einflussfaktoren der Gewebefindung, wie Arzneistoff- Membran-Interaktionen, Membranpermeabilität, Bindung des Arzneistoffes an die Gewebemembran sowie Permeation in die Zellmembran des Gewebes berücksichtigt [5].

Parameter

fu = fraction unbound = freie Arzneistoffkonzentration

logMA = Logarithmus der Membranaffinität
= Arzneistoffkonzentration in (Lipid-) Membran
Arzneistoffkonzentration im Puffer

r² = Korrelationskoeffizient

Vd = Verteilungsvolumen: Das Verteilungsvolumen gibt die Verteilung eines Arzneistoffes zwischen dem zentralen Kompartiment Plasma und Gewebe an. Somit haben Arzneistoffe, die stärker ans Gewebe binden auch größere Verteilungsvolumina [5].

logK^{b/f} = Logarithmus der Gleichgewichtskonstante hoch gebundener Anteil durch freier Anteil

Tabelle mit den Ergebnissen

Tabelle 9: Ergebnisse der Transil XL Kits

Substanz	MG [g/mol]	Mikrosomale Bindung			Intestinale Bindung				
		logMA	r ²	fu [%]	logMA	r ²	logK ^{b'f}	fu [%]	Vd [l/kg]
Cape- citabin	608,54	2,21 ± 0,28	0,0097	96	1,80 ± 0,22	0,7299	-0,13	58	1,416
Diosmin	337,35	1,86 ± 0,06	0,9894	98	1,80 ± 0,02	0,9962	0,19	39	1,094
Doxo- rubicin	579,98	2,63 ± 0,05	0,9843	89	2,83 ± 0,04	0,9814	0,26	35	3,577
Flavo- piridol	401,84	2,57 ± 0,03	0,9884	90	2,78 ± 0,02	0,9960	1,20	6	1,622
Line- zolid	337,35	1,36 ± 0,10	0,8192	99	2,98 ± 0,07	0,9126	-0,17	60	6,031

3.3 Auswertung der einzelnen Substanzen

3.3.1 Allgemeines

Im folgenden Kapitel wird nun basierend auf den Chromatogrammen der HPLC-Analyse der Gewebebinungsversuche und den daraus resultierenden Ergebnissen der Berechnungen der Gewebebinung noch näher auf die einzelnen Substanzen eingegangen. Die Ergebnisse der Proteinbindung nach Ultrafiltration bzw. die Plasmaproteinbindungen wurden dabei aus anderen Diplomarbeiten entnommen. Für die Vergleichssubstanzen werden auch die Ergebnisse der mikrosomalen bzw. intestinalen Bindung aus den Bestimmungen mithilfe der Transil XL Kits berücksichtigt. Bei den durchgeführten Tests handelt es sich nur um Methoden um die Größenordnung der einzelnen Bindungen zu bestimmen, daher sind Abweichungen von 20- 30 % zum tatsächlichen Wert durchaus möglich.

3.3.2 Wahl des Eluenten

Der Stellenwert des verwendeten Eluenten lässt sich sehr gut anhand der Substanz SL11 verdeutlichen, da bei dieser Substanz die Probe des Leberhomogenisats sowohl mit dem Eluenten „isokratisch 1“ als auch „isokratisch 2“ analysiert wurde:

Generell ist eine Substanz bei der Umkehrphasen- HPLC (reversed phase) umso hydrophiler, je früher sie im Chromatogramm erscheint. Bei der HPLC- Analyse mithilfe des „isokratisch 1“- Eluenten zeigt sich bei SL11 eine verfrühte Retentionszeit bei 3,4 min. Im Gegensatz dazu würde unter Verwendung des „isokratisch 2“ – Eluenten die Retentionszeit 7,5 min betragen. Die aus den Peakflächen errechnete Gewebebinung für die Leber, nämlich 94 %, stimmt jedoch fast komplett mit der Bindungsrate für dasselbe Organ mit dem „isokratisch2“- System (96 %) überein.

Dieser Versuch soll verdeutlichen, dass der Eluent zwar die Retentionszeit einer Substanz, nicht jedoch deren Peakfläche beeinflusst.

Daher werden bei Verbindungen, die durch den „isokratisch 1“- Eluenten bereits nach kurzer Zeit im Chromatogramm sichtbar sind und sich somit mit den Peaks aus der Matrix, sprich den Geweben oder Lösungsmitteln überlappen und daher nicht mehr eindeutig identifiziert werden könnten, der „isokratisch2“- Eluent verwendet.

3.3.3 Wichtige SeaLife- Substanzen (SL3, SL5, SL6, SL10, SL11, SL13)

Zu dieser Gruppe gehören die SeaLife- Substanzen SL3, SL5, SL6, SL10, SL11 und SL13, da sich diese aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse als diejenigen Substanzen herauskristallisiert haben, mit denen aufgrund ihrer Eigenschaften weitergearbeitet wird und von denen eine möglicherweise der neue Arzneistoff werden könnte.

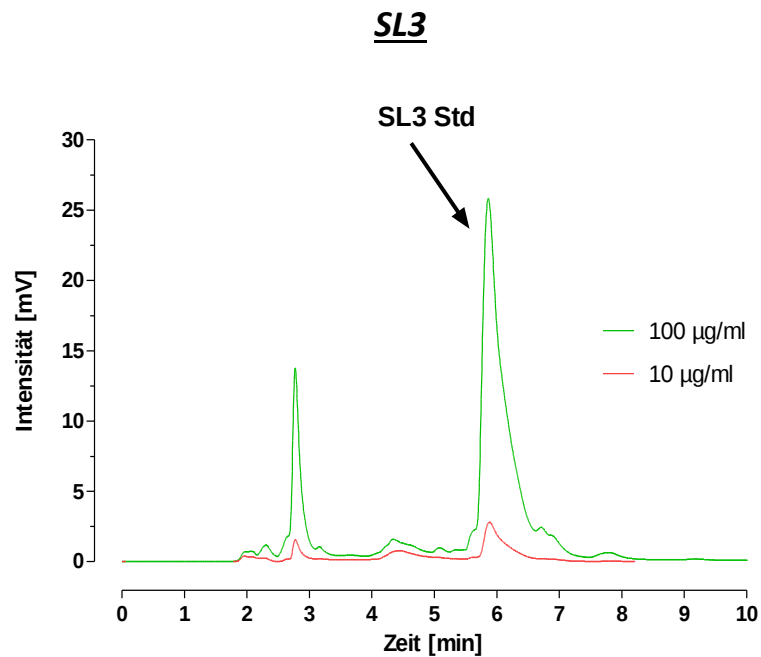


Abbildung 22: Chromatogramm des Standards von SL3 in den Konzentrationen 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml

In den Chromatogrammen dieser Verbindung sind zwei Peaks sichtbar, einer bei einer Retentionszeit von 2,7 min und ein zweiter, höherer Peak bei 6 min. Da das Verhältnis beider Peaks jeweils mit den verschiedenen Standardkonzentrationen korreliert, dürften beide von der Substanz sein. Dies deutet auf eine Zersetzung bzw. Umwandlung der Substanz bei der Lagerung oder während des Arbeitsprozesses hin.

Tabelle 10: Gewebe, SL3

LEBER	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	12,5	18	82			
15	10,4	31	69	0	100	0
30	7,9	48	52			
Enzym 60	7,5	51	49			
Enzym 75	6,0	60	40			
HERZ	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	2,5	83	17			
15	0,7	95	5	0	100	0
30	3,7	76	24			
Enzym 60	0	100	0			
Enzym 75	0,4	97	3			
NIERE	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	0	100	0			
15	2,6	83	17	0	100	0
30	0	100	0			
Enzym 60	3,1	80	20			
Enzym 75	0	100	0			

Anmerkung: Die µg/ml- Werte, bzw. die Prozentwerte werden in diesen Tabellen stets gerundet angeführt. Daher ist es durchaus möglich, dass kleine Abweichungen zu dem genauer dargestellten freien Arzneistoffanteil in den Abbildungen mit den Metaboliten (wie z.B. Abbildung 23) bestehen.

Die Mittelwerte der Gewebebindung in den einzelnen Organen sind 42 % in der Leber, 90 % im Herzen und 93 % in der Niere. In der Leber liegt diese mit der Dauer des Experiments ansteigend vor, in Herz und Niere sind jedoch keine Korrelationen der Bindungsraten mit der Dauer des Experiments zu beobachten. Die Ergebnisse von Herz und Niere korrelieren somit sehr gut mit den Ergebnissen der Proteinbindung nach der Ultrafiltration, da dabei jeweils eine Proteinbindung von 100 % gemessen wurde [16]. Auch bei der Plasmaproteinbindung, die mithilfe der Transil XL Kits ermittelt wurde, liegt ein vergleichbar hoher Wert von 95 % vor [1].

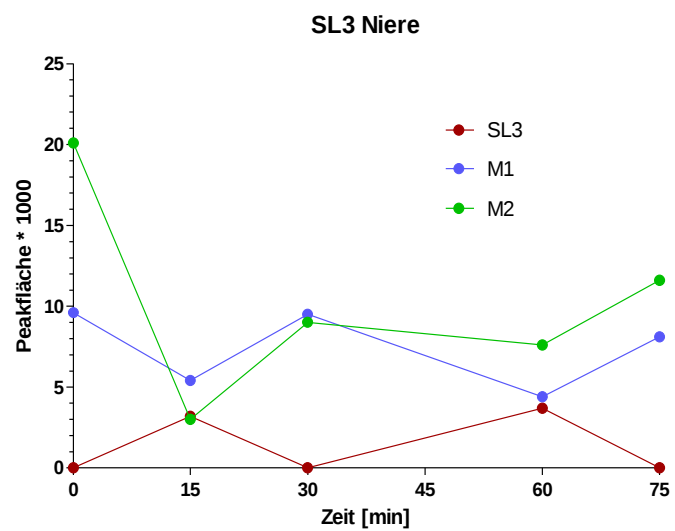
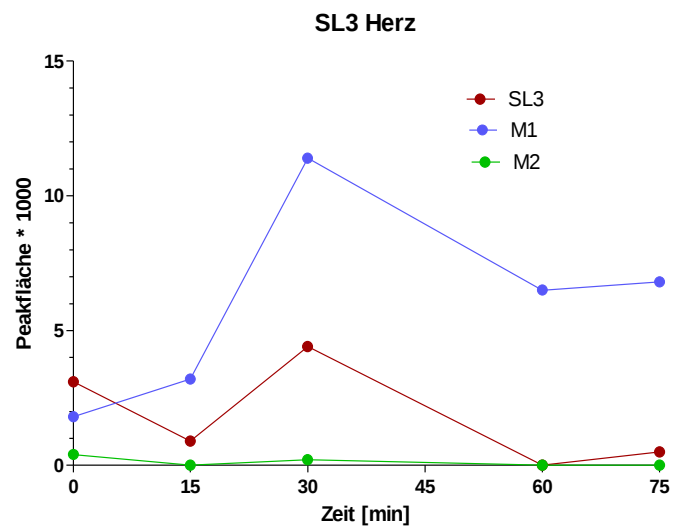
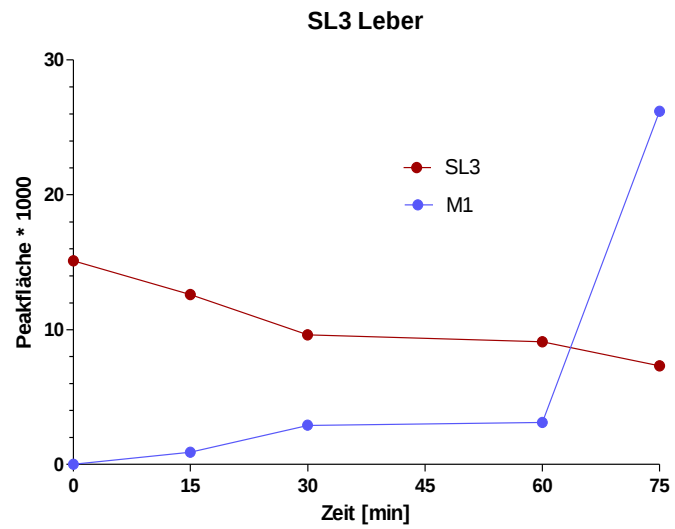


Abbildung 23: Verlauf von SL3 und dessen Metaboliten in Leber, Herz und Niere

Die Umwandlung der Substanz kann auch sehr gut bei den entstehenden Metaboliten beobachtet werden, da z.B. beim Herzen der Metabolit M1 proportional zu den Peakflächen der Substanz zu den einzelnen Zeiten ist und deren Konzentrationen noch um einiges übersteigt. Auch in der Niere gibt es zwei Metaboliten, die beide in höheren Mengen als SL3 vorliegen.

SL5

SL5 ist die eigentliche Ursubstanz, von der alle anderen Verbindungen abgeleitet wurden. Diese Substanz wäre eher nur für die topische Anwendung geeignet, da sie schlecht löslich ist. Dies war auch der Grund, weshalb man sie modifiziert hat, da das Ziel ist, den neuen Wirkstoff auch intravenös applizieren zu können.

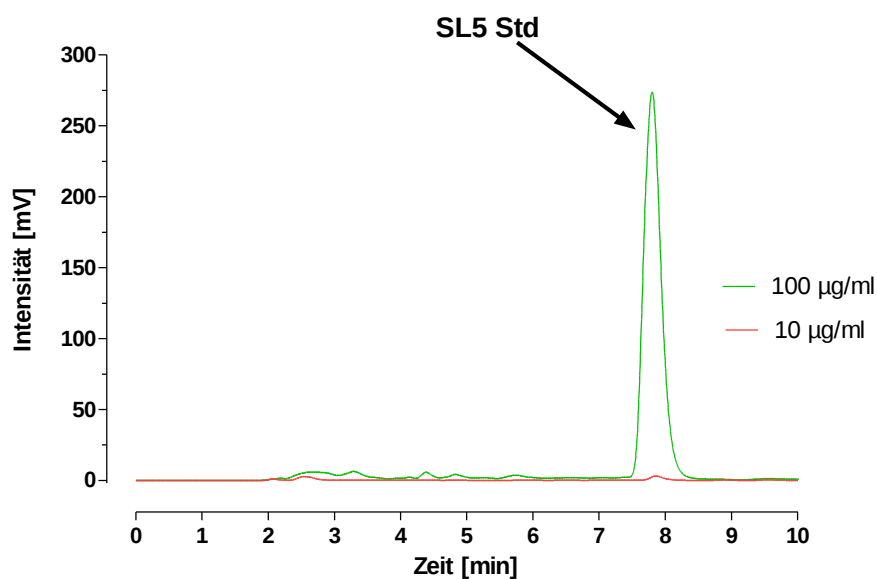


Abbildung 24: Chromatogramm des Standards von SL5 in den Konzentrationen 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml

Im Standardchromatogramm ist bei dieser Substanz ein deutlicher Peak bei einer Retentionszeit von 7,8 min zu sehen.

Tabelle 11: Gewebe, SL5

LEBER	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	0,6	96	4			
15	0,2	99	1	0	100	0
30	0,1	99	1			
Enzym 60	0,1	99	1			
Enzym 75	0,1	99	1			
HERZ	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	4,6	69	31			
15	3,8	75	25	0	100	0
30	4,5	70	30			
Enzym 60	0,9	94	6			
Enzym 75	0,7	96	4			
NIERE	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	6,4	58	42			
15	7,2	52	48			
30	9,5	37	63			
Enzym 60	1,7	89	11			
Enzym 75	1,5	90	10			

Die errechneten mittleren Gewebebindungsrate sind 98 % in der Leber, 81 % im Herzen und 65 % in der Niere. Charakteristisch ist hierbei, dass bei allen 3 Organen die Bindung mit einigen Schwankungen dazwischen während der Dauer des Versuches zunimmt. Bei der Ultrafiltration wurde für die Proteinbindung an Leber und Herz nach 15 min jeweils ein Wert von 100 % gemessen [16]. Die ermittelte Plasmaproteinbindung dieser Substanz ist 88 % [1].

Anmerkung: zum Vgl.: Der Mittelwert der Gewebebindung aus unseren drei Organen wäre 81 %.

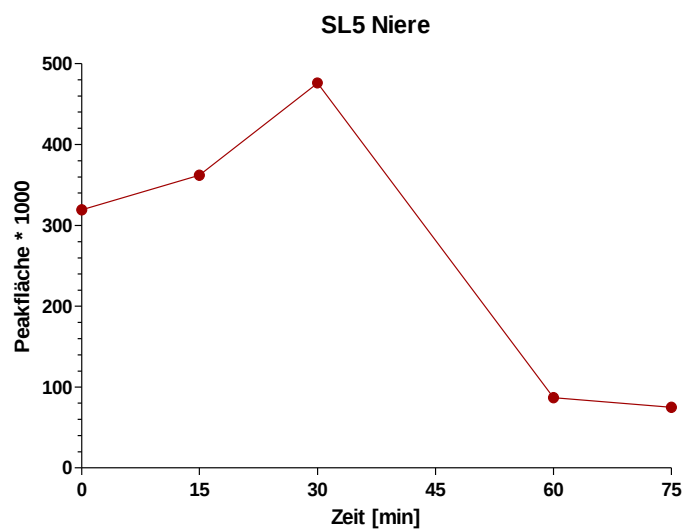
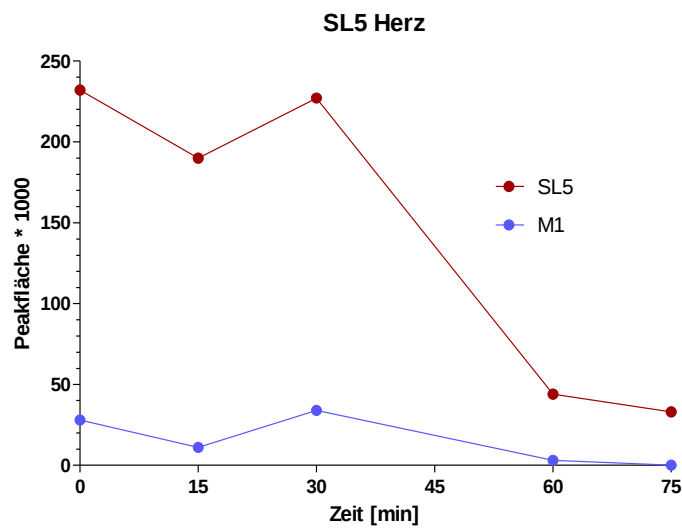
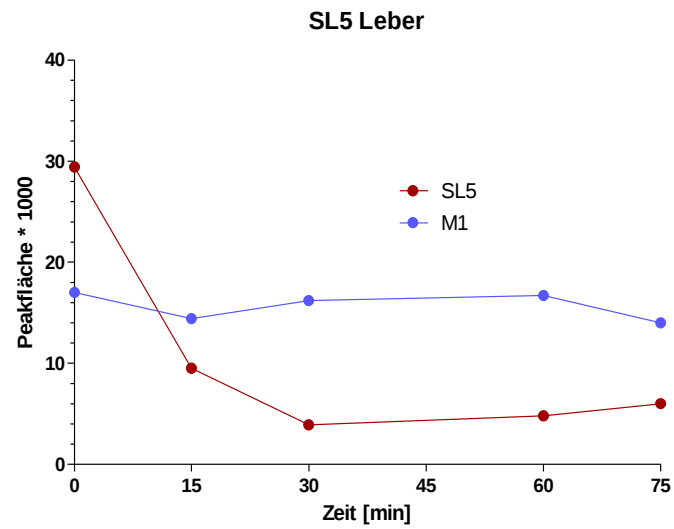


Abbildung 25: Verlauf von SL5 und dessen Metaboliten in Leber, Herz und Niere

Bei den Grafiken mit den Metaboliten sieht man eindeutig den identen Verlauf der freien Arzneistoffkonzentration in Herz und Niere. Beide steigen zuerst noch leicht an und fallen dann bis zum 75- Minutenwert rasant ab. In der Leber jedoch fällt der freie Anteil von Anfang an auf einen niedrigeren Wert und bleibt dann annähernd konstant. In diesem Organ gibt es außerdem einen Metaboliten, der die ganze Zeit über von der Konzentration her gleich bleibt, und im Herzen einen, der in weit geringerer Konzentration wie SL5 vorliegt, jedoch ein exakt gleiches Gewebebindungsmuster wie diese Substanz aufweist.

SL6

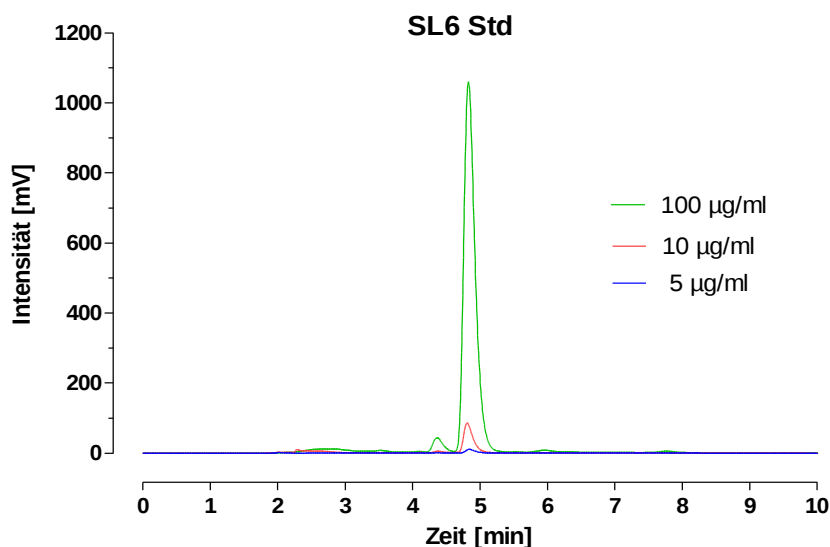


Abbildung X: Chromatogramm des Standards von SL6 in den Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml

Die Substanz SL6 hat eine Retentionszeit von 4,9 min. Es ist nur ein Peak im Standardchromatogramm sichtbar, der scharf aufgetrennt wurde.

Tabelle 12: Gewebe, SL6

LEBER	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	0,2	99	1			
15	0,1	99	1	1,5	93	7
30	0,2	98	2			
Enzym 60	0,3	98	2			
Enzym 75	0,2	99	1			
HERZ	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	1,9	87	13			
15	2,2	85	15	0,8	97	3
30	1,1	93	7			
Enzym 60	0,3	98	2			
Enzym 75	0,2	99	1			
NIERE	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	1,5	90	10			
15	1,2	92	8	0,9	96	4
30	1,3	91	9			
Enzym 60	0,5	97	3			
Enzym 75	0,4	98	2			

SL6 zeigt in allen drei Organen ziemlich hohe Gewebebindungsraten, nämlich 99 % in der Leber, 92 % im Herzen und 94 % in der Niere. Auch die Proteinbindungsergebnisse nach der Ultrafiltration korrelieren damit. Diese sind nämlich 93 % in der Leber, 97 % im Herz und 96 % in der Niere [16]. Des Weiteren ist auch die Proteinbindung an den Plasmaproteinen im Blut ähnlich hoch mit 96 % [1]. Der zeitliche Verlauf der freien Arzneistoffkonzentration zeigt bei der Leber von Anfang an einen niedrigen Wert, der in sich in weiterer Folge auch nicht mehr ändert, da die Gewebebindung ohnehin schon fast 100 % beträgt. Beim Herzen ist eine ähnliche Pharmakokinetik wie in der Niere zu beobachten, da bei beiden Organen der Anteil des ungebundenen Arzneistoffes mit der Zeit immer weiter abfällt und in ähnlich hohen Konzentrationen vorliegt.

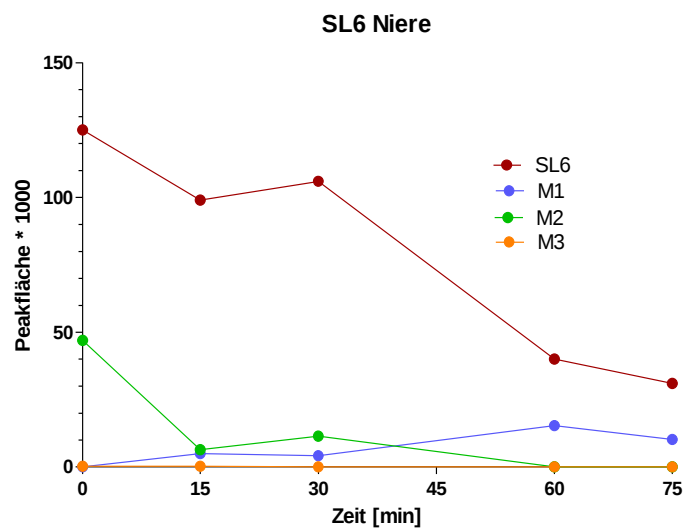
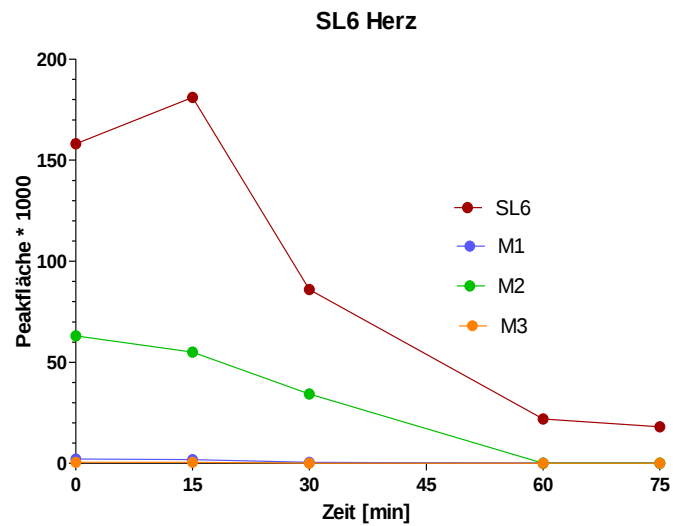
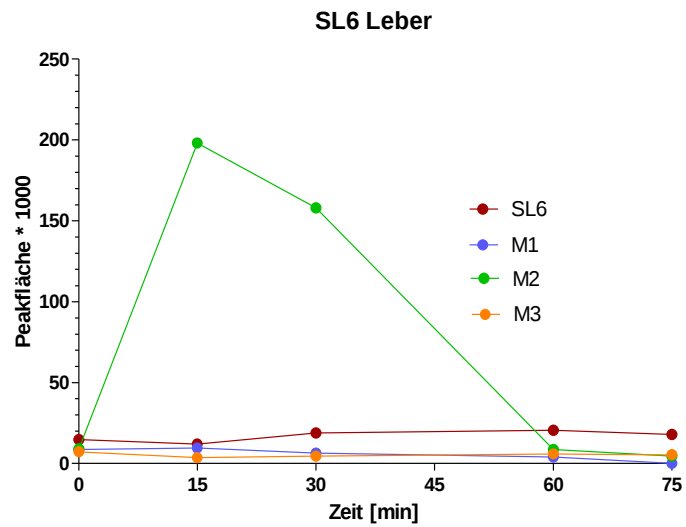


Abbildung 26: Verlauf von SL6 und dessen Metaboliten in Leber, Herz und Niere

Bei Herz und Niere sind Metaboliten vorhanden, die teilweise mit dem Schema des Verlaufes von SL6 im jeweiligen Organ korrelieren, jedoch keine hohen Konzentrationen erreichen. In der Leber gibt es außer zwei Metaboliten, die beide ähnlich gering wie diese in Herz und Niere sind, noch einen Metaboliten, nämlich M2, der ähnlich hohe Konzentrationen wie die Substanz in Herz und Niere annimmt. Dieser entwickelt sich erst langsam, erreicht nach 15min den vollen Wert und fällt dann wieder steil bergab.

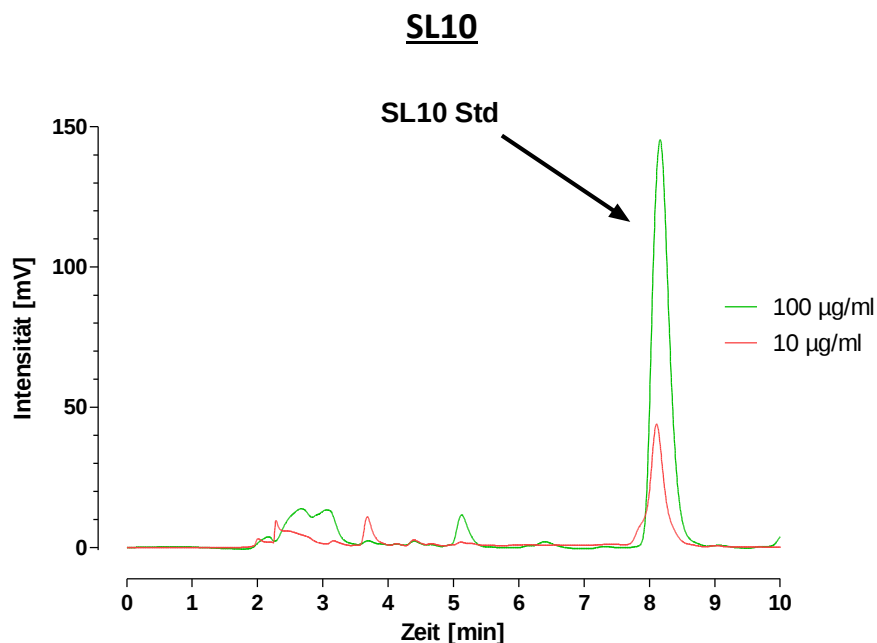


Abbildung 27: Chromatogramm des Standards von SL10 in den Konzentrationen 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml

SL10 hat eine Retentionszeit von 8,2 min. Die kleinen Systempeaks, die schon zu früheren Zeiten in den Chromatogrammen sichtbar sind, stammen von den Lösungsmitteln DMSO bzw. ACN.

Tabelle 13: Gewebe, SL10

LEBER	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	0,3	98	2			
15	0,3	98	2			
30	0,3	98	2			
Enzym 60	0,2	98	2			
Enzym 75	0,2	99	1			
HERZ	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	4,3	72	28			
15	3,1	79	21	0	100	0
30	2,7	82	18			
Enzym 60	0,8	95	5			
Enzym 75	1,5	90	10			
NIERE	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	1,1	92	8			
15	0,5	97	3			
30	0,6	96	4			
Enzym 60	0,2	99	1			
Enzym 75	0,2	99	1			

Auch diese Substanz hat in Leber und Niere hohe Gewebebindungsraten, nämlich 98 % bzw. 97 % und 84 % im Herz, die alle, mit der Dauer des Versuches ansteigend, vorliegen. Die Proteinbindung nach Ultrafiltration im Herzen liegt mit einem Wert von 100 % auch sehr hoch [16]. Genauso ist die Plasmaproteinbindung, die mithilfe der Transil XL Kits bestimmt wurde 98 % [1].

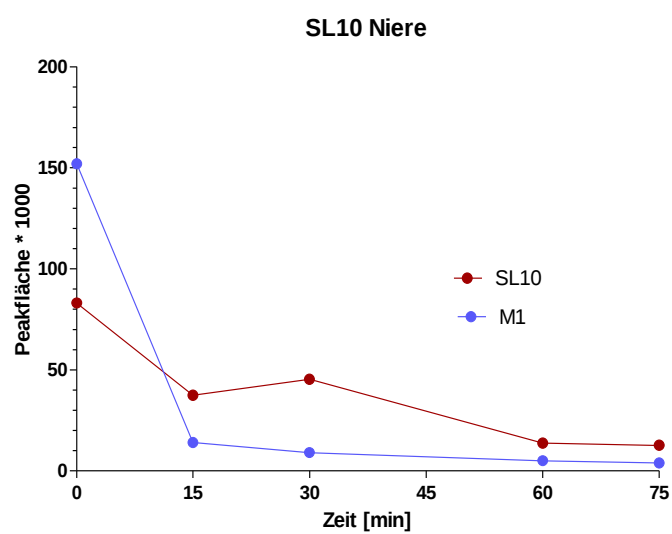
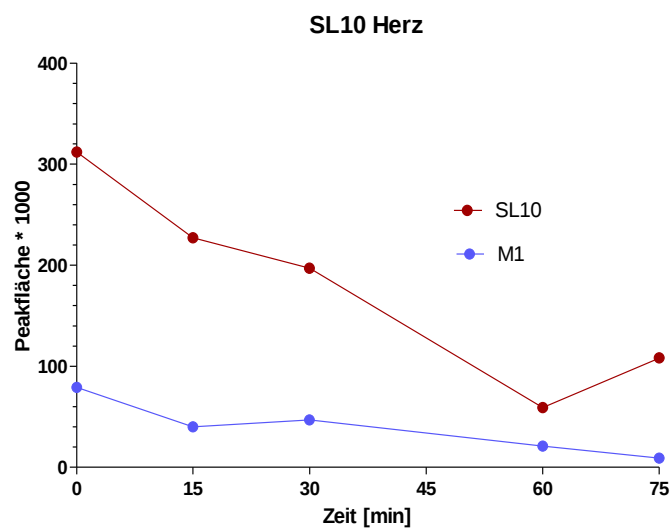
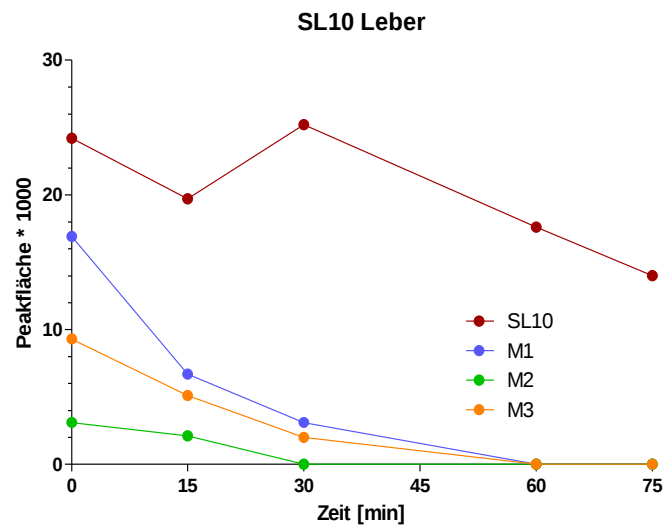


Abbildung 28: Verlauf von SL10 und dessen Metaboliten in Leber, Herz und Niere

In der Leber werden noch drei weitere Metaboliten gebildet, die jedoch alle drei nach spätestens 45 min wieder verschwinden. In Herz und Niere gibt es jeweils einen Metaboliten, der im Herz bleibt dabei annähernd konstant und derjenige in der Niere fällt bereits nach 15 min stark ab und bleibt dann ebenfalls in einer geringeren Konzentration erhalten.

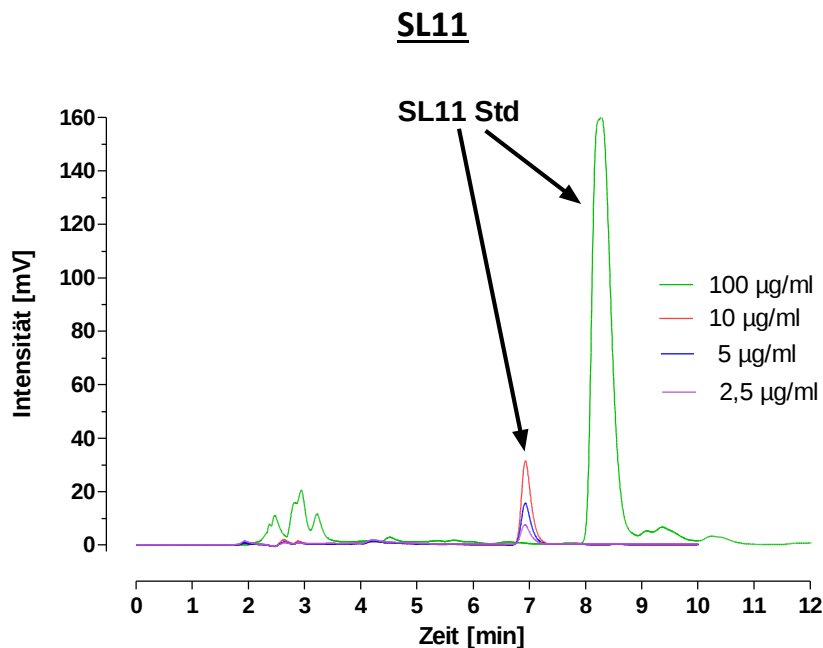


Abbildung 29: Chromatogramm des Standards von SL11 in den Konzentrationen 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml

Bei SL11 gibt es bei den Chromatogrammen des Standards verschiedene Retentionszeiten: Die Standards mit den Konzentrationen 2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml wurden ca. 2 Monate nach dem Standard mit 100 µg/ml hergestellt und analysiert und haben dabei trotz identer Arbeitsweise im Gegensatz zur 100 µg/ml-Konzentration eine andere Retentionszeit, nämlich 7 min und nicht 8,3 min wie der Standard in der 100 µg/ml-Konzentration. Wir nehmen an, dass man beide Standards als Referenzwert verwenden kann, da die Retentionszeit der Substanz in den einzelnen Geweben ca. 7,5 min beträgt und somit genau in der Mitte liegt.

Bei dieser Substanz beschäftige ich mich ausschließlich mit den Ergebnissen, die mithilfe des „isokratisch 2“- Systems gewonnen wurden, Tabelle 16 soll als Vergleich dazu dienen.

Tabelle 14: Gewebe, SL11, isokratisch 2

LEBER	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	0,7	95	5			
15	0,8	95	5	0,4	98	2
30	0,9	94	6	0,5	98	2
Enzym 60	0,3	98	2			
Enzym 75	0,3	98	2			
HERZ	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	0,1	100	1			
15	0	100	0	0,4	98	2
30	0	100	0			
Enzym 60	0	100	0			
Enzym 75	0	100	0			
NIERE	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	0,2	99	1			
15	0,1	99	1	0,5	98	2
30	0,1	100	0			
Enzym 60	0	100	0			
Enzym 75	0	100	0			

Tabelle 15: Zum Vgl.: Leber, SL11, isokratisch1

LEBER	Gewebebindung		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)
0	0,9	94	6
15	0,8	95	5
30	0,6	96	4
Enzym 60	0,9	94	6
Enzym 75	1,1	93	7

In der Leber gibt es dabei eine mittlere Gewebefestbindungsrate von 96 %, in Herz und Niere ebenfalls hohe Bindungsraten von jeweils ca. 100 %. Auch die Proteinbindung nach Ultrafiltration weist in allen drei untersuchten Organen einen hohen Wert mit jeweils 98 % auf [16]. Eine mit der Dauer des Experiments steigende Gewebefestbindungsrate, ist sowohl in Leber, als auch Herz und Niere zu beobachten, wodurch die ohnehin schon großen Bindungen zum Gewebe mit der Zeit noch weiter verstärkt werden.

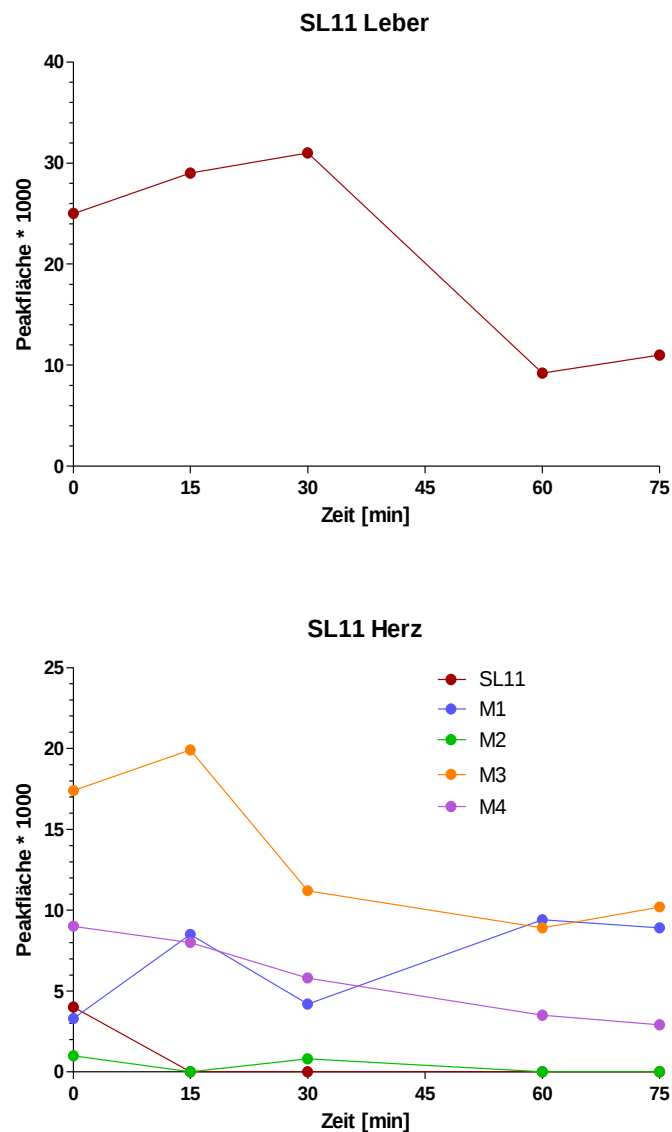


Abbildung 30: Verlauf von SL11 und dessen Metaboliten in Leber und Herz

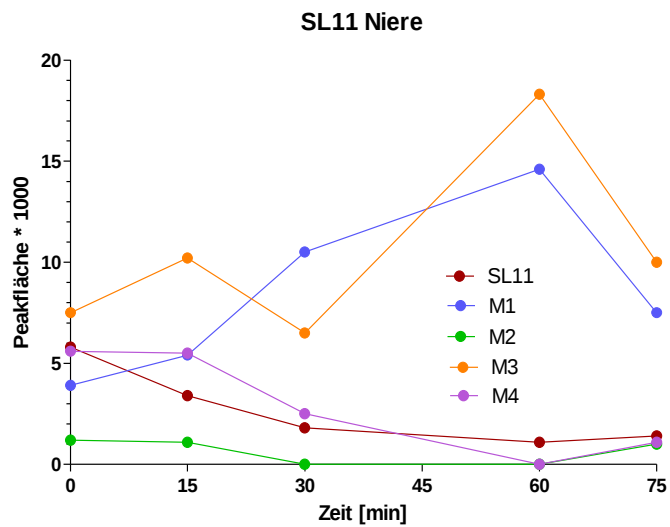


Abbildung 31: Verlauf von SL11 und dessen Metaboliten in der Niere

In der Leber wurde kein Metabolit identifiziert, in Herz und Niere jeweils vier verschiedene, die in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen und teilweise untereinander ähnliche Kinetikprofile aufweisen.

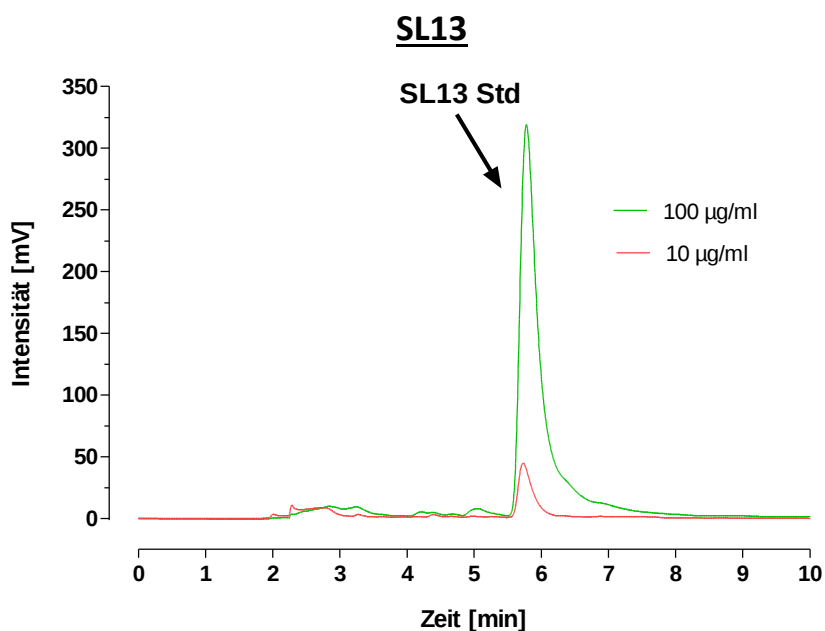


Abbildung X: Chromatogramm des Standards von SL13 in den Konzentrationen 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml

Die Retentionszeit dieser Substanz liegt bei 5,8 min.

Tabelle 16: Gewebe, SL13

LEBER	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	0	100	0			
15	0	100	0	0	100	0
30	0	100	0			
Enzym 60	0	100	0			
Enzym 75	0	100	0			
HERZ	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	0,1	99	1			
15	0	100	0	0	100	0
30	0	100	0			
Enzym 60	0	100	0			
Enzym 75	0	100	0			
NIERE	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	0	100	0			
15	0	100	0	0	100	0
30	0	100	0			
Enzym 60	0	100	0			
Enzym 75	0	100	0			

SL13 ist die Substanz mit der höchsten Gewebebindung, da sie in allen drei Organen eine Bindungsrate von 100 % aufweist. Somit ist der gesamte Arzneistoff jeweils komplett an Gewebeproteine gebunden. Auch die Proteinbindungsrate nach Ultrafiltration beträgt bei Leber, Herz und Niere 100 %, bzw. die Plasmaproteinbindung 99 % [16,1].

Des Weiteren sind in den Chromatogrammen auch keine Metaboliten erkennbar, was darauf hindeutet, dass die Substanz entweder stabil ist oder eventuell vorhandene Metaboliten eine ebenso hohe Bindungsrate besitzen und daher nicht identifiziert werden können.

3.3.4 Weitere SeaLife- Substanzen (SL1, SL2, SL8, SL9, SL12)

Des Weiteren wurde noch mit den SeaLife- Substanzen SL1, SL2, SL8, SL9 und SL12 gearbeitet, zu denen jedoch nicht alle Tests mit allen Geweben gemacht wurden und nur einzelne Ergebnisse vorliegen.

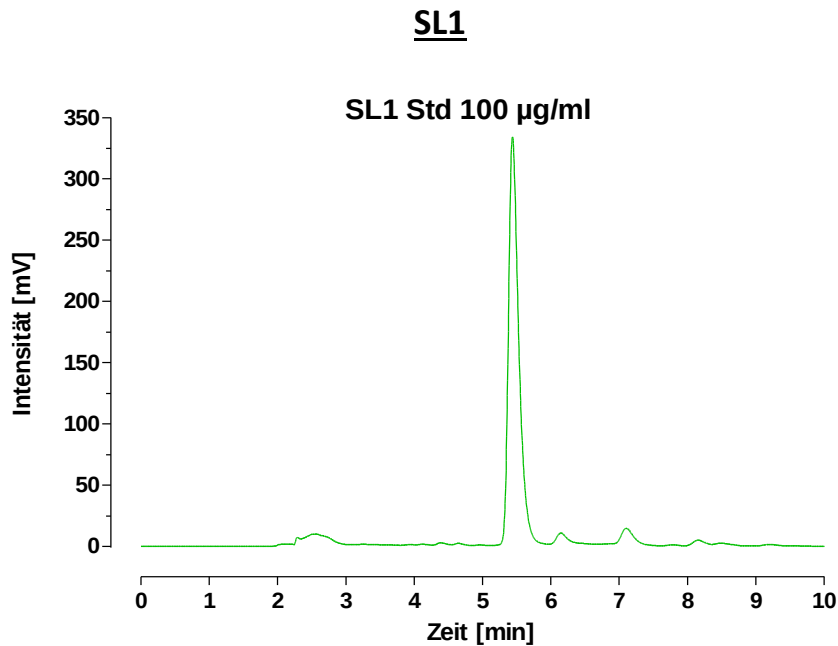


Abbildung 32: Chromatogramm des Standards von SL1 in der Konzentration 100 µg/ml

Das Standardchromatogramm von SL1 zeigt einen deutlichen, scharfen Peak bei 5,4 min.

Da unsere bisherige Rechenmethode für die Gewebebindung bei dieser Substanz zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen führte, wurde die Peakfläche des Standards vernachlässigt und stattdessen die Peakflächen der einzelnen Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten in Korrelation miteinander gesetzt, wobei der größte Wert als ein freier Anteil von 100 % dargestellt wird, was jedoch nun nicht bedeutet, dass tatsächlich nichts ans Gewebe gebunden ist, sondern es ist nur die geringste Gewebebindungsrate im vorliegenden Versuch.

Tabelle 17: Leber, Herz, SL 1

LEBER	Gewebebindung		Proteinbindung UF		
Zeit (min)	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	0	100	0,3	99	1
15	42	58	0,3	99	1
30	54	46	0,5	98	2
Enzym 60	67	33			
Enzym 75	62	38			
HERZ	Gewebebindung		Proteinbindung UF		
0	5	95	0,9	96	4
15	9	91			
30	0	100	0,4	98	2
Enzym 60	12	88			
Enzym 75	20	80			

Bei dieser Substanz beobachtet man in der Leber einen deutlichen Abfall der freien Konzentrationen, was bedeutet, dass mit der Zeit immer mehr Arzneistoff gebunden wird. Nur ganz am Schluss, nach 75 min, steigt die Menge des freien Arzneistoffes wieder leicht an, da die zugesetzten Enzyme wieder Teile des Arzneistoffes aus den Bindungen herauslösen. Im Herz schwankt die Gewebebindung zu den einzelnen Zeiten, wobei dabei der Tiefstwert 80 % des höchsten Wertes beträgt. Da bei der Proteinbindung nach Ultrafiltration für die Leber ein Mittelwert von 99 % und für das Herz von 97 % ermittelt wurde, lässt sich erahnen, dass diese Substanz auch generell eine hohe Gewebebindungsrate besitzt [16]. So beträgt auch die Plasmaproteinbindung 91 % [1].

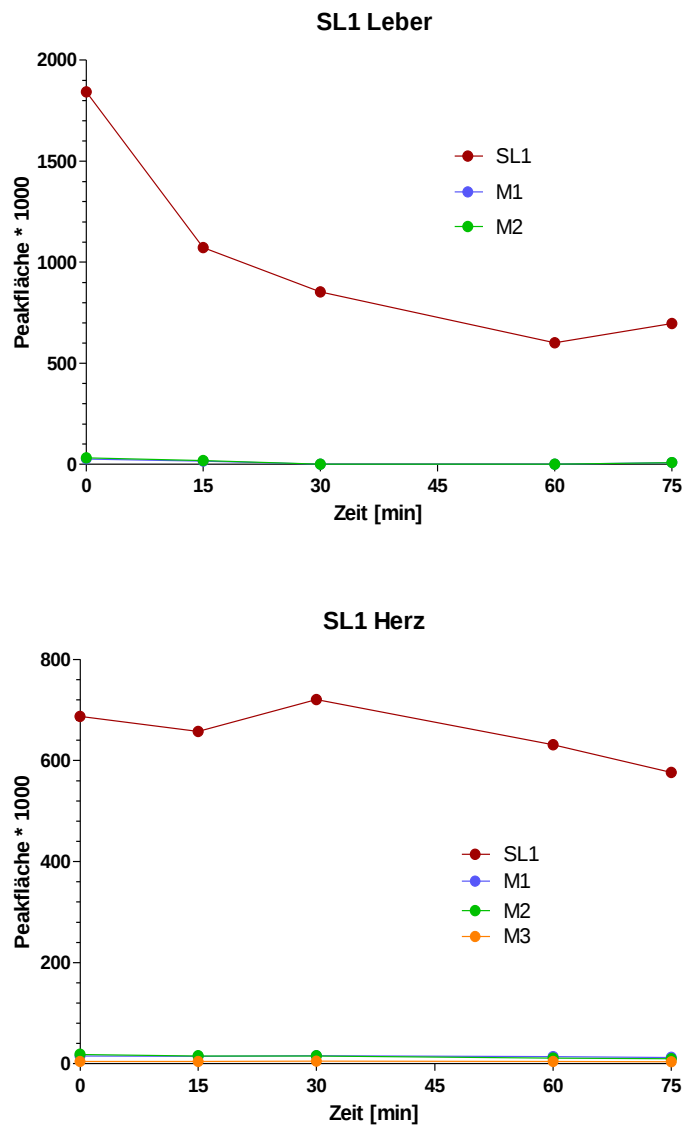


Abbildung 33: Verlauf von SL1 und dessen Metaboliten in Leber und Herz

Es gibt pro Organ jeweils mindestens zwei Metaboliten, deren Konzentrationen im Vergleich zur Hauptsubstanz jedoch so gering sind, dass sie nicht weiter erwähnenswert sind.

SL2

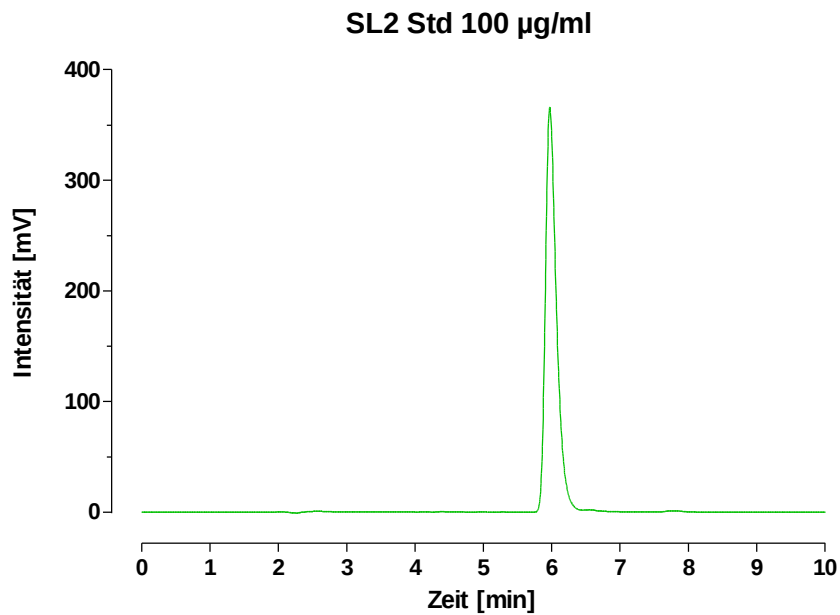


Abbildung 34: Chromatogramm des Standards von SL2 in der Konzentration 100 µg/ml

SL2 hat im Chromatogramm einen deutlichen, scharfen Standardpeak bei 6 min.

Tabelle 18: Leber, SL2

LEBER	Gewebebindung		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)
0	13,5	11	89
15	12,2	19	81
30	9,9	34	66
Enzym 60	9,1	40	60
Enzym 75	7,2	52	48

Diese Substanz unterscheidet sich deutlich von den anderen SeaLife- Testsubstanzen, da dabei in der Leber eine mittlere Gewebebindungsrate von nur 31 % ermittelt wurde. Diese steigt jedoch mit zunehmender Dauer des Versuches stets konstant an, was möglicherweise bedeuten könnte, dass diese ev. noch weiter angestiegen wäre, wenn man die Dauer des Experiments verlängert hätte.

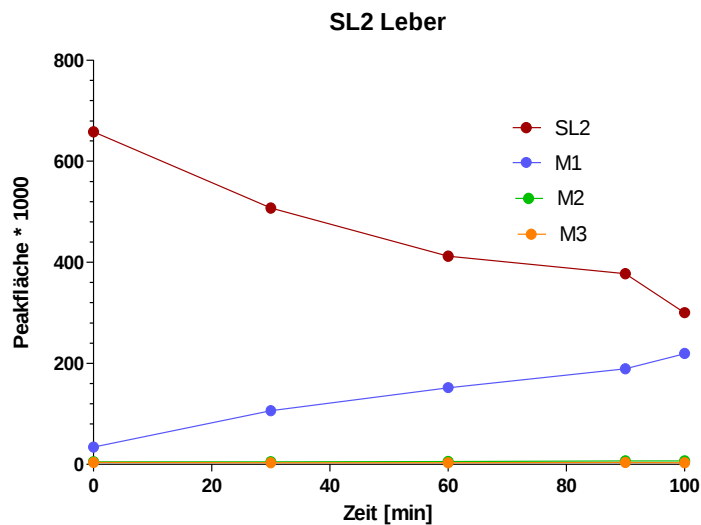


Abbildung 35: Verlauf von SL2 und dessen Metaboliten in der Leber

Es sind auch drei Metaboliten zu beobachten, wobei M2 und M3 in vernachlässigbar geringen Konzentrationen vorliegen und M1 mit der Zeit immer mehr zunimmt, woraus man schließen könnte, dass sich die Substanz langsam in M1 umlagert, da diese ja mit der Zeit immer mehr abnimmt.

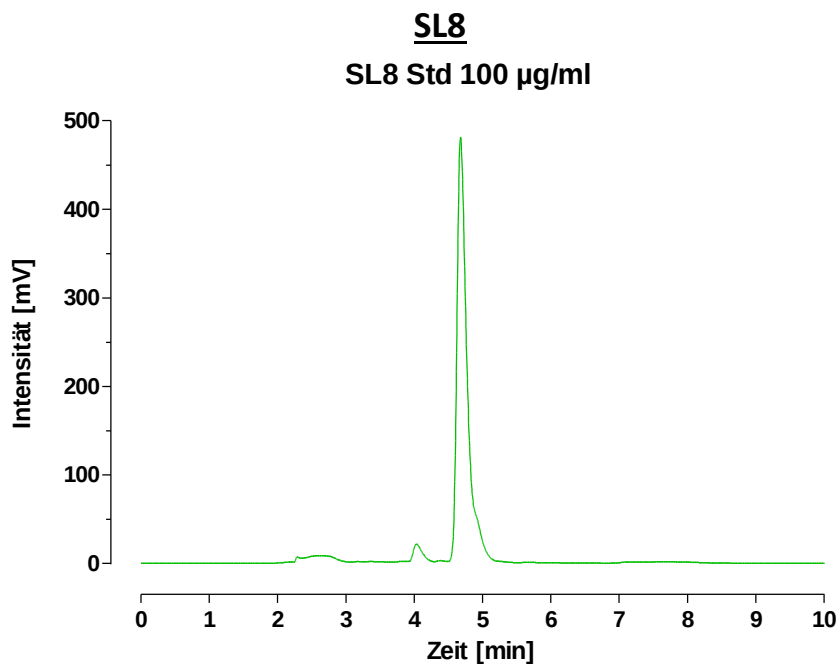


Abbildung 36: Chromatogramm des Standards von SL8 in der Konzentration 100 µg/ml

Bei SL8 gibt es im Chromatogramm des Standards einen ziemlich scharfen Peak mit hoher Intensität bei einer Retentionszeit von 4,7 min.

Tabelle 19: Leber,Herz,SL8

LEBER	Gewebebindung	
Zeit (min)	GB (%)	Anteil frei (%)
0	0	100
15	30	70
30	76	24
Enzym 60	99	1
Enzym 75	100	0
HERZ	Gewebebindung	
Zeit (min)	GB (%)	Anteil frei (%)
0	0	100
15	40	60
30	78	22
Enzym 60	97	3
Enzym 75	97	3

Bei dieser Substanz wurde wieder die Rechenmethode angewendet, wo der höchste Peak als 100 % angenommen wird und die anderen Peaks derselben Substanz und desselben Gewebes zu den unterschiedlichen Zeiten darauf bezogen werden.

Dabei ist sowohl in der Leber, als auch im Herzen ein charakteristisches Bindungsmuster sichtbar. In beiden Organen beträgt die Gewebebindung direkt nach Arzneistoffzugabe 0 %. Dann steigt sie in beiden Organen in ca. gleich großen Sprüngen an, bis sie bei beiden nach 75 min rund 100 % beträgt. Die Plasmaproteinbindung von SL8 beträgt 99 % [1]. Diese bestätigt unsere Ergebnisse, da bei unseren Versuchen am Ende auch jeweils fast der gesamte Arzneistoff gewebegebunden vorliegt.

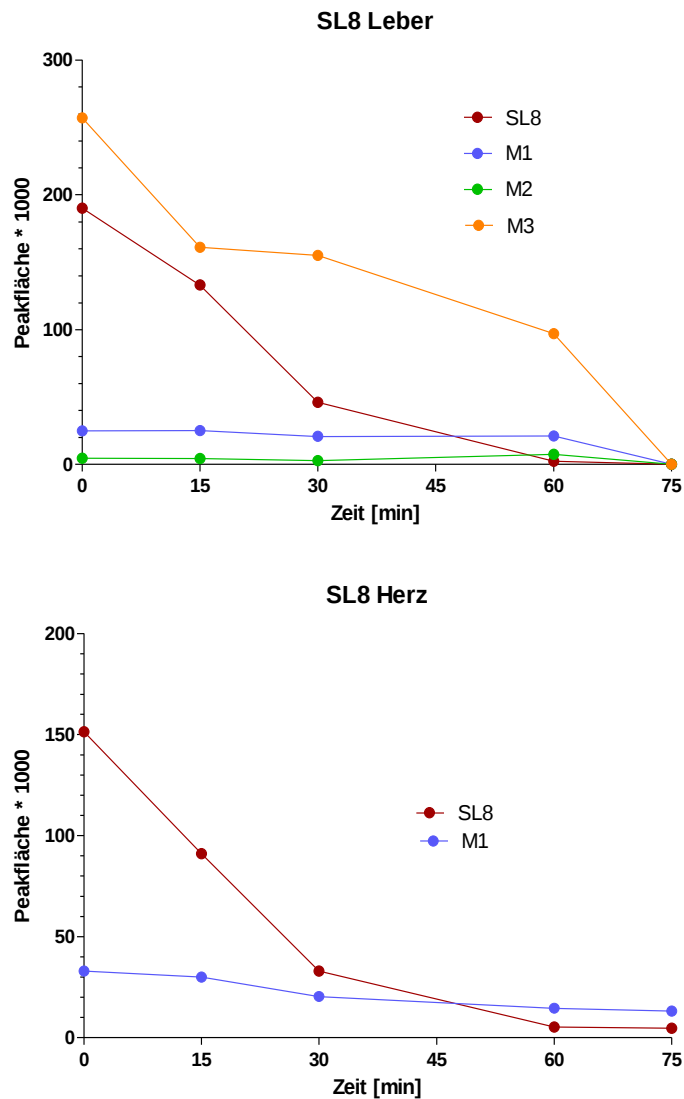


Abbildung 37: Verlauf von SL8 und dessen Metaboliten in Leber und Herz

Bei der Leber sind des Weiteren noch insgesamt drei Metaboliten in den einzelnen Chromatogrammen vorhanden. M1 und M2 liegen in nur sehr geringen Konzentrationen vor und sind während des ganzen Versuchs annähernd konstant, bis sie nach 75 min beide den Wert 0 erreichen. M3 liegt sogar in einer höheren Konzentration als der freie Arzneistoffanteil vor und fällt auch parallel zu diesem mit zunehmender Zeit stetig bis auf den Wert 0 ab, wiederum nach 75 min.

SL9

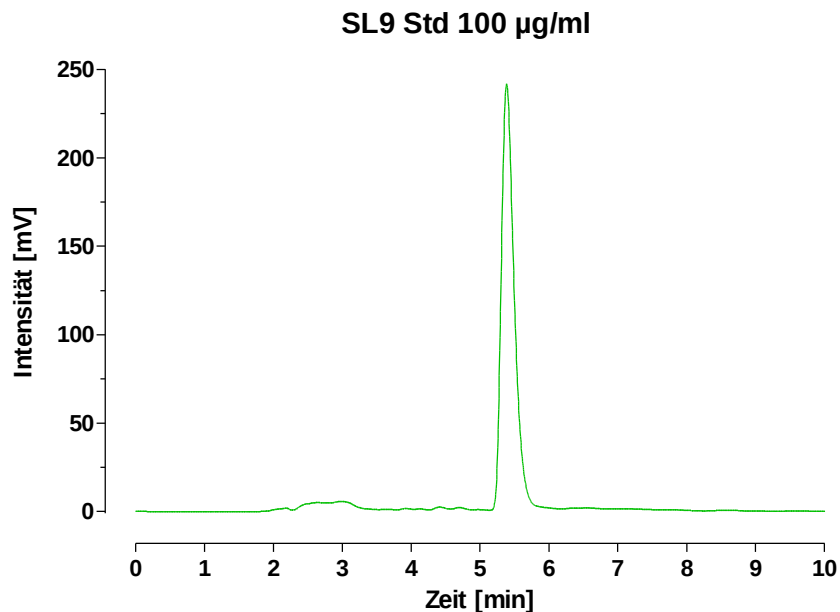


Abbildung 38: Chromatogramm des Standards von SL9 in der Konzentration 100 µg/ml

Im Chromatogramm des Standards von SL9 zeigt sich bei einer Retentionszeit von 5,3 min ein scharf abgegrenzter Peak.

Tabelle 20: Leber,SL9

LEBER	Gewebebindung*	
	GB (%)	Anteil frei (%)
Zeit (min)		
0	0	100
15	38	62
30	63	37
Enzym 60	68	32
Enzym 75	69	31

Bei dieser Substanz wurde nur die Gewebebindung in der Leber analysiert und dabei wiederum die Werte der einzelnen Probenentnahmen auf die größte Peakfläche (=100 %) bezogen. So ist zunächst eine starke Zunahme der Gewebebindungsrate zu verzeichnen, die ab dem 30- Minutenwert ziemlich konstant bleibt und dann nur noch jeweils leicht zunimmt. Die Plasmaproteinbindungsrate dieser Verbindung beläuft sich auf 95 % [1].

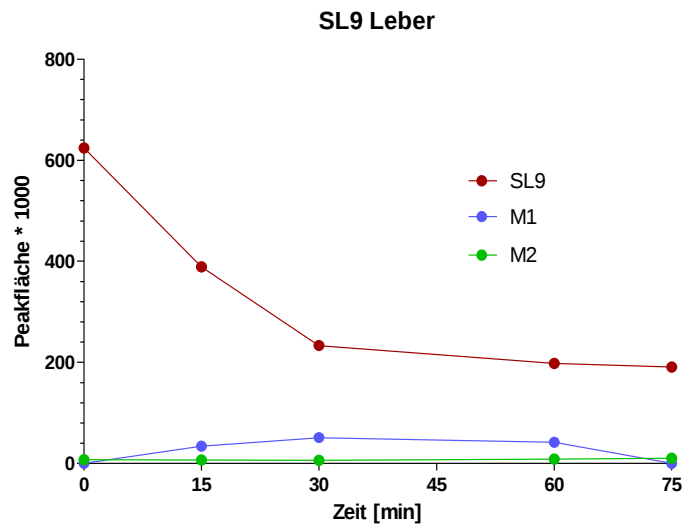


Abbildung 39: Verlauf von SL9 und dessen Metaboliten in der Leber

Es sind auch zwei Metaboliten in den Chromatogrammen sichtbar, die jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen im Gegensatz zu SL9 vorliegen und beide annähernd konstant bleiben.

SL12

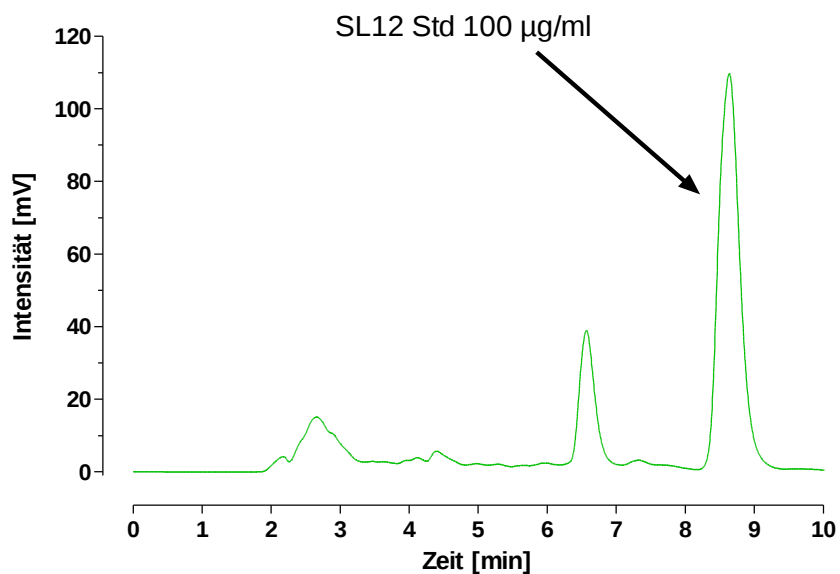


Abbildung 40: Chromatogramm des Standards von SL12 in der Konzentration 100 µg/ml

Der Standard von SL12 erscheint im Chromatogramm bei einer Retentionszeit von 8,6 min. Zusätzlich gibt es noch einen Nebenpeak bei 6,6 min. Da von dieser Substanz nur ein Standard in der Konzentration 100 µg/ml gemacht wurde, wäre es aufgrund

dieses zweiten Peaks interessant, auch ein weiteres Chromatogramm in einer anderen Konzentration des Standards zum Vergleich zu haben, um den Zusammenhang dieses Peaks mit dem Hauptpeak überprüfen zu können. Dies wurde jedoch nicht gemacht, da wir uns eher auf die 6 wichtigen Substanzen fokussiert haben.

Tabelle 21: Leber, SL12

LEBER	Gewebebindung	
Zeit (min)	GB (%)	Anteil frei (%)
0	0	100
15	1	99
30	24	76
Enzym 60	38	62
Enzym 75	55	45

Nichtsdestotrotz zeigt die Verbindung in der Leber eine nahezu kontinuierliche Zunahme der Gewebebindungsrate mit der Zeit, die sich im Verhältnis zum Ausgangswert nach 75 min mehr als verdoppelt hat. Die Plasmaproteinbindung liegt mit einem Wert von 99 % ziemlich hoch [1].

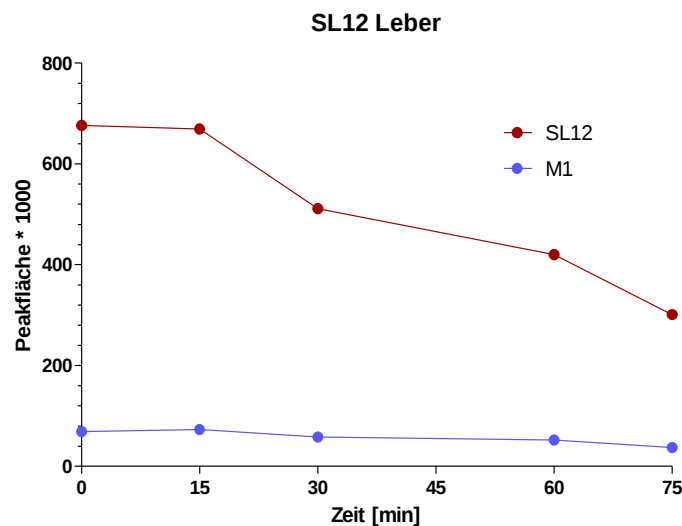


Abbildung 41: Verlauf von SL12 und dessen Metaboliten in der Leber

In den Chromatogrammen ist auch ein Metabolit sichtbar, dessen Konzentration ca. nur ein Zehntel der Hauptschubstanz beträgt. Außerdem ist bei diesem Metaboliten, der von Anfang an in annähernd gleicher Konzentration vorliegt, auch keine spezielle Kinetik zu beobachten.

3.3.5 Vergleichssubstanzen

Um auch Verbindungen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften wie unsere SeaLife- Substanzen zu testen, wurden folgende Vergleichssubstanzen herangezogen: Capecitabin, Diosmin und Flavopiridol. Bei allen drei Verbindungen sind keine Metabolite in den Chromatogrammen sichtbar. Auch Doxorubicin und Linezolid gehören dazu, wobei man bei diesen zweien jeweils nur die mikrosomale und intestinale Bindung mithilfe der Transil XL Kits bestimmt hat.

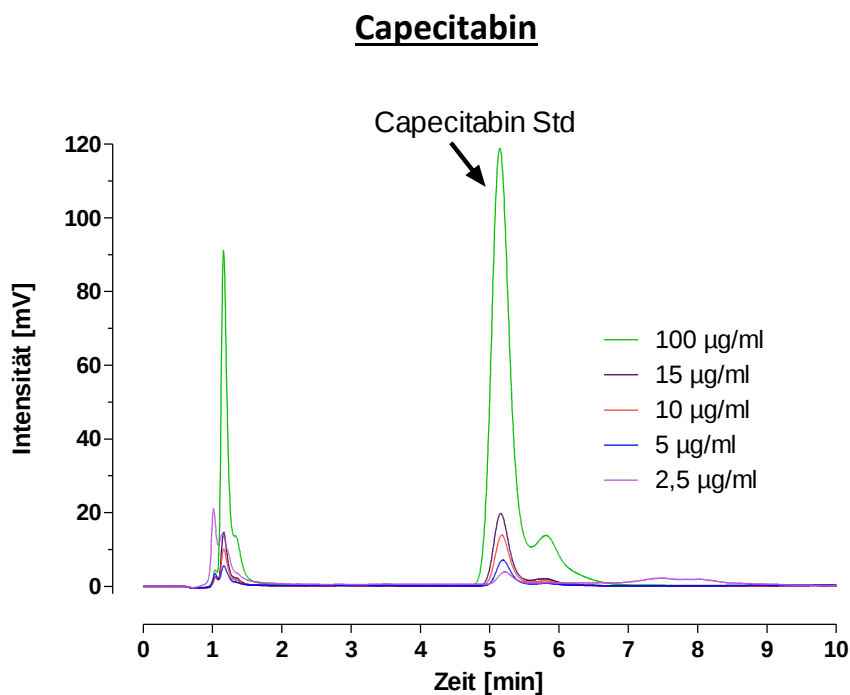


Abbildung 42: Chromatogramm des Standards von Capecitabin in den Konzentrationen 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 100 µg/ml

Der Standard von Capecitabin zeigt sowohl bei 1,2 min als auch bei 5,2 min einen Peak. Der Peak bei 5,2 min wird als Hauptpeak herangezogen, da dieser von stärkerer Intensität ist.

Tabelle 22: Gewebe, Capecitabin

LEBER	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	14,0	8	92			
15	9,1	40	60	4,0	82	18
30	6,2	59	41			
Enzym 60	2,8	82	18			
Enzym 75	2,0	87	13			
HERZ	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	12,0	21	79			
15	14,7	3	97			
30	14,3	6	94			
Enzym 60	14,6	4	96			
Enzym 75	14,1	7	93			
NIERE	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	14,2	6	94			
15	14,3	6	94			
30	12,7	16	84			
Enzym 60	11,0	27	73			
Enzym 75	10,0	34	66			

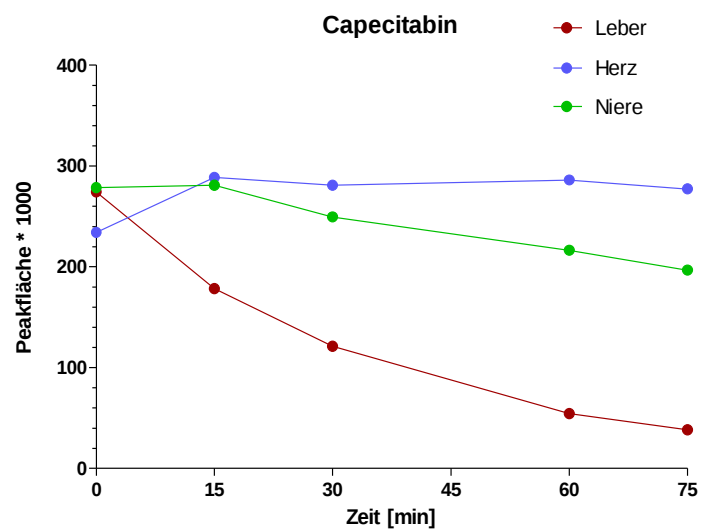


Abbildung 43: Verlauf von Capecitabin in Leber, Herz und Niere

Die mittleren Gewebebin­dungsra­ten be­tra­gen in der Leber 55 %, im Herz 8 % und in der Niere 18 %. In der Leber ist da­bei eine starke Zu­nahme der Bin­dung gleich zu Beginn des Ex­per­i­ments zu ver­zeich­nen, die dann mit der Zeit noch immer grö­ßer wird. Im Herzen ist kei­ne be­stimmte Ten­denz im Bin­dungs­schema fest­stell­bar, und in der Niere wird die Bin­dung mit der Zeit auch immer grö­ßer.

Die Pro­tein­bin­dung nach der Ultra­fil­tra­tion be­trägt in der Leber 82 % und die theo­re­ti­sche Pro­tein­bin­dung von Capecitabin laut Li­te­ra­tur ist 54 % [16].

Des Wei­te­ren wur­den mit­hil­fe der Transil XL Kits eine mi­kro­so­male Bin­dung von 4 % und eine in­tes­ti­nale von 42 % er­mit­telt.

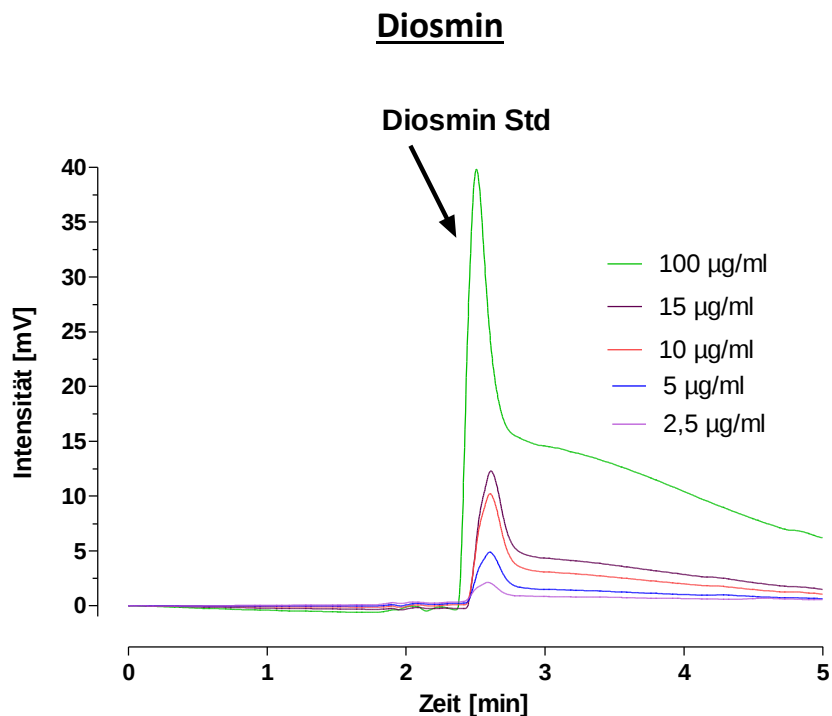


Abbildung 44: Chromatogramm des Standards von Diosmin in den Konzentrationen 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 100 µg/ml

Diosmin hat beim Standardchromatogramm einen Peak bei der Retentionszeit 2,6 min. Mithilfe diesen kann man zwar eindeutig die Substanz in den verschiedenen Geweben identifizieren, jedoch kann er nicht zum Rechnen und Bestimmen der Gewebebin­dung der einzelnen Proben herangezogen werden, da starkes tailing auftritt und somit die Peakfläche nicht mehr aussagekräftig ist. Daher wird auch bei Diosmin jeweils pro Organ der höchste Peakflächenwert als 100 % freier Anteil definiert und die anderen Werte darauf bezogen.

Tabelle 23: Gewebe, Diosmin

LEBER	Gewebebindung*		Proteinbindung UF		
Zeit (min)	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	0	100			
15	14	86	10,8	52	48
30	62	38			
Enzym 60	66	34			
Enzym 75	27	73			
HERZ	Gewebebindung		Proteinbindung UF		
Zeit (min)	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	0	100			
15	73	27	12,4	45	55
30	76	24			
Enzym 60	89	11			
Enzym 75	89	11			
NIERE	Gewebebindung		Proteinbindung UF		
Zeit (min)	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	2	98			
15	0	100	3,4	85	15
30	2	98			
Enzym 60	16	84			
Enzym 75	4	96			

Diosmin

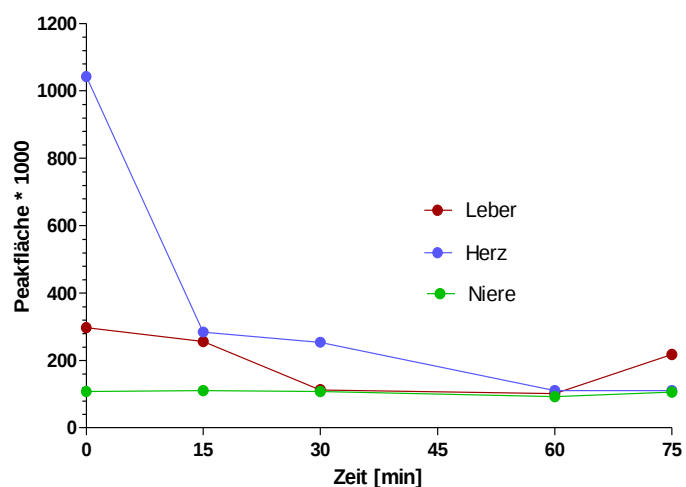


Abbildung 45: Verlauf von Diosmin in Leber, Herz und Niere

In der Leber kann man dabei beobachten, dass die Gewebebindung stetig zunimmt und erst am Schluss durch das Enzym nach 75 min wieder geringer wird. Im Herz nimmt die Bindung ebenfalls stark zu, einen besonders großen Sprung gibt es dabei zwischen dem 0- und 15- Minutenwert. Keinen bestimmten Arzneistoffverlauf gibt es in der Niere. Hierbei sind auch keine starken Schwankungen zu verzeichnen, da alle freien Arzneistoffkonzentrationen zwischen 84 % und 100 % des höchsten Wertes liegen.

Die Proteinbindung nach Ultrafiltration beträgt bei der Leber 52 %, beim Herz 55 % und bei der Niere 15 % [16]. Diese Werte korrelieren gut mit der theoretischen Proteinbindung dieser Substanz, die 31 % ist.

Diosmin hat nur eine geringe mikrosomale Bindung (2 %) sowie eine höhere intestinale Bindung mit 61 %.

Flavopiridol

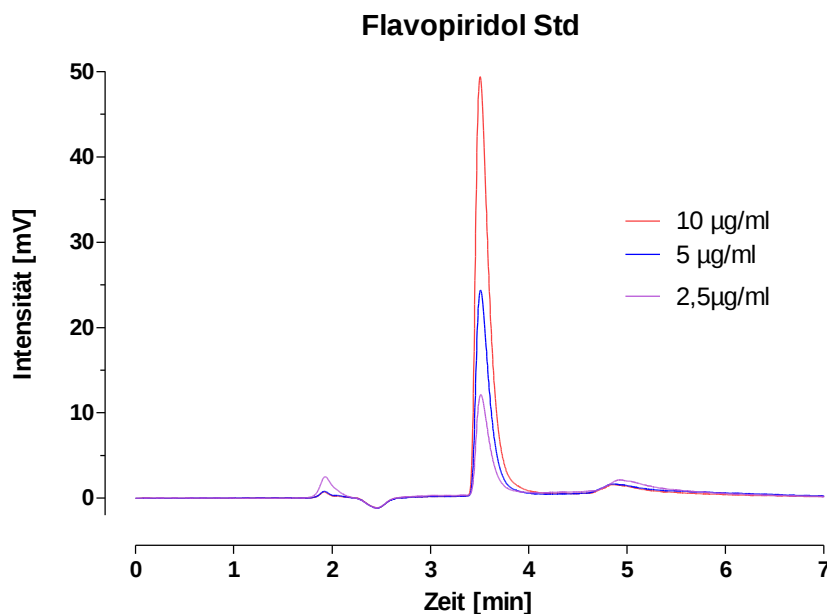


Abbildung 46: Chromatogramm des Standards von Diosmin in den Konzentrationen 2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml

Der Standard von Flavopiridol zeigt die Substanz bei einer Retentionszeit von 3,5 min.

Tabelle 24: Gewebe, Flavopiridol

LEBER	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
Zeit (min)	µg/ml	GB (%)	Anteil frei (%)	µg/ml	PB (%)	Anteil frei (%)
0	1,8	88	12			
15	1,6	89	11	13,8	39	61
30	1,2	92	8			
Enzym 60	0,8	95	5			
Enzym 75	0,5	97	3			
HERZ	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	10,3	32	68			
15	0,8	95	5			
30	1,1	93	7			
Enzym 60	1,1	92	8			
Enzym 75	1,2	92	8			
NIERE	Gewebebindung			Proteinbindung UF		
0	1,2	92	8			
15	1,1	93	7	0	100	0
30	1,1	93	7			
Enzym 60	1,2	92	8			
Enzym 75	1,2	92	8			

Flavopiridol

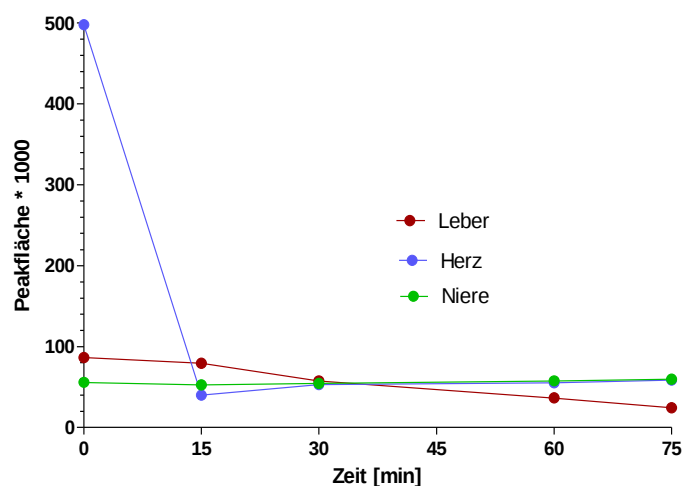


Abbildung 47: Verlauf von Flavopiridol in Leber, Herz und Niere

Die durchschnittliche Gewebefindung in der Leber beträgt 92 %, im Herz 99 % und in der Niere 92 %. Bei der Leber nimmt die Bindung dabei mit der Zeit stetig zu, im Herzen gibt es keinen besonderen Gewebefindungsverlauf und in der Niere ist die Bindungsrate fast immer genau gleich. Generell sind die einzelnen Werte der Organe ab den 15- Minutenwerten fast ident.

Bei der Proteinbindung nach Ultrafiltration ist diese in der Leber 39 % und in der Niere 100 % [16].

Diese Substanz hat eine mikrosomale Bindung von 10 % und die höchste intestinale Bindungsrate aller Vergleichssubstanzen mit 94 %.

Doxorubicin

Doxorubicin zeigt die höchste mikrosomale Bindungsrate der Vergleichssubstanzen, nämlich 11 % und eine intestinale Bindung von 65 %.

Linezolid

Diese Vergleichssubstanz hat die geringste mikrosomale Bindung aller Vergleichssubstanzen mit nur 1 %. Die intestinale Bindung dieser Substanz beträgt 40 %.

4.Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden präklinische Untersuchungen zur Gewebefindung von neuen Anthrachinonderivaten und fünf Vergleichssubstanzen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften durchgeführt.

Dafür wurde von den drei Organen Leber, Herz und Niere jeweils ein Homogenisat hergestellt und die Gewebefindung der einzelnen Arzneistoffe daran gemessen.

Die mikrosomale, bzw. intestinale Bindung wurden mithilfe der Transil XL Kits Tests ermittelt und die Proteinbindung nach Ultrafiltration bzw. Plasmaproteinbindung von anderen Diplomarbeiten übernommen.

Tabelle 25: Ergebnisse der einzelnen Bindungsarten (jeweils in %)

Substanz	GB Leber [L]	GB Herz [H]	GB Niere [N]	PB nach UF [L/H/N]	PPB	Micro- somal	Int- estinal	Meta- boliten
SL3	40	90	93	100/100/-	95	siehe [1]	siehe [1]	Ja
SL5	98	81	65	100/100/-	88	s. [1]	s.[1]	Ja
SL6	99	92	94	93/97/96	96	s. [1]	s.[1]	Ja
SL10	98	84	97	-/100/-	98	s. [1]	s.[1]	Ja
SL11	96	100	100	98/98/98	88	s. [1]	s.[1]	Ja
SL13	100	100	100	100/100/100	99	s. [1]	s.[1]	-
SL1				99/97/-	91	s. [1]	s.[1]	Ja
SL2	31				97	s. [1]	s.[1]	Ja
SL8					99	s. [1]	s.[1]	Ja
SL9					95	s. [1]	s.[1]	Ja
SL12					99	s. [1]	s.[1]	Ja
CCB	55	8	18	82/-/-	54	4	42	-
Diosmin				52/55/15	31	2	61	-
Doxorubicin					75	11	65	-
Flavopiridol	92	99	92	39/-/100	90	10	94	-
Linezolid					30	1	40	-

Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die SeaLife- Substanzen stark an Leber, Herz bzw. Niere binden und dieses Bindungsverhalten auch mit der Proteinbindung nach Ultrafiltration bzw. der Plasmaproteinbindung übereinstimmt. Es gibt leichte Unterschiede im Bindungsverhalten der einzelnen Substanzen, wobei man die höchste Gewebefindung in der Niere (Durchschnitt aller Substanzen = 92 %) findet, dicht gefolgt vom Herzen (91 %) und der Leber (89 %). Des Weiteren werden auch bei vielen Substanzen Metaboliten identifiziert, die teilweise mit dem zeitlichen Verlauf des Arzneistoffes korrelieren. Die mikrosomale bzw. intestinale Bindungen der Vergleichssubstanzen fallen eher niedriger aus und korrelieren somit sehr gut mit deren niedrigeren Proteinbindungen laut Literatur. Die einzige Ausnahme ist dabei Flavopiridol, das jedoch generell eine höhere Proteinbindung hat.

5.Conclusio

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmals die hohen Gewebefestbindungsgraden der neuen SeaLife- Substanzen. Da die Gewebefestbindung noch mehr als die Plasmaproteinbindung, die bei diesen Substanzen ebenfalls sehr hoch ist, in sehr große scheinbare Verteilungsvolumina im menschlichen Körper resultiert, könnte dies unter Umständen problematisch werden. In weiterer Folge bräuchte man dadurch nämlich höhere Arzneistoffgaben, um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erzielen, da sich der Arzneistoff somit im Körper nun generell stärker verteilt, bzw. ja nur der freie Arzneistoffanteil wirksam ist. Wenn man nun solch extrem hohe Dosen anwendet, muss man wiederum sehr aufpassen, dass man im therapeutischen Fenster bleibt und die höchst verträgliche Arzneistoffmenge trotzdem nicht überschritten wird.

Außerdem könnten durch die Bindung der Substanzen an Leber, Herz bzw. Niere die Organe dadurch auch geschädigt werden.

6. Abstract

Studies to tissue distribution and metabolism of anthraquinone derivatives

Background:

SeaLife Pharma GmbH in Tulln synthesized new compounds with antibacterial, antiviral, antifungal and cytostatic effects. All these new derivatives, which have an anthraquinone basic structure, show high bindingrates to plasmaproteins. That's why we wanted to prove if their bindings to tissue are also that high.

For comparison, we have also investigated substances with different properties, namely capecitabine, diosmin, doxorubicin, flavopiridol and linezolid. There we have also measured the intestinal and microsomal bindingrates.

Method:

For measuring the tissue binding, we produced a homogenisat with the organs liver, heart or kidney and DMSO, mixed it, added the stock solution of the drug, centrifuged it and quantified after certain points of time the supernatant of the free portion of drug by HPLC- analysis.

The intestinal and microsomal bindingrates were obtained by use of the Transil XL Kits testsystem. There you have to put an 80 μ mol stock solution of the substance into wells filled with varying concentrations of immobilized natural phosphatidylcholine membrane vesicles and measure the affinity of the test compounds to the membranes.

Results and discussion:

In general, high tissue bindings were observed, namely 92 % to kidney, 91 % to heart and 89 % to liver.

High bindingrates in general could become a problem, because they result in high distribution volumes. So you need higher doses whereat on the other hand you have to be careful that you don't exceed the maximal tolerable therapeutic concentration.

The microsomal and intestinal bindings of the substances for comparison were rather low, which is in correlation with their plasmaprotein bindings.

I. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Analysierte Substanzen	9
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	9
Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien	10
Tabelle 4: Lösungsvorgang der einzelnen Substanzen für die Gewebehomogenisation	14
Tabelle 5: Parameter des HPLC-2 Systems von der Firma MERCK HITACHI®	21
Tabelle 6: Parameter des HPLC-3 Systems von der Firma MERCK HITACHI®	21
Tabelle 7: Parameter des HPLC-4 Systems von der Firma VWR HITACHI®	21
Tabelle 8: HPLC- Systeme	22
Tabelle 9: Ergebnisse der Transil XL Kits	25
Tabelle 10: Gewebe, SL3	28
Tabelle 11: Gewebe, SL5	31
Tabelle 12: Gewebe, SL6	34
Tabelle 13: Gewebe, SL10	37
Tabelle 14: Gewebe, SL11, isokratisch 2	40
Tabelle 15: Zum Vgl.: Leber, SL11, isokratisch1	40
Tabelle 16: Gewebe, SL13	43
Tabelle 17: Leber, Herz, SL 1	45
Tabelle 18: Leber, SL2	47
Tabelle 19: Leber,Herz,SL8	49
Tabelle 20: Leber,SL9	51
Tabelle 21: Leber, SL12	53
Tabelle 22: Gewebe, Capecitabin	55
Tabelle 23: Gewebe, Diosmin	57
Tabelle 24: Gewebe, Flavopiridol	59
Tabelle 25: Ergebnisse der einzelnen Bindungsarten (jeweils in %)	61

II. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
ev.	eventuell
fu	fraction unbound (=freie Arzneistoffkonzentration)
GB	Gewebebindung
k	Transferrate, bzw. Gleichgewichtskonstante
Konz.	Konzentration
M	Metabolit
MA	Membranaffinität
min	Minute(n)
PB	Proteinbindung
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PPB	Plasmaproteinbindung
r^2	Korrelationskoeffizient
RT	Retentionszeit
sec	Sekunde(n)
U	Umdrehungen
Vd	Verteilungsvolumen
Vgl.	Vergleich

III. Literaturverzeichnis

- [1] Katharina Sagaischek, Valerie Klug, Universität Wien Diplomarbeit, Division für klinische Pharmazie und Diagnostik, Wien 2014
- [2] Dr.med. univ. Mag.pharm. Susanne Stejskal: Präklinische Untersuchungen mit neuen Anthrachinonderivation, Universität Wien Diplomarbeit, Division für klinische Pharmazie und Diagnostik, Wien 2013
- [3] <http://www.freepatentsonline.com/EP2435394.html>, letzter Zugriff am 12.02.14
- [4] User Guide Transil^{XL} Microsomal Binding Kit (von Sovicell) , Part No. TMP- 0120-2096 M, Version 2, Revision 00, p.2
- [5] User Guide Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit (von Sovicell), Part No. TMP-0100-2096 M, Version 2, Revision 00, p.2-6
- [6] Ming Hu, Xiaoling Li: Oral Bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications, 2011, Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p.158-162
- [7] Tekoa L. King, Mary C. Brucker: Pharmacology for Women's Health, 2010, Verlag: Jones & Bartlett Pub, p.33-34
- [8] Younggil Kwon: Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists, 2001, Verlag: Springer, p.118-119
- [9] Thomas N. Tozer, Malcolm Rowland: Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Quantitative Basis of Drug Therapy, 2006, Verlag: Lippincott Raven, p.87
- [10] Jim Riviere: Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques and Applications, 2.Auflage, 2011, Verlag: John Wiley & Sons, p.86
- [11]Deirdre Kelly: Diseases of the Liver and Biliary System in Children, 3.Auflage, 2009, Verlag: John Wiley & Sons, p.11-13
- [12] Henryk Dancygier :Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases, Band 1, 2009, Verlag: Springer, p.82
- [13] Arthur J. Atkinson, Jr.,Shiew-Mei Huang,Juan J.L. Lertora,Sanford P. Markey: Principles of Clinical Pharmacology, 3.Ausgabe, 2012, Herausgeber: Academic Press (Elsevier), p.263

- [14] <http://www.sign-lang.uni-hamburg.de/glex/konzepte/l7663.htm>, letzter Zugriff am 12.2.14
- [15] <http://biologie.deacademic.com/2728/Niere>, letzter Zugriff am 12.2.14
- [16] Cornelia Oberndorfer: Präklinische Pharmakokinetik von Anthrachinonderivaten, Universität Wien Diplomarbeit, Division für klinische Pharmazie und Diagnostik, Wien 2014
- [17] Dr. Bruno Reigner, Karen Blesch, Erhard Weidekamm: Clinical Pharmacokinetics of Capecitabine, Journal: Clinical Pharmacokinetics, Volume 40, Issue 2, Springer International Publishing, p.92
- [18] http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HLJS200801001.htm, letzter Zugriff am 19.2.2014
- [19] Bruce A. Chabner, Dan L. Longo: Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice, 5.Auflage, 2010, Lippincott Williams & Wilki, p.369
- [20] George C. Prendergast, Elizabeth M. Jaffee: Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth, 2.Auflage, 2013, Herausgeber: Academic Press, p.122
- [21] Sherwood L. Gorbach, John G. Bartlett, Neil R. Blacklow: Infectious Diseases, 3. Auflage, 2004, p.242
- [22] http://is3.myvideo.de/de/movie7/ac/thumbs/6063875_1.jpg, letzter Zugriff am 27.3.14

IV. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Vorname:	Petra
Zuname:	Mayer
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Ausbildung

Seit Oktober 2008:	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
Sept. 2000- Juni 2008:	Bundesrealgymnasium Neusiedl am See
Sept. 1996- Juni 2000:	Volksschule

Spezielle Kenntnisse

Sprachkenntnisse:	Deutsch (Muttersprache), Englisch, Französisch, Latein
EDV- Kenntnisse:	MS Office