



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Protein- und Gewebsbindung von neuen Anthrachinonen“

verfasst von / submitted by

Julia Wilthaner

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank richtet sich an Univ.Prof. Mag. Dr. Martin Czejka für die Vergabe eines interessanten Themas und die hervorragende fachliche und auch persönliche Betreuung.

Ebenfalls möchte ich mich bei Mag.pharm. Marie Kitzmüller und Mag. pharm. Nairi Baroian bedanken, die mir mit viel Engagement und Geduld zur Seite standen und mich stets fachlich und organisatorisch unterstützt haben.

Es war eine sehr schöne und interessante Zeit mit euch, danke für das tolle Arbeitsklima!

Ebenso möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während des gesamten Studiums unterstützt und mich auch in schwierigen Phasen des Studiums ermutigt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Es wurden nur die angegebenen Quellen benutzt und alle daraus direkt oder indirekt übernommenen Gedanken als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher in dieser oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Wien, Jänner 2017

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Eidesstattliche Erklärung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII

1.) Einleitung	1
1.1 Präklinische Pharmakokinetik	1
1.1.1 Hintergrund	1
1.1.2 Physikochemische Substanzparameter	1
1.2 Bindung an Biopolymere	3
1.2.1 Plasmaproteinbindung	3
1.2.2 Gewebsproteinbindung	3
1.2.2.1 Mikrosomale Bindung	3
1.2.2.2 Intestinale Absorption	4
1.2.2.3 Blut-Hirn-Schranke	5
1.3 Anthrachinone	6
2.) Rationale	8
3.) Experimenteller Teil	9
3.1 Materialien	9
3.1.1 Untersuchte Substanzen	9
3.1.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien	9
3.1.3 Transil-Kit Testsysteme	9
3.2 Geräte	11
3.2.1 Allgemeine Laborgeräte	11
3.2.2 HPLC Anlage	12
3.3 Methodik	13
3.3.1 Analysevorbereitung	13
3.3.1.1 Vorbereitung der Transil-Kits	13
3.3.1.2 Herstellung der Pufferlösung	13
3.3.1.3 Herstellung der Stammlösungen	13
3.3.1.4 Vermessung der Stammlösungen am UV/VIS Spektrometer	16
3.3.1.5 Herstellung der Eluenten	17
3.3.1.6 Ermittlung der spezifischen Retentionszeit auf der HPLC Anlage	17
3.3.2 Probendurchführung	17
3.3.2.1 Substanzanalyse mit den Transil-Testkits	17
3.3.2.2 HPLC Analyse	19
4.) Auswertung der Analyseresultate	20

4.1	Verwendete Software.....	20
4.1.1	Software Chromaster System Manager	20
4.1.2	Software GraphPad Prism.....	20
4.1.3	Software Transil ^{XL}	20
4.1.3.1	Allgemeine Parameter.....	23
4.1.3.2	Parameter der Plasmaproteinbindung.....	25
4.1.3.3	Parameter der Gewebsbindung.....	26
4.1.3.3.1	Spezifische Parameter der Mikrosomalen Bindung.....	26
4.1.3.3.2	Spezifische Parameter der Intestinalen Absorption.....	27
4.1.3.3.3	Spezifische Parameter der Gehirn Absorption.....	27
4.1.4	Weitere verwendete Software.....	28
5.)	Ergebnisse.....	29
5.1	Charakteristika der getesteten Anthrachinonderivate.....	29
5.2	UV-Vis Messergebnisse.....	30
5.3	Ergebnisse der HPLC Analyse.....	31
5.4	Chromatogramme.....	32
5.4.1	Chromatogramme AGP Bindung von AC 3.....	33
5.4.2	Chromatogramme HSA Bindung von AC 3.....	35
5.4.3	Chromatogramme PPB von AC 3.....	37
5.4.4	Chromatogramme Mikrosomale Bindung von AC 3.....	39
5.4.5	Chromatogramme Intestinale Bindung von AC 3.....	41
5.4.6	Chromatogramme Brain Absorption von AC 3.....	43
5.5	Raw data Tabellen.....	45
5.5.1	AGP- Bindung: raw data Tabelle.....	45
5.5.2	HSA- Bindung: raw data Tabelle.....	46
5.5.3	Plasmaproteinbindung: raw data Tabelle.....	47
5.5.4	Mikrosomale Bindung: raw data Tabelle.....	48
5.5.5	Intestinale Absorption: raw data Tabelle.....	49
5.5.6	Gehirn Absorption: raw data Tabelle.....	50
5.6	Transil Analyse Ergebnisse: AGP Binding Kit.....	51
5.7	Transil Analyse Ergebnisse: HSA Binding Kit.....	53
5.8	Transil Analyse Ergebnisse: PPB Binding Kit.....	55
5.9	Transil Analyse Ergebnisse: Microsomal Binding Kit.....	57
5.10	Transil Analyse Ergebnisse: Intestinal Absorption Kit.....	59
5.11	Transil Analyse Ergebnisse: Brain Absorption Kit.....	61
5	Zusammenfassung.....	63
6	Summary.....	66
7	Conclusio.....	67
8	Abbildungsverzeichnis.....	69
9	Literaturverzeichnis.....	71
10	Tabellenverzeichnis.....	73

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion
AGP	α 1-azides Glykoprotein
AUFS	area under full scale
BBB	Blood Brain Barrier, Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
Cl int	intrinsische Clearance
CYP	Cytochrome-P450-Monooxygenasen
DMSO	Dimethylsulfoxid
EW	Einwaage
fb	fraction bound, gebundener Anteil
fu	fraction unbound, freier Anteil
H ₂ O	Aqua bidestillata
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serum Albumin
KD	Affinitätskonstante, Dissoziationskonstante
M	Molar, mol/l
MA	Membranaffinität
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht [g/mol]
mg	Milligramm
min	Minuten
MW	Molecular weight, Molekulargewicht
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pint	Permeabilitätskoeffizient
PPB	Plasmaproteinbindung
PSA	polar surface area, polare Moleküloberfläche
Ref	Referenz
rpm	Revolutions per minute
sek	Sekunde
TQI	Transil Quality Index
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vd	Volume of distribution, scheinbares Verteilungsvolumen

1) Einleitung

1.1 Präklinische Pharmakokinetik

1.1.1 Hintergrund

In der Wirkstoffentwicklung, die einen sehr komplexen und kostenintensiven Aufgabenbereich der Pharmaindustrie darstellt, kommt der präklinischen Phase besondere Bedeutung zu. In diesem Zeitraum entscheidet sich, welche Wirkstoffkandidaten die nötigen Eigenschaften und ausreichend Potential haben, um in der klinischen Phase an Menschen getestet zu werden.

So sollen zum einen mögliche neue Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Unbedenklichkeit und ihres Sicherheitsprofils analysiert werden, zum anderen auch Daten geliefert werden, die zur Entwicklung einer geeigneten Therapie und Galenik beitragen. [1]

Hierzu ist die Testung von neuen Strukturen im Tierversuch unverzichtbar, da die Ergebnisse von toxikologischen Prüfungen in Zellkulturen nur in geringem Ausmaß auf den humanen Organismus übertragbar sind.

Dank gentechnologischer Forschung und Weiterentwicklung von In-Vitro Testmethoden konnte die Anzahl der nötigen Tierversuche, die strengen gesetzlichen Reglements unterliegen, stark reduziert werden. [2]

Das Ziel präklinischer, pharmakologischer Untersuchungen ist es, verlässliche Angaben über potentielle Wirkstoffe machen zu können, um eine frühzeitige sinnvolle Auswahl jener Wirkstoffkandidaten für die Weiterentwicklung treffen zu können, deren Erfolgsaussichten am größten sind. [3]

1.1.2 Physikochemische Parameter

In der Präklinischen Pharmakokinetik wird die biologische Aktivität von Wirkstoffmolekülen analysiert. Dazu untersucht man zunächst strukturell bedingte Eigenschaften des Wirkstoffkandidaten, da diese maßgeblich die Wechselwirkungen mit Biopolymeren, wie Lipidmembranen, aber auch die Resorption und Distribution sowie Metabolisierung und Exkretion des Arzneistoffes beeinflussen.

Neben der Konformation und der Konstitution eines Moleküls, sind elektronische Eigenschaften, wie Ionisation, und Lipophilie bzw. Hydrophilie bestimmende Attribute. Nur lipophile, nicht ionisierte Substanzen können durch Biomembranen diffundieren und folglich resorbiert und im Körper verteilt werden. [4]

Der pKa Wert:

Der pKa Wert drückt das Verhältnis von ionisiertem zu nicht-ionisiertem Wirkstoff aus und wird mit der Henderson Hasselbalch Gleichung beschrieben.

$$\text{pH} = \text{pK}_s - \lg \frac{[\text{konjugierte Base}]}{[\text{Säure}]}$$

Abb.1: Henderson Hasselbalch Gleichung [J.Wilthaner, 2017]

Vor allem die biologische Aktivität schwach saurer oder basischer Arzneistoffe wird durch den pKa Wert beeinflusst, da sich ihr Ionisationsgrad durch den pH Wert ihrer Umgebung verändert.

Generell zeigt sich, dass die Lipophilie eines Moleküls mit steigendem Ionisationsgrad sinkt. Während protonierte Basen in ihrer ionisierten Form aktiv sind, wirken antibakterielle Säuren wie die Salicylsäure in saurem Milieu, da sie dort nicht-ionisiert vorliegen.

Manche Substanzen wie Sulfonamide zeigen nur einem bestimmten pKa Bereich Aktivität.

Log P Wert:

Der wahre Verteilungskoeffizient P (engl. *partition coefficient*). bzw sein dekadischer Logarithmus log P beschreibt die Verteilung einer Substanz zwischen einer Wasserphase und einer Lipidphase und ist damit ein beschreibender Wert der Lipophilie bzw Hydrophilie der Substanz.

$$P = \frac{C (\text{Lipid})}{C (\text{Wasser})}$$

Abb. 2: Formel für den Verteilungskoeffizient P [J.Wilthaner, 2017]

Aufgrund seines P-Wertes kann man Rückschlüsse auf die Verteilung eines Wirkstoffes zwischen Biomembranen (lipophil) und dem hydrophilen Zytosol ziehen.

Hydrophobe Substanzen weisen hohe P- Werte und damit positive logP-Werte auf, wohingegen hydrophile Substanzen niedrige P-Werte und damit negative log P-Werte haben. [5]

Log D- Wert

Wenn durch Dissoziation oder Assoziation mehrere Spezies eines Moleküls vorliegen berechnet man aus den einzelnen wahren Verteilungskoeffizienten den scheinbaren Verteilungskoeffizient D bzw den log D Wert, der pH Wert abhängig ist. [6]

1.2 Bindung an Biopolymere:

Resorbierte Wirkstoffe gelangen in den Blutkreislauf und werden in der Folge im Organismus verteilt. Im Zuge der Distribution kommt es einerseits zu unspezifischen, reversiblen Proteinbindung an Plasma- oder Gewebeproteine und andererseits zu spezifischen Bindung an Rezeptoren und anderen Zielstrukturen wie Enzymen. [4]

1.2.1 Plasmaproteinbindung

Die häufigsten und bedeutendsten Plasmaproteine sind HSA (humanes Serum-Albumin) und AGP (α 1-azides Glykoprotein), da an ihre unterschiedlichen Bindungsstellen, diverse, auch strukturell unterschiedliche Wirkstoffe binden können.

Vor allem lipophile Arzneistoffe binden häufig an Plasmaproteine, wobei HSA eine hohe Affinität vor allem für saure Pharmaka und AGP eine hohe Affinität für basische Strukturen besitzt.

Bei Applikation von therapeutischen Dosen wird nur ein kleiner Anteil der Bindungsstellen durch Wirkstoffmoleküle besetzt, weshalb der ungebundene, wirksame Anteil proportional zur gesamten Wirkstoffkonzentration ist. Sobald die Bindungskapazität überschritten wird kommt es jedoch zum überproportionalen Anstieg der freien Wirkstoffkonzentration. [7]

Nur der ungebundene, frei vorliegende Anteil einer Substanz kann wirken, wohingegen gebundene Moleküle pharmakologisch inaktiv sind und weder an ihren Wirkort gelangen, noch metabolisiert oder eliminiert werden können. Daraus resultiert, dass die starke Bindung an Plasmaproteine zwar einerseits die Wirkstärke abschwächt, allerdings die Wirkdauer aufgrund verminderter Elimination verlängert. [8]

1.2.2 Gewebsproteinbindung

Neben der Plasmaproteinbindung kommt es bei der Distribution eines Wirkstoffes im Körper auch zur Bindung an Gewebeproteine, vor allem an Muskelproteine, aber auch membranäre Phospholipide sowie an das Leberenzym Glutathiontransferase.

Wie bei der Bindung an Plasmaproteine kommt es bei der Gewebsproteinbindung zu einem depotartigen Wirkeffekt durch die Eliminationsverzögerung des gebundenen Wirkstoffanteils. [9]

1.2.2.1 Microsomale Bindung

Mit dem Transilkit „Microsomal Binding“ wird die Affinität von Wirkstoffen zu mikrosomalen Membranen getestet, die sich im Verteilungskoeffizient zwischen der Puffer- und der Lipidphase äußert.

Durch Bestimmung der Membrankonzentration kann der freie Wirkstoffanteil in der Leber berechnet werden.

In der präklinischen Analyse eines Wirkstoffes ist die Abschätzung der Halbwertszeit ein wichtiger Faktor bei der Ermittlung der idealen Dosierung. Sie kann durch Abschätzung von Verteilungsvolumen und Clearance vorhergesagt werden, wobei die mikrosomale Bindung berücksichtigt werden muss, um von der experimentell bestimmten auf die tatsächliche Clearance schließen zu können. [10]

Lipophile neutrale und basische Wirkstoffe werden stark an mikrosomale Membranen gebunden, weshalb es durch die geringere freie Wirkstoffmenge zu einer Unterschätzung der inhibitorischen Wirkung auf das hepatische Cytochrom P 450 Enzymsystem kommen kann. Die Hauptaufgabe dieses Enzymkomplexes, über den viele Pharmaka metabolisiert werden, ist es, die Elimination von Substanzen durch Erhöhung der Hydrophilie zu verstärken. Außerdem kann es durch Metabolisierung zur erwünschten Aktivierung von Prodrugs kommen.

Folglich können Fehleinschätzungen in der Hemmfähigkeit eines Arzneistoffes zu diversen Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln führen. [11]

1.2.2.2 Intestinale Absorption

Mit der Transil-Analyse, bei der Phosphatidylcholin Membranvesikel an Silica-Kügelchen immobilisiert vorliegen, kann der Permeabilitätskoeffizient einer Substanz bestimmt und die Gewebebindung vorhergesagt werden.

Die intestinale Absorption von peroralen Arzneiformen hängt neben der Arzneiform und den physikochemischen Parametern des Wirkstoffes auch von der physiologischen Beschaffenheit des Gastrointestinaltraktes, vor allem von jener des Darms ab, da hier ein Gros der Wirkstoffmenge resorbiert wird.

Lipophile und nicht ionisierte Substanzen werden stärker im Gastrointestinaltrakt resorbiert, wohingegen saure und basische Substanzen, die stark dissoziiert vorliegen, kaum resorbiert werden.

Das scheinbare Verteilungsvolumen V_D ist indirekt proportional zum Ausmaß der Plasmaproteinbindung und direkt proportional zum Ausmaß der mikrosomalen Bindung. Ein hoher Wert des Permeabilitätskoeffizienten bedeutet, dass eine größere Menge an Wirkstoff absorbiert wird. Bei Wirkstoffen mit großen V_D Werten, ist eine höhere Wirkstoffdosis erforderlich, um wirkungsrelevante Wirkstoffkonzentrationen am Zielort zu erreichen.

Durch die Kombination der Analyseergebnisse aus Mikrosomaler und Plasmaprotein Bindung kann man das scheinbare Verteilungsvolumen berechnen. [12]

1.2.2.3 Blut-Hirn-Schranke:

Die Blut Hirn Schranke ist aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten aufgebaut und bildet eine effektive Barriere zum Schutz des Gehirns.

Es gibt einige Transportmechanismen ins Gehirn, die aber vor allem nur für kleine Moleküle ausgelegt sind. So können sehr kleine hydrophile Moleküle wie Harnstoff die tight junctions direkt passieren, Gase und kleine lipophile Stoffe passiv diffundieren, Kationen mittels Endozytose und Nucleoside Carrier-vermittelt penetrieren.

Vorhandene Effluxpumpen verursachen, dass viele organische Moleküle nach beginnender Absorption wieder aus der Endothelschicht ins Blut zurück gepumpt werden.

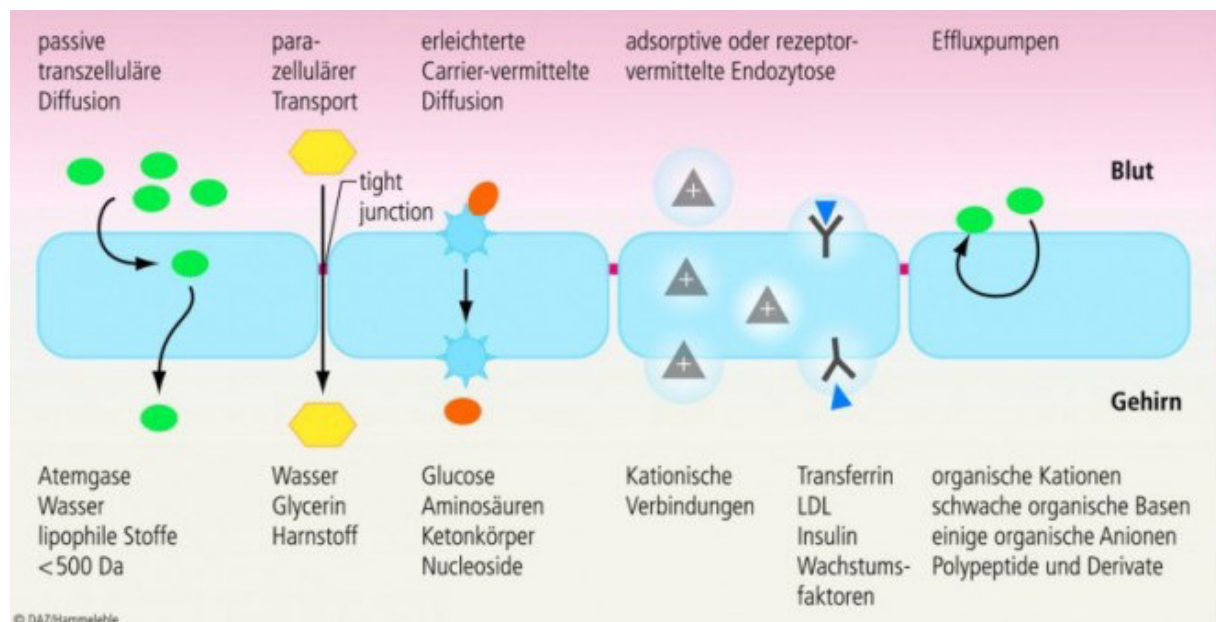


Abb.3: Transportprozesse Blut-Hirn Schranke [DAZ, 2012]

Es gilt als eine der größten Herausforderungen neue, zentral wirksame Arzneimittel zu entwickeln, die die Blut-Hirn-Schranke durchdringen können und im Gehirn frei verfügbar sind, um mit Rezeptoren in der Interstitiellen Flüssigkeit im Gehirn, zu interagieren [13]

Doch bereits die Passage der Blut-Hirn-Schranke ist eine Herausforderung, die nur etwa 2% der neuen Wirkstoffkandidaten effektiv gelingt. [14]

Gleichzeitig soll die Bindung an Gehirngewebe nicht allzu stark sein, da nur der freie Wirkstoffanteil mit Zielrezeptoren interagieren und folglich wirken kann.

Es hat sich jedoch gezeigt, dass gerade lipophile Stoffe, denen es möglich ist, die Blut- Hirn-Schranke zu überwinden, besonders hohe Bindungsraten an Gehirngewebe aufweisen, da die trockene Gehirnmasse ebenfalls von Lipiden dominiert wird. [15,16]

Um das Ausmaß der Absorption abschätzen zu können, bestimmt man die sogenannte „B/P Ratio“, den Verteilungskoeffizient zwischen Gehirn und Plasma bzw den Logarithmus „log BB“.

Problematisch ist, dass dieser Koeffizient sogar bei effektiven zentral wirksamen Substanzen stark variiert und Rückschlüsse auf die freie Wirkstoffkonzentration nur bedingt möglich sind. Aus diesen Gründen bleiben Abschätzungen basierend auf Permeationsraten oft hinter den Erwartungen zurück. [15, 17]

Um verlässlichere Vorhersagen treffen zu können kombiniert man die Ergebnisse mit Daten zur Gewebsbindung im Gehirn, da diese mehr Einfluss auf die freie Wirkstoffkonzentration im Gehirn hat und weniger auf die Gesamtkonzentration im Gehirn [18]

Durch Miteinbeziehen von weiteren Parametern können Vorhersagen zur freien Verfügbarkeit im Gehirn, sowie Effektivität einer Substanz getroffen werden.

1.4 Anthrachinone:

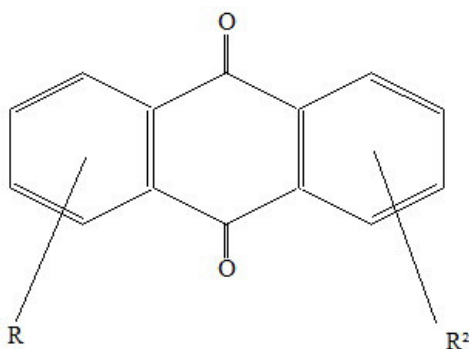


Abb. 4: Allgemeine Struktur der neuen Anthrachinone [J.Wilthaner, 2017]

Die neuen Anthrachinone AC 1, AC 2, AC 3, AC 4 und AC 5 wurden im Zuge dieser Diplomarbeit untersucht. Die Synthese erfolgte seitens des Unternehmen SeaLife Pharma GmbH, die diese Substanzen zur Verfügung gestellt hat und den patentrechtlichen Schutz besitzt.

Anthrachinone sind Naturstoffe, die als Sekundärmetaboliten in Pflanzen synthetisiert werden und dann zumeist als C-Glykosyle oder O-Glykoside vorliegen.

Sie können als Farbstoffe eingelagert vorliegen, oder wirken als Repellent und bieten der Pflanze dadurch Schutz vor Fraßfeinden.

Die medizinische Nutzung erfolgt vor allem im Bereich der Abführmittel, da Anthrachinone die Motilität im Darm fördern und das Volumen im Darm durch antiresorptive sowie sekretagoge Effekte erhöhen.

Der antiresorptive Effekt beruht auf der Blockade der Na^+/K^+ -ATPase in der Darmwand und der daraus folgend geringeren Resorption von Natrium und Wasser.

Der sekretagoge Effekt ergibt sich durch die Erhöhung von cAMP in den Enterozyten und der resultierenden Förderung des Elektrolyteinstroms von Chlorid und Wasser in den Darm.

An Zucker gebundene Anthrachinone liegen zum Beispiel in der seit dem Mittelalter verwendeten Faulbaumrinde vor.

Eine Besonderheit der Faulbaumrinde liegt darin, dass sie vor Anwendung mindestens ein Jahr gelagert werden muss, damit die genuin enthaltenen Anthron- und Dianthronglykoside, die schlecht verträglich sind, zu den verträglicheren Anthrachinonglykosiden oxidiert werden.

[19]

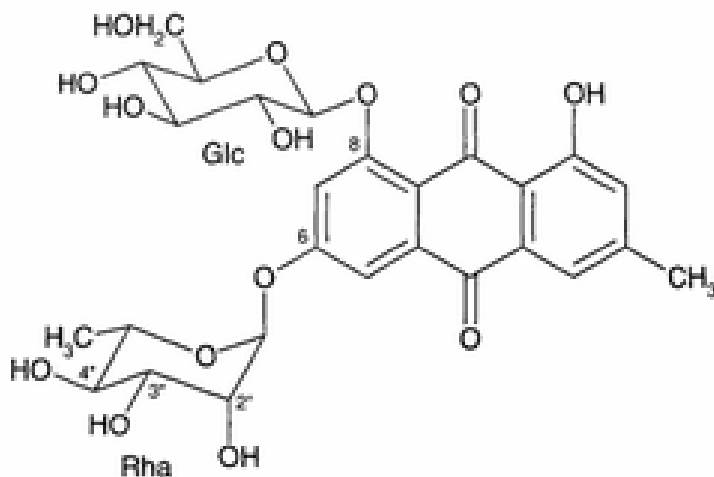


Abb. 5: Glucofrangulin A (Pharmakognosie-Phytopharmazie: Hänsel, R., Springer-Verlag 1999)

2.) Rationale

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, möglichst umfassende und aussagekräftige Daten zur präklinischen Pharmakokinetik noch nicht untersuchter Wirkstoffkandidaten durch entsprechende Untersuchungen zu erlangen.

Auf der Grundlage von Versuchen mit Transil^{XL}- Testkits der Firma Sovicell werden unterschiedliche Parameter ermittelt, die Vorhersagen zur Pharmakokinetik ermöglichen sollen, um eine Auswahl der aussichtsreichsten Wirkstoffkandidaten für die Weiterentwicklung treffen zu können.

Die Ergebnisse der HPLC Analysen wurden mit einer auf die verwendeten Test-Kits abgestimmten Software ausgewertet.

3.) Experimenteller Teil

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien entsprechen in Ihrer Reinheit und sind für die HPLC- Analyse dezitiert geeignet.

Bezeichnung	Hersteller
Acetonitril	Merck KGaA
Aqua bidestillata	Department für Pharmakognosie Universität Wien
Dimethylsulfoxid 100%	Sigma- Aldrich
Dulbecco's PBS	Sigma- Aldrich
Essigsäure 99%	Sigma- Aldrich
Kaliumhydrogenphosphat 99%	Sigma- Aldrich
Methanol 70%	Merck KGaA
Phosphorsäure 8,5%	Sigma- Aldrich

Tab 1.: Verwendete Chemikalien bzw Reagenzien und Hersteller

3.1.2 Transil^{XL} Kit- Testsysteme

Die Transil-Testkits werden von dem deutschen Unternehmen Sovicell GmbH entwickelt, hergestellt und vermarktet.

Es gibt verschiedene Kits zur Bestimmung von Affinitäten und Penetrationsvermögen von Substanzen, die Vorhersagen zur Verteilung von Substanzen im menschlichen Körper ermöglichen.

Jede Testplatte besteht aus 96 Reaktionsgefäßen, die in 12 Reihen angeordnet sind.

In den Gefäßen, außer in jenen für die Referenzwerte, befinden sich Silica-Kügelchen suspendiert in Phosphatpuffer. Auf diese Silica-Kügelchen sind Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen aufgebracht und damit immobilisiert.

Je nach Testkit variiert diese Proteinschicht, da sie jeweils entsprechend dem Testsystem zusammengesetzt ist.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden folgende Analysesysteme verwendet:

- Brain Absorption Kit: Zur Ermittlung der Penetration der Blut-Hirn-Schranke
- Human Serum Albumin-Binding-Kit: Zur Ermittlung der Bindung an HSA
- Alpha 1-acid-glycoprotein-Binding-Kit: Zur Ermittlung der der Bindung an AGP
- Plasma proteins-Binding Kit: Zur Ermittlung der Bindung an HSA und AGP
- Microsomal-Binding Kit: Zur Ermittlung der Bindung an Lebermikrosomen
- Intestinal-Absorption Kit: Zur Ermittlung der Penetration von Darmepithelzellen

Mit einer Testplatte sind jeweils 12 Analysen möglich, da man pro Analyse eine Reihe der Testplatte benötigt, die aus 8 Gefäßen besteht.

Für statistisch valide Werte muss die Analyse nur einmal durchgeführt werden. [20]

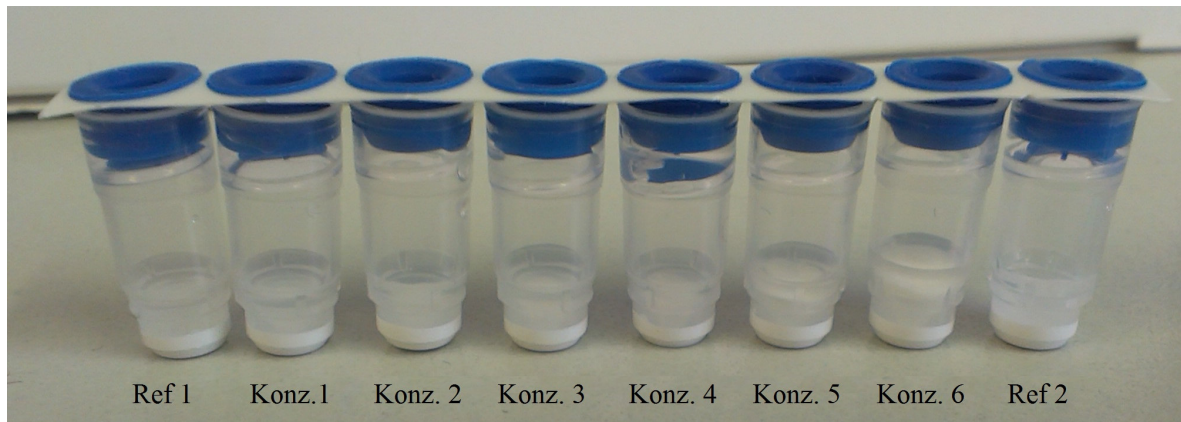


Abb. 6: Reaktionsgefäße (Wells) einer Transil-Testkit Reihe [Foto: J.Wilthaner]

In dem ersten und dem letzten Gefäß befindet sich nur Phosphatpuffer. Die Analyse dieser Referenz-Wells dient der Ermittlung der unspezifischen Bindung der Testsubstanz.

In Gefäß zwei bis sechs sind Proteine in steigender Konzentration enthalten, die auf die Oberfläche von Silica-Kügelchen aufgebracht sind.

Zu den Testplatten erhält man einen Decapper, der es ermöglicht, die mit einem Band verbundenen Deckel der Einzelgefäße einer Reihe zeitgleich zu öffnen.

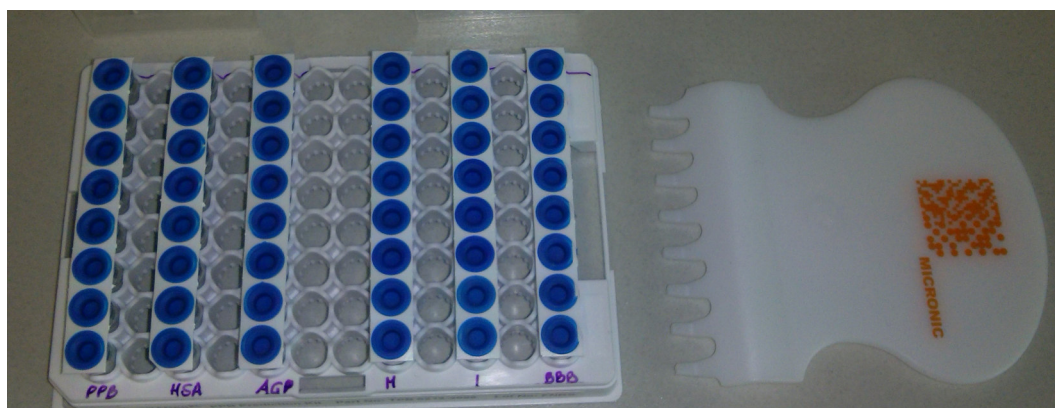


Abb. 7: Transil^{XL}-Testkit Reihen mit Decapper [Foto: J.Wilthaner]

Zu den Testkits erhält man User Guides- Mappen mit einer CD, die Informationen zur den einzelnen Testsystemen und zur Handhabung beinhalten, auch eine speziell entwickelte Software, die komplexe Berechnungen und Auswertungen ermöglicht.

3.2 Geräte

3.2.1 Allgemeine Laborgeräte

Hersteller	Gerät
Assistent	Reagenzgläser: 160 x 16 mm
Assistent	Glas Pasteur- Pipetten: 150 mm
Bandelin electronic GmbH	Ultraschallbad: Bandelin Sonorek RK-150
Biolab	HPLC Vials 2ml (Braunglas)
Biolab	Mikro-Einsätze für HPLC Vials
Chromacrol	Vial- Septen
Chromacrol	Vial-Verschlüsse
Eppendorf	Mikro-Pipetten Research plus: 2- 20 µl; 100– 1000 µl
Eppendorf	Plate Shaker: Mix Mate PCB-11
Heidolph Instruments GmbH	Magnetrührer: MR-3001K
Heraeus Instruments GmbH	Zentrifuge: Labofuge 400
Sartorius Mechatronics Austria GmbH	Analysen- Waage: Sartorius H 110
Sartorius Mechatronics Austria GmbH	Waage: Sartorius M-prove AY612
Shimadzu	UV- Spektrometer 1800
Velp Scientifica	Vortex Mini- Shaker
VWR	Pipettenspitzen: 50–1000 µl (blau); 2–200 µl (gelb)
VWR	Galaxy 16 DH Zentrifuge
VWR	HPLC Anlage Hitachi Chromaster

Tab. 2: Allgemeine Laborgeräte geordnet nach dem jeweiligen Hersteller



Abb. 8: Analysenwaage: Sartorius H110
[Foto: J.Wilthaner]



Abb.9: Galaxy 16 DH Zentrifuge [Foto: J.Wilthaner]



Abb. 10: Plattenschüttler: MixMate [Foto: J.Wilthner]



Abb. 11: Vortex Mini-Shaker [Foto: J.Wilthner]

3.2.2 HPLC Anlage

HPLC Anlage: VWR- HITACHI -Chromaster:

Pumpe: Hitachi Chromaster Modell 5110

Auto Sampler: Hitachi Chromaster Modell 5210

Säulenofen: Hitachi Chromaster Modell 5310

UV-Detektor: Hitachi Chromaster Modell 5410

FL-Detektor: Hitachi Chromaster Modell 5440

Organizer

System Manager – Software (verbunden mit Hewlett-Packard Compaq 6200)

Tab. 3: Technische Daten der VWR Hitachi Chromaster HPLC Anlage

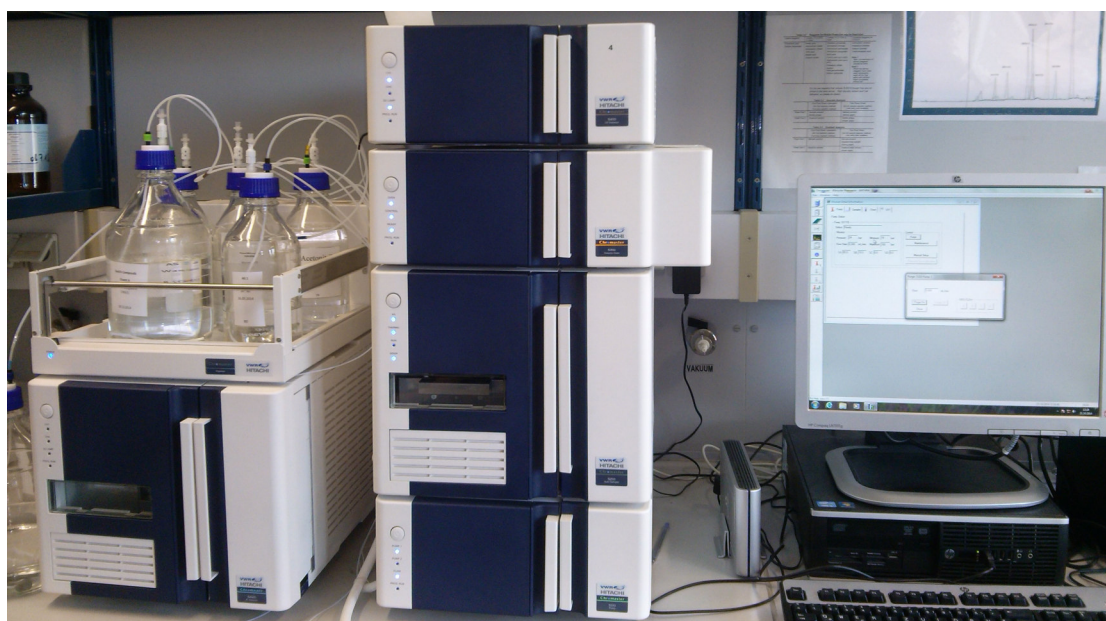


Abb. 12: VWR Hitachi Chromaster HPLC Anlage [Foto: J.Wilthner]

3.3 Methodik

3.3.1 Analysevorbereitung

3.3.1.1 Vorbereitung der Transil-Kits

Gemäß der Herstellervorschriften werden die Transil Testplatten bei -20° Celsius gelagert. Vor der Probendurchführung entnimmt man die gewünschte Menge an Testkit Reihen und taut sie bei Raumtemperatur für 3 Stunden oder über Nacht im Kühlschrank auf.

Für die Durchführung der Analyse müssen die Gefäße bzw die enthaltene Suspensionen Raumtemperatur erreicht haben.

3.3.1.2 Herstellung der Pufferlösung

Man löst eine Tablette Dulbecco's PBS in 0,200 Liter Aqua bidestillata und homogenisiert die Lösung 5 Minuten am Magnetrührer.

3.3.1.3 Herstellung der Stammlösungen

Der Hersteller Sovicell empfiehlt für die Analyse eine Maximalkonzentration der Probesubstanz von 5µM in einer 2% -igen DMSO- Lösung um eine möglichst genaue Abschätzung der Affinitäten treffen zu können. [20]

Entsprechend der bereits in den Wells vorgelegten Menge an Pufferlösung muss also eine 80µM Stammlösung in 32% Dimethylsulfoxid bereitet werden.

Sowohl bei Vorbereitung als auch bei der Durchführung der Analysen ist bei allen Transil-Testkits in gleicher Art und Weise zu verfahren. Unterschiede ergeben sich freilich in der Auswertung, da jeweils unterschiedliche Parameter bestimmt werden.

Zur Validierung der Methode wurde Linezolid in gleicher Art und Weise mit den Transil-Testkits analysiert und die Werte mit Werten aus der Literatur verglichen.

Berechnungen zur Bereitung von 50 ml einer 80 µM Stammlösung von Linezolid

Linezolid: MG= 337,346 g/mol

Einwaage für 80µM Stammlösung: $337,346 \text{ g/mol} \times 80 \text{ µmol/l}$
= 26987,68 µg/l → 27,0 mg/l
= 2,70 mg/ 100ml
→ 1,35 mg/ 50ml

32%ige DMSO Lösung:

$$50 \text{ ml} \times 0,32 = 16 \text{ ml DMSO} \\ + 34 \text{ ml PBS (Puffer)}$$

Die berechnete Substanzmenge wurde jeweils in einer Eprovette eingewogen, mit 2 ml DMSO 100 % versetzt, am Vortexer für 10 Sekunden geschüttelt und dann in einen 50 ml Messkolben eingebracht. Danach wurde die Eprovette zweimal mit je 2 ml DMSO 100 % gespült und die erhaltene Flüssigkeit ebenfalls in den Messkolben zugegeben.

Um eine 32 %ige DMSO in PBS Lösung zu erhalten wurden anschließend entsprechend 10ml DMSO 100 % sowie schrittweise 34 ml PBS (Pufferlösung) in den Messkolben hinzugefügt.

Die fertigen Stammlösungen wurden anschließend für jeweils 30 Minuten ins Ultraschallbad eingebracht, sodass eventuell noch nicht vollständig gelöste Substanzteilchen ebenfalls in Lösung gingen.

Bei zwei Probesubstanzen ergab sich während der schrittweise Zugabe der Pufferlösung ein Farbwechsel: Die anfangs gelb gefärbte Lösung verfärbte sich durch zunehmende Zugabe von PBS dunkler und es ergab sich eine Farbveränderung zu orange und zu rot. Durch weitere Zugabe der Pufferlösung färbte sich die Lösung danach wieder heller und erreichte mit Zugabe der letzten ml PBS wieder ihre ursprüngliche gelbe Farbe. (Abb. 11 und Abb.12)

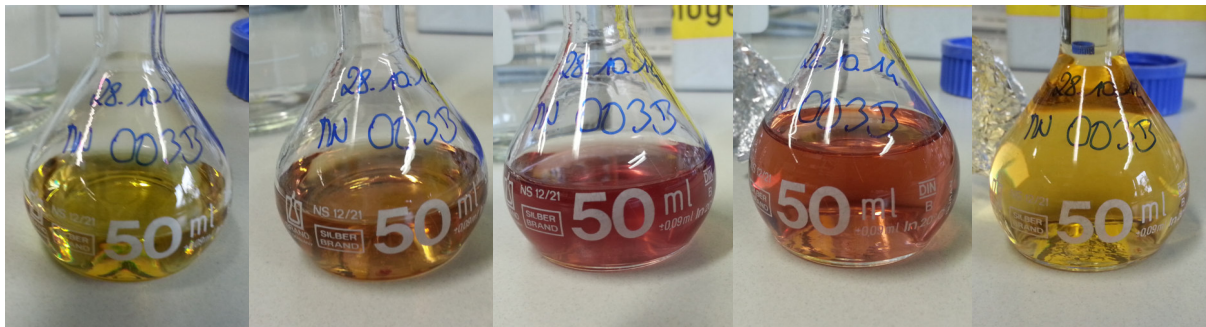


Abb 13: Farbwechsel bei Herstellung der Stammlösung AC 1 durch Zugabe v PBS [Foto: J.Wilthaner]

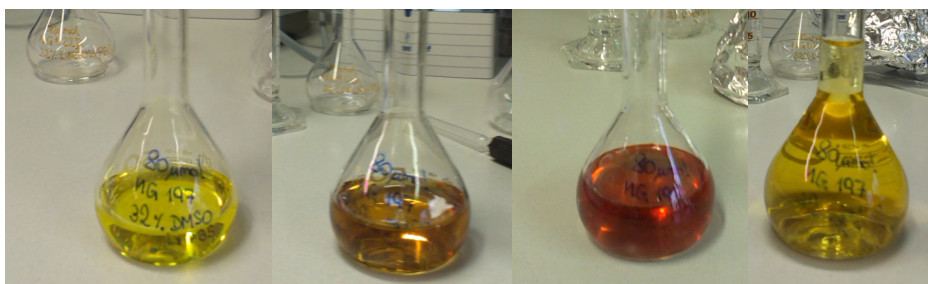


Abb 14: Farbwechsel bei Herstellung der Stammlösung AC 4 durch Zugabe v PBS [Foto: J.Wilthaner]

Die getesteten Anthrachinone sind typischerweise gelb-orange gefärbt, da sie in ihrer molekularen Struktur konjugierte Doppelbindungen und aromatische Systeme aufweisen. Sie sind sogenannte Chromophore, d.h. sie enthalten delokalisierbare Elektronen, die von höchsten besetzten Molekülorbitalen (HOMO) zu den niedrigsten unbesetzten Molekülorbitalen (LUMO) wandern können.

Dementsprechend waren auch die hergestellten Stammlösungen gefärbt und wurden aus Stabilitätsgründen unter Lichtschutz hergestellt, aufbewahrt und aufgearbeitet.

Lediglich für einzelne Aufnahmen wurde die Aluminiumfolienummantelung kurzzeitig entfernt.

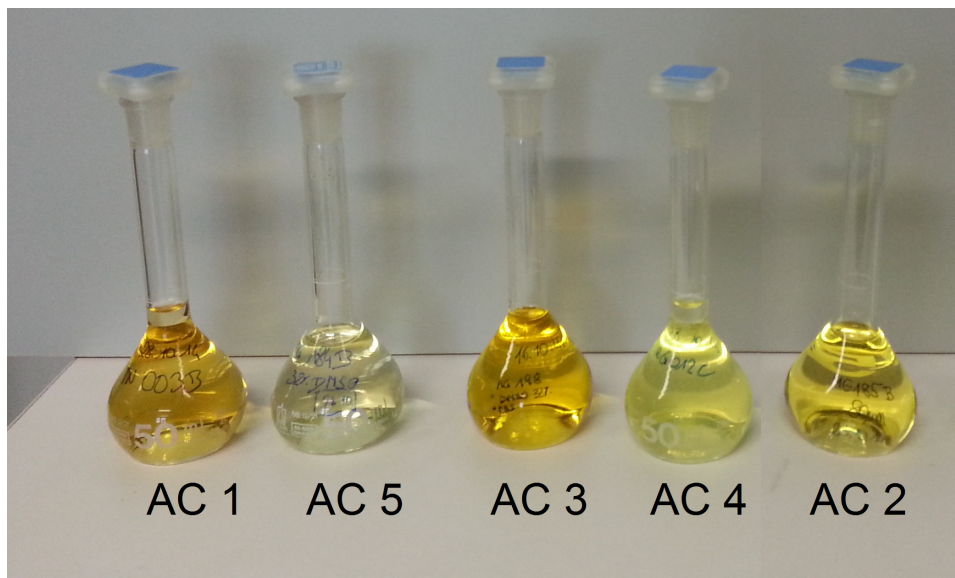


Abb. 15: Stammlösungen: frisch bereitete, gelb gefärbt [Foto: J. Wilthaner]

Um die Stabilität der Probelösungen zu testen wurde eine Stammlösung ohne Lichtschutz 12 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Der Unterschied der frisch bereiteten, gelben zur ungeschützt gelagerten entfärbten Stammlösung ist augenscheinlich (Abb.16)

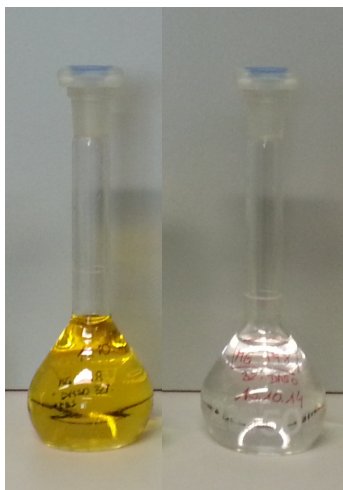


Abb. 16: Entfärbung der Stammlösung von AC 3 [Foto: J. Wilthaner]

3.3.1.4 Vermessung der Stammlösungen am UV /VIS Spektrometer

Man bereitet eine Lösung aus 320 µl DMSO und 680 µl Pufferlösung in einer Eprovette, homogenisiert diese Mischung am Vortexer und pipettiert sie in eine Küvette.

Diese Lösung entspricht dem Leerwert gegen den 1 ml der frisch hergestellten Stammlösung am UV-Vis Spektrometer vermessen wird.

Durch Auswählen des Messmodus „Absorption“, einem geeigneten Wellenlängenbereich in dem vermessen werden soll und weiteren Optionen erhält man ein Spektrogramm der getesteten Substanz in dem Absorptionsmaxima und –minima dargestellt werden.

Die Messung dient der Ermittlung der spezifischen Wellenlänge des Absorptionsmaximums, um die HPLC Analyse spezifisch auf die zu vermessende Substanz einzustellen.



Abb.17: UV Vis Spektrometer UV-1800 [Foto: J. Wilthaner]

3.3.1.5 Herstellung der Eluenten

Eluent A: H₂O/ Essigsäure 999/1 % v/v

999ml Aqua bidestillata und 1ml Essigsäure werden auf dem Magnetrührer vermengt und am Ultraschallbad entgast.

Eluent B: ACN/ Essigsäure 999/1 % v/v

999ml Aqua bidestillata und 1ml Essigsäure werden auf dem Magnetrührer vermengt und am Ultraschallbad entgast.

3.3.1.6 Ermittlung der spezifischen Retentionszeit auf der HPLC Anlage

Nach der Messung des Absorptionsmaximums bestimmt man die Stammlösung in geeigneter Verdünnung bei der ermittelten Wellenlänge auf der HPLC Anlage um die spezifische Retentionszeit der jeweiligen Substanz zu erhalten.

Dies ist von besonderer Bedeutung bei unbekannten und neuen Substanzen, aber auch für bekannte Substanzen ist eine derartige Testanalyse sinnvoll, da die Retentionszeit neben den Substanzparametern auch von der verwendeten Säule, den Eluenten und der HPLC-Anlage abhängig ist.

3.3.2 Probendurchführung

3.3.2.1 Substanzanalyse mit den Transil-Testkits

Sobald die Transil Kit-Testreihen auf Raumtemperatur erwärmt sind, werden die aufgetauten Reihen für 5 Sekunden bei 2100 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, damit sich die gesamte Flüssigkeit am Boden der Gefäße sammelt.



Abb.18: Kolbenhubpipette, Transil-Platte und Öffner [Foto: J. Wilthaner]

Mit Hilfe des Decappers öffnet man nun vorsichtig die Reaktionsgefäße einer Reihe und pipettiert mit einer Kolbenhubpipette 15 µl der zuvor am Vortexer geschüttelten Stammlösung in jedes Well. Um die vollständige Menge an Stammlösung einzubringen, spült man die Pipettenspitze vorsichtig mehrmals mit der in den Gefäßen befindlichen Lösung. Zur Vermeidung von Kontamination und Verschleppung von Substanzen muss während des Pipettier- und Spülvorganges darauf geachtet werden, dass die Silica-Kügelchen am Boden der Gefäße nicht berührt werden, die Pipettenspitze nach jedem Well verworfen werden muss und die Orientierung des Verschlussbandes beibehalten wird.

Zur Inkubation werden die verschlossenen Testkit Reihen für 12 Minuten mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 1000 rpm auf dem Mixmate® durchmischt.

Dieser Vorgang dient auch dazu, sicherzustellen, dass alle Kügelchen in der Lösung resuspendiert werden.

AGP Kits sind die einzigen Transil-Kits, für die eine andere Inkubation vorgesehen ist: Sie sollen nur 30 Sekunden am Plattenschüttler gemischt und danach für 2 Minuten vorsichtig händisch geschüttelt werden.



Abb. 19: Inkubation am Mix-Mate Plattenschüttler [Foto: J. Wilthner]

In dieser Phase erfolgt die Bindung der Testsubstanz an die Proteine an der Oberfläche der Silicakügelchen.

Anschließend zentrifugiert man die Transil-Platte mit einer Drehzahl von 2100 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten. Hierdurch beschleunigt man die Phasentrennung, die proteinbeschichteten Silicakügelchen und daran haftende Testsubstanz setzen sich am Gefäßboden ab und ein klarer Überstand mit dem freien Anteil an Testsubstanz setzt sich ab.

Für die HPLC Analyse nimmt man etwa 75 µl des klaren Überstandes mit einer Einwegpipette ab und pipettiert ihn in Mikroeinsätze für HPLC Fläschchen. Auch bei diesem Schritt erneuert man nach jedem Well die Pipette. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen oder Partikel in die Mikrovials eingebracht werden, da die HPLC Anlage sonst Schaden nehmen würde.

Die Vials werden beschriftet, mit Septum und Deckel verschlossen und zur Analyse in das HPLC Rack gestellt.



Abb 20.: HPLC Vials (Fläschchen) [Foto: J.Wilthaner]

In der Software kann man eine geeignete Methode, Injektionsvolumina, die Wellenlänge, bei der vermessen wird und weitere Parameter festlegen. Neben der Bezeichnung der Proben wird auch die Programmierung des Autosamplers, in welcher Reihenfolge welche Positionen am Rack in die Säule injiziert werden sollen, über den Computer eingegeben.

3.3.2.2 HPLC Analyse

Die Analyse der Testkits erfolgt mit der in Tab.3 beschriebenen HPLC Anlage „Hitachi Chromaster“.

Es wurde die Säule Zorbax Eclipse XDB-C8 der Firma Agilent, mit einer Partikelgröße von 5µm (Partnumber: 990967-906) verwendet. Das ist eine reversed-phase Säule, folglich werden hydrophile Substanzen schneller eluiert, lipophile Substanzen hingegen langsamer, da sie stärker mit den unpolaren Seitenketten der Beschichtung der Säule wechsel wirken. Die Testsubstanzen AC 1, AC 2 und AC 3 wurden isokratisch eluiert, während AC 4 und AC 5 mit einer Gradientenelution analysiert wurden.

Bei der isokratischen Elution ist die Zusammensetzung des Elutionsmittel gleich bleibend, es wurden Eluent A (H₂O : Essigsäure gemischt im Verhältnis 999:1) und Eluent B (ACN: Essigsäure gemischt im Verhältnis 999:1) im Verhältnis 40:60 verwendet.

Bei der Gradientenelution ändert sich im Zuge der Analyse die Zusammensetzung der mobilen Phase, die auch hier aus Eluent A und Eluent B bestanden hat, kontinuierlich.

4.) Auswertung der Analyseergebnisse

4.1 Verwendete Software

4.1.1 Software Chromaster System Manager

Die Software „Chromaster System Manager“, die eine Verbindung zwischen der HPLC Anlage und einem Computer herstellt, steuert nicht nur die HPLC Anlage, sondern stellt auch die einzelnen Messwerte der Analyse als Kurve dar, sodass man als Ergebnis der HPLC Analyse für jedes analysierte Vial ein Chromatogramm erhält.

Die Chromatogramme sind jedoch ein Abbild aller im Zuge einer Analyse detektierter Moleküle in Form von Peaks, weshalb durch Vergleich mit der „Voranalyse“ der Substanz (siehe Probenvorbereitung) jener Peak identifiziert werden muss, der das Signal der zu analysierenden Testsubstanz darstellt. Um die Fläche des Substanz-Peaks, die proportional zur Konzentration der Substanz ist, zu ermitteln integriert man die Kurve im entsprechenden Abschnitt.

4.1.2 Software GraphPad Prism

Die von der HPLC Software am Computer ermittelten Informationen der HPLC Analyse wurden in das Programm GraphPad Prism importiert und somit die Transil^{XL} Testkits unter Verwendung von GraphPad Prism Version 7.02 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com dargestellt und in dieses Dokument eingefügt.

4.1.3 Software Transil^{XL}

Die Transil-Software ist eine Tabellenkalkulationssoftware, wobei es für jedes Testsystem eine eigene Excel Arbeitsmappe, bestehend aus mehreren Arbeitsblättern, gibt.

Die einzelnen erforderlichen Eingabeschritte werden am Beispiel von Linezolid dargestellt. Für die Berechnungen ist es erforderlich, dass die grün hinterlegten Felder ausgefüllt werden, grau hinterlegte Felder können optional ausgefüllt werden.

<

Abb. 21: Screenshot der Hauptseite der Arbeitsmappe

Zunächst trägt man in den entsprechenden grün hinterlegten Feldern der Hauptseite, die mit dem Reiter „main“ bezeichnet ist, chargenspezifische Informationen zum Testkit, die Bezeichnung der getesteten Substanzen, die jeweiligen Probenvolumina und die Konzentration der verwendeten Stammlösungen.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Please enter the peak area or concentration data in column G below								
2									
3	Please leave missing data fields blank								
4									
5	test article			Well	Sample		Area / height	nm / amu	Note
6	Linezolid			A-1	Ref 1		9454,000	230	
7	Linezolid			B-1	Well 1		9032,000		
8	Linezolid			C-1	Well 2		8846,000		
9	Linezolid			D-1	Well 3		8564,000		
10	Linezolid			E-1	Well 4		8614,000		
11	Linezolid			F-1	Well 5		8697,000		
12	Linezolid			G-1	Well 6		8881,000		
13	Linezolid			H-1	Ref 2		8810,000		
14	cmp2			A-2	Ref 1				
15	cmp2			B-2	Well 1				
16	cmp2			C-2	Well 2				
17	cmp2			D-2	Well 3				
18	cmp2			E-2	Well 4				
19	cmp2			F-2	Well 5				
20	cmp2			G-2	Well 6				
21	cmp2			H-2	Ref 2				
22	cmp3			A-3	Ref 1				
23	cmp3			B-3	Well 1				
24	cmp3			C-3	Well 2				
25	cmp3			D-3	Well 3				
26	cmp3			E-3	Well 4				
27	cmp3			F-3	Well 5				
28	cmp3			G-3	Well 6				
29	cmp3			H-3	Ref 2				
30	cmp4			A-4	Ref 1				
31	cmp4			B-4	Well 1				
32	cmp4			C-4	Well 2				
33	cmp4			D-4	Well 3				
34	cmp4			E-4	Well 4				
35	cmp4			F-4	Well 5				
36	cmp4			G-4	Well 6				
37	cmp4			H-4	Ref 2				
38	cmp5			A-5	Ref 1				
39	cmp5			B-5	Well 1				
40	cmp5			C-5	Well 2				
41	cmp5			D-5	Well 3				
42	cmp5			E-5	Well 4				
43	cmp5			F-5	Well 5				
44	cmp5			G-5	Well 6				
45	cmp5			H-5	Ref 2				
46	cmp6			A-6	Ref 1				
47	cmp6			B-6	Well 1				
48	cmp6			C-6	Well 2				
49	cmp6			D-6	Well 3				
50	cmp6			E-6	Well 4				
51	cmp6			F-6	Well 5				

Abb. 22: Screenshot des „rawdata“- Arbeitsblattes

Danach werden die ermittelten Peakflächen im Arbeitsblatt „raw data“ entsprechend eingetragen.

Je nach Testkit errechnet die Software anschließend diverse Parameter.

4.1.3.1 Allgemeine Parameter [3,20]

Transil Quality Index TQI

Der Qualitätsindex der Auswertung einer Substanz wird aufgrund der Datenanalyse fünf unabhängiger Messungen ermittelt.

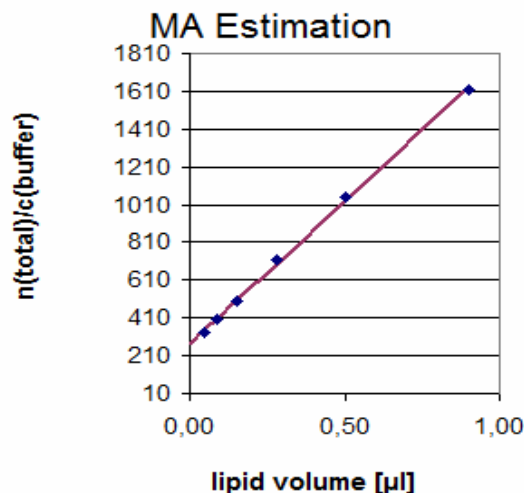
Jede Messung wird einzeln bewertet und trägt partiell zur Gesamtqualität bei, wobei die niedrigste Qualität durch 0 und die höchste Qualität durch den Wert 10 ausgedrückt wird.

In den Analyseergebnissen wird durch einen farbigen Punkt neben dem Wert dargestellt, in welchem Bereich sich der ermittelte TQI befindet. Rot steht für schlechte Qualität und einen TQI kleiner als fünf, gelb zeigt mittlere Qualität der Auswertung an und wird bei einem TQI zwischen fünf und sieben abgebildet und Grün zeigt an, dass die Analyse von hoher Güte und der TQI höher als sieben ist.

Bewertungsgrundlage für den TQI sind folgende Parameter:

- **Achsenabschnitt**

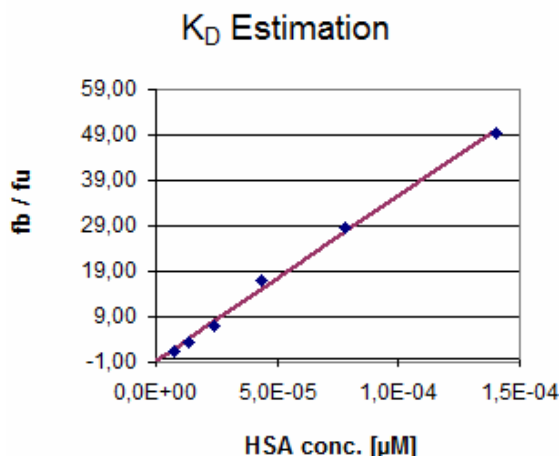
- Mikrosomale Bindung, Intestinale Absorption oder Gehirn-Absorption:



Im Idealfall entspricht im Diagramm „MA Estimation“ der Schnittpunkt der linearen Gerade mit der Ordinate dem verwendeten Puffervolumen im Versuch und sollte folglich bei einem Wert von 240 sein. Je nach dem in welchem Ausmaß dieser Wert abweicht sinkt der partielle Qualitätsindex.

Abb. 23: Diagramm MA-Estimation (Screenshot)

- Bindung an HSA, AGP oder an HSA und AGP (PPB-Kit):



Bei idealen Messergebnissen zeigt sich im Diagramm „KD Estimation“, dass der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse im Ursprung liegt, was einem Achsenabschnitt von Null entspricht. Je weiter die Werte abweichen desto niedriger wird die Qualität der Analyse bewertet.

Abb. 24: Diagramm KD-Estimation (Screenshot)

- **Vergleich der ermittelten zu den extrapolierten Werten für die Referenzmessungen**

Durch lineare Regression kann man aus den Analyseergebnissen der Überstände der Reaktionsgefäße 2-7 die voraussichtlichen Werte der Referenzmessungen berechnen.

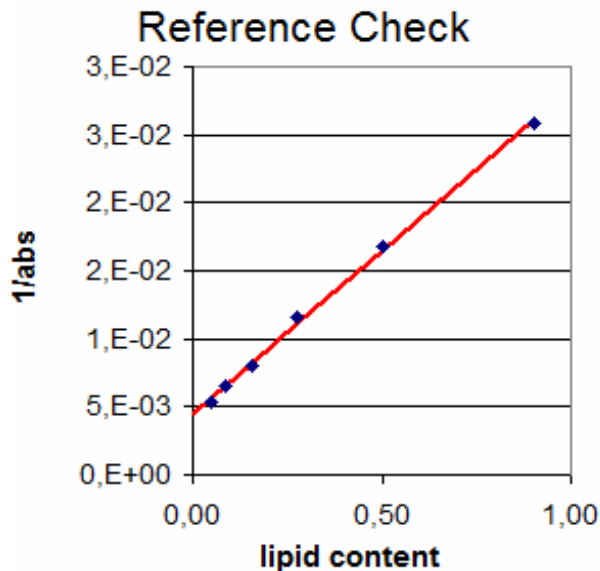


Abb. 25: Diagramm Reference Check (Screenshot)

Dieser Zusammenhang wird in dem Diagramm „Reference Check“ dargestellt.

Der Ordinatenabschnitt der Geraden entspricht dem Kehrwert der errechneten Peakfläche der Referenzen.

Bei allen Analysen wird auf der Ordinate der Kehrwert der ermittelten Peakfläche aufgetragen.

Auf der Abszisse wird je nach Testkit der Gehalt an Proteinen oder der Lipidgehalt aufgetragen.

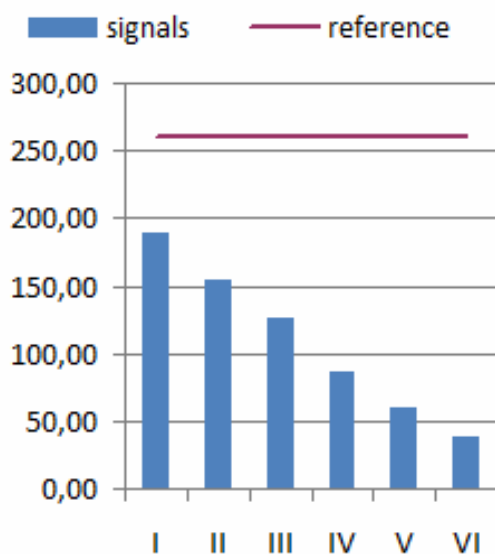
- **Korrelationskoeffizient r^2 :**

Der Korrelationskoeffizient ist eine Maßzahl, die die lineare Korrelation der einzelnen Messwerte beschreibt. Je stärker die Werte linear zusammenhängen desto näher nähert sich Wert von r^2 1 an.

- **Anzahl der verwertbaren Messpunkte:**

Ausreißer und fehlende Daten verringern den Quality Index

- **Widerspruchsfreiheit der Daten:**



Mit steigender Proteinkonzentration steigt auch die Menge an gebundenem und sinkt die Menge an freiem Wirkstoff.

Dementsprechend sollten sich bei allen Analysen für die Referenzwerte die höchsten Signale ergeben und diese mit steigender Proteinkonzentration niedriger werden.

Im Diagramm kann man deutlich sehen, dass die Referenzmessungen (violette Linie) die höchsten Signale liefern. In den proteinhaltigen Wells I-VI sinkt die Signalstärke mit steigender Konzentration.

Abb. 26: Diagramm Vergleich Signale und Referenzen (Screenshot)

4.1.3.2 Parameter der Plasmaproteinbindung [20]

- **Dissoziationskonstante K_D**

Die Plasmaproteinbindung wird durch die Dissoziationskonstante K_D bestimmt.

Die K_D Werte des HSA und AGP Binding Kits benötigt man zur Bestimmung von V_D bei der Analyse der Intestinalen Absorption.

$$K_D = \frac{[A] \cdot [P]}{[AP]}$$

$[A]$...Konzentration an freiem Wirkstoff
 $[P]$...Konzentration an freien Proteinen
 $[AP]$...Konzentration an proteingebundenem Wirkstoff

Abb. 27: Formel für die Berechnung der Dissoziationskonstante K_D

Unter Verwendung der Formel für die Konzentration an freiem Anteil berechnet man K_D aus den Analyseergebnissen.

Das Ergebnis wird als Diagramm „ K_D Estimation“ dargestellt und ist eine lineare Gerade deren y-Achsenabschnitt im Ursprung liegt und im Idealfall eine Steigung von K_D^{-1} hat. Die Dissoziationskonstante kann somit an der Steigung der Geraden abgelesen werden.

$$[A] = f_u \cdot ([A] + [AP]) \Rightarrow \frac{f_b}{f_u} = \frac{1}{K_D} \cdot P$$

f_u ... fraction unbound, Anteil an ungebundenem Wirkstoff

Abb. 28: Formel für die Berechnung der Konzentration an freiem Anteil $[A]$

- **Gebundener Wirkstoffanteil f_b (fraction bound) in Prozent**

Als Ergebnis wird ein f_b - Wert und ein zugehöriges Intervall angegeben.

- **Gesamter gebundener Wirkstoffanteil f_b (fraction bound)**

Mit den Dissoziationskonstanten von AGP und HSA kann man den gesamten gebundenen Wirkstoffanteil voraussagen.

$$f_b = 1 - \frac{1}{1 + \frac{[HSA]}{K_D^{HSA}} + \frac{[AGP]}{K_D^{AGP}}}$$

Abb. 29: Formel für die Berechnung des gebundenen Anteils f_b

4.1.3.3 Parameter der Gewebsbindung [3, 12, 22]

- **Logarithmus der Membranaffinität logMA:**

Der Verteilungskoeffizient zwischen Membran und Puffer wird durch die Membranaffinität beschrieben.

$$MA = \frac{c_l}{c_b} \quad \begin{array}{l} c_l \text{Konzentration in der Lipidphase} \\ c_b \text{Konzentration in der Pufferphase} \end{array}$$

Abb. 30: Formel für die Berechnung der Membranaffinität MA

Unter Verwendung der Massenbilanzgleichung berechnet man die Membranaffinität aus den Analyseergebnissen.

Das Ergebnis wird als Diagramm „MA Estimation“ dargestellt, wobei die Membranaffinität an der Geraden abgelesen werden kann.

$$n_t = c_b \cdot V_b + c_l \cdot V_l \quad \Rightarrow \quad \frac{n_t}{c_b} = \frac{c_l}{c_b} \cdot V_l + V_b = MA \cdot V_l + V_b$$

n_t ... Gesamtmenge des Wirkstoffes

V_l ... Volumen der Lipidphase

V_b ... Volumen der Pufferphase

Abb. 31: Formel der Massenbilanz

4.1.3.3.1 Spezifische Parameter der Mikrosomalen Bindung

➤ **$f_u(\text{mic})$: Freier Wirkstoffanteil in Gegenwart von Lebermikrosomen**

$$f_u = \frac{n_b}{n_t} = \frac{c_b \cdot (V_t - V_l)}{n_t}$$

n_b ... Menge an Wirkstoff im Puffer

n_t ... Gesamtmenge des Wirkstoffes

V_l ... Lipidvolumen im Versuch

V_t ... Gesamtvolumen des Versuches

Abb. 32: Formel für die Berechnung des freien Wirkstoffanteils f_u

Die Clearance wird durch mikrosomale Bindung beeinflusst, da nur ungebundener Wirkstoff metabolisiert wird sinkt sie mit zunehmender Bindung. Folgende Formel beschreibt Zusammenhang der gemessenen Clearance mit der Intrinsischen Clearance

$$Cl_{int} = \frac{Cl_{inc}}{f_u(mic)}$$

Cl_{int} Intrinsische Clearance

Cl_{inc} Clearance bei mikrosomaler Inkubation

$f_u(mic)$... Wirkstoffanteil der nicht an mikrosomale Membranen bindet

Abb. 33: Formel für die Berechnung der intrinsischen Clearance Cl_{int}

4.1.3.3.2 Spezifische Parameter der Intestinalen Absorption

➤ $P_{int}[cm/sec]$: Permeabilitätskoeffizient

P_{int} ist von der Membranaffinität MA und dem Volumen des Wirkstoffmoleküls abhängig.

Man hat herausgefunden, dass das Molekülvolumen mit dem viel einfacher zu bestimmenden Molekulargewicht korreliert, wenn man im Molekül enthaltene Halogenide gesondert berücksichtigt, da sie vergleichsweise viel zum Gewicht und wenig zum Volumen eines Moleküls beitragen. [21]

Durch Subtraktion eines je nach Art und Anzahl der Halogenide festgesetzten Wertes vom Gesamtgewicht des Moleküls erhält man das effektive Molekulargewicht MW_{eff} das direkt mit dem Molekülvolumen korreliert.

➤ $\log K^{B/F}$: Plasmaproteinbindungsindex

Der Plasmaproteinbindungsindex gibt das Verhältnis von gebundenem Wirkstoffanteil zu freiem Wirkstoffanteil im Plasma an.

➤ $V_D [L/kg]$: scheinbares Verteilungsvolumen

Das scheinbare Verteilungsvolumen wird durch die Plasmaproteinbindung und die Membranaffinität bestimmt.

$$V_D = 10^{a \cdot \log(MA) + b \cdot \log(K_{b,f}) + c}$$

a, b, c.... Parameter, die durch Auswertung von 42 Wirkstoffen mit bekanntem V_D erhalten wurden

Abb. 34: Formel für die Berechnung des scheinbaren Verteilungsvolumens V_D

4.1.3.3.3 Spezifische Parameter der Gehirn Absorption

➤ $f_{u,brain}$: freier Wirkstoffanteil im Gehirn

Der freie Wirkstoffanteil wird anhand folgender Gleichung berechnet, die die ermittelte Membranaffinität beinhaltet

$$f_{u,brain} = 10^{b_1 \cdot \log MA_{brain} + b_2}$$

Abb. 35: Formel für die Berechnung des freien Wirkstoffanteils im Gehirn $f_{u,brain}$

➤ **log BB: Verteilungskoeffizient zwischen Gehirn und Plasma**

Für die Bestimmung sind die Membranaffinität, die logarithmierte Plasmaproteinbindung und die Größe der polaren Moleküloberfläche (PSA) notwendig. Zusätzlich werden für die Bestimmung spezifische Parameter a_1 , a_2 , a_3 , a_4 , b_1 und b_2 mit einberechnet.

Für die Kalibrierung des Modells wurde ein Algorithmus zur Abschätzung der polaren Moleküloberfläche der Firma Molinspiration

(<http://www.molinspiration.com/services/psa.html>) verwendet.

$$\log BB = a_1 \cdot \log MA_{\text{brain}} + a_2 \cdot \log K_{b/f} + a_3 \cdot PSA + a_4$$

4.1.4 Weitere verwendete Software:

- ChemSketch 2015: Erstellung von Strukturformeln
- MathType 6.9: Erstellung von mathematischen Formeln
- MS Excel 2010: Erstellung von Tabellen, Berechnungen, Auswertung HPLC
- MS Paint 2010: Erstellung von Screenshots, Abbildungen
- MS Word 2010: Erstellung der Diplomarbeit
- PDF 24 Creator 8.0.4: Umwandlung der Diplomarbeit ins PDF Format

5.) Ergebnisse

5.1 Charakteristika der getesteten Anthrachinonderivate

Substanz	MG (g/mol)	EW [mg]	Löslichkeit in DMSO	Farbe der Stammlösung
AC 1	274	1,01	gut löslich	Farbwechsel: Gelb→Rot →Gelb
AC 2	389	1,56	gut löslich	Schwach gelblich
AC 3	439	1,76	gut löslich	Gelb
AC 4	370	1,48	gut löslich	Farbwechsel: Gelb→Rot →Gelb
AC 5	530	2,12	gut löslich	Hellgelb
Linezolid	337	1,35	gut löslich	Farblos

Tab.4: Eigenschaften Testsubstanzen AC 1- AC 5 und des Standards Linezolid

Wie der Tabelle 4 zu entnehmen ist, konnten im Vorfeld der Probendurchführung einige Charakteristika der Testsubstanzen festgestellt werden.

Das Molekulargewicht der Substanzen differierte sehr stark von 274 g/mol bei Substanz AC 1 bis zu 530 g/mol bei Substanz AC 5.

Die Substanzen selbst waren gelblich-orange und auch die hergestellten Stammlösungen waren in unterschiedlichen Gelbtönen gefärbt.

Durch einen Stabilitätstest, der mit der Stammlösung von Substanz AC 3 durchgeführt wurde zeigte sich die Lichtempfindlichkeit der Substanzen, weshalb alle Versuche unter Abschirmung von Licht durchgeführt wurden, um die Anthrachinonderivate vor möglichen lichtabhängigen Veränderungen der Molekülstruktur zu schützen.

Die Löslichkeit in der 32 % igen DMSO/ Pufferlösung war bei allen Substanzen gut. Das kann auch an der Vorgehensweise liegen, da die Substanzen zuerst in 100% DMSO gelöst wurden und anschließend schrittweise Pufferlösung zugegeben wurde, um auf die erforderliche 32%ige Lösung zu verdünnen. Außerdem wurden alle Stammlösungen nach ihrer Herstellung für 30 Minuten ins Ultraschallbad eingebracht um eventuell nicht gelöste Teilchen in Lösung zu bringen.

Zwei Substanzen zeigten während des Auffüllens mit Pufferlösung Farbveränderungen zu Orangerot sowie Dunkelrot. Durch weitere Zugabe von Puffer färbten sich die Stammlösungen allerdings wieder gelb.

Aufgrund von patentrechtlichem Schutz darf keine Aussage über die genauen Strukturen getroffen werden. Da bekannt gegeben werden darf, dass es sich bei den Testsubstanzen um Anthrachinonderivate handelt, kann man bereits an der Grundstruktur erkennen, dass es sich um lipophile Strukturen handelt.

5.2 UV/ Vis Messergebnisse

Bei der Vermessung der Stammlösungen am UV/Vis Spektrometer UV 1800 erhielt man für jede Substanz ein Spektrogramm, auf dem das substanzspezifische Absorptionsmaximum aus einer Grafik und einer Tabelle abzulesen war.

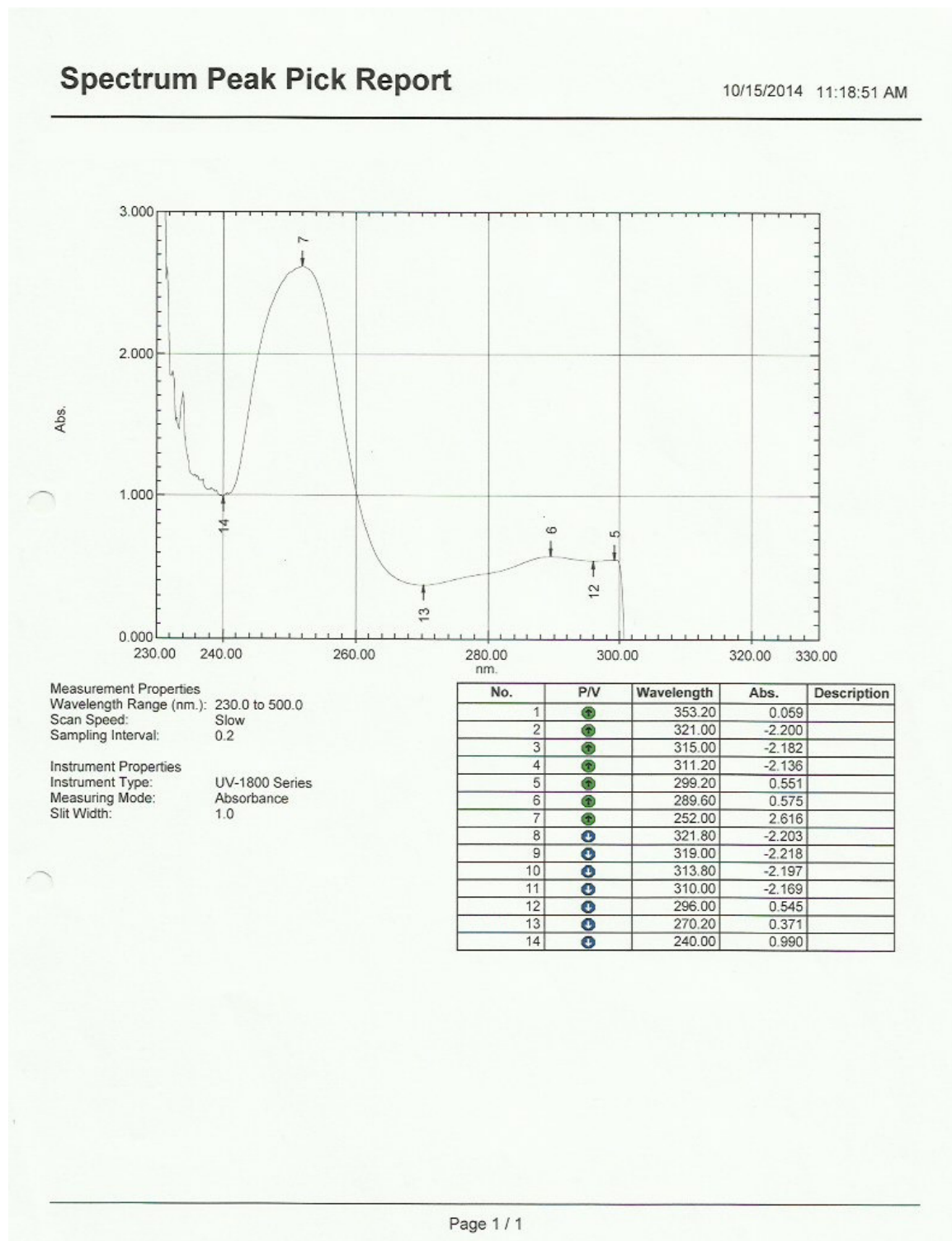


Abb.25: Exemplarische Darstellung eines UV/VIS Spektrogramms am Bsp von AC 3 (Foto: J. Wilthner)

Anhand des in Abbildung 25 dargestellten Spektrogramms von AC 3 erkennt man deutlich, dass dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 252 nm liegt.

Dieses Maximum ist in der Tabelle mit der Nummer „No 7“ gekennzeichnet.

Durch die Messung am UV/Vis konnten folglich die Absorptionsmaxima aller Substanzen bestimmt werden (Vgl Tabelle 5).

Substanz	λ Absorptionsmax.
AC 1	233 nm
AC 2	265 nm
AC 3	252 nm
AC 4	270nm
AC 5	263nm
Linezolid	254nm

Tab.5: Absorptionsmaxima der Prüfsubstanzen und des Standards Linezolid

Diese Ergebnisse sind bedeutsam für die HPLC Analyse.

Wenn man eine Substanz bei jener Wellenlänge analysiert, die ihrem Absorptionsmaximum entspricht, werden vorhandene Mengen am Chromatogramm besonders deutlich sichtbar.

5.3 Ergebnisse der HPLC Analyse

Die Ergebnisse der HPLC Analyse wurden mithilfe der Software „Chromaster System Manager“ auf dem mit der HPLC Anlage verbundenen Computer dargestellt.

Die Testsubstanzen lieferten in den meisten Fällen Chromatogramme mit mehreren Peaks. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Zuge einer HPLC Analyse alle vorhandenen Moleküle detektiert werden und von den neuen Substanzen weder Reinheit noch Stabilität bekannt war. Folglich musste der Substanzpeak anhand seiner spezifischen, in der „Voranalyse“ der Substanz bestimmten, Retentionszeit identifiziert werden.

Grundsätzlich integriert das Programm durch Festlegen einer Basislinie pro Peak die Peakfläche ohne weiteres zutun.

Wenn nun allerdings mehrere Peaks eng aneinander liegen, kann es passieren, dass der Algorithmus des Computerprogramms diese als eine zusammengehörige Erhebung wertet und eine Basislinie unter mehrere Peaks legt. Ebenso können Basislinien ungenau gesetzt werden. Folglich ergeben sich in beiden Fällen falsche Ergebnisse für die entsprechenden Peakflächen.

Aus diesem Grund kontrolliert man in jedem Chromatogramm, ob der jeweilige Substanzpeak eine eigene Basislinie hat und korrigiert gegebenenfalls fehlerhaft gesetzte Basislinien.

Anschließend integriert die Software das Chromatogramm im entsprechenden Abschnitt und man erhält die Peakfläche der Prüfsubstanz.

5.4 Chromatogramme

Auf Grundlage der Daten aus der HPCL Analyse wurden im Softwareprogramm GraphPad Prism Chromatogramme erstellt, auf denen der Substanzpeak gut ersichtlich ist.

Die Chromatogramme sind eine graphische Darstellung der Analyse der Transil-Kits, folglich stimmt die Reihenfolge der Chromatogramme einer Serie mit der Reihenfolge der Reaktionsgefäße einer Reihe des Transil Kits überein

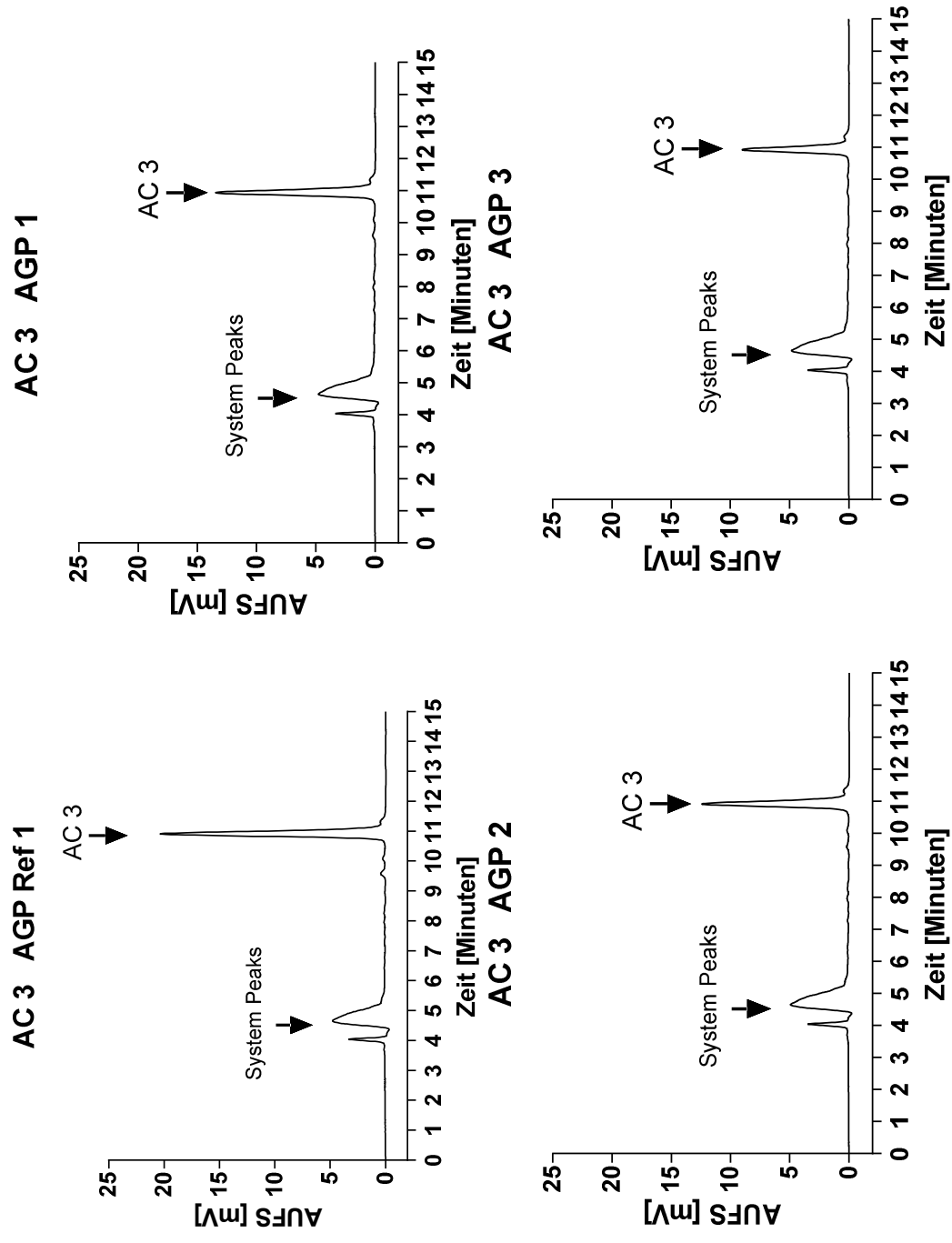
Die Chromatogramme aller Serien zeigen deutlich, dass die Peakfläche der jeweiligen analysierten Substanz bei den beiden Referenzmessungen, deren Transil-Reaktionsgefäße keine mit Proteinen beschichtete Silica-Kügelchen enthielten, am größten ist.

Die zweitgrößten Werte liefert jeweils die Analyse des Überstandes des zweiten Reaktionsgefäßes, in dem sich die geringste Menge an Proteinen befunden hat. Mit zunehmender Proteinkonzentration im Well nehmen die Peakflächen ab, sodass die Messung des Überstandes vom siebenten Well, das dem 7. Chromatogramm der Serie entspricht, und die höchste Konzentration an Protein enthielt, die geringsten Peakflächen liefert.

Da die Peakfläche zur Konzentration an freier Substanz direkt proportional ist, lässt sich aus den Chromatogrammen ableiten, dass in den Überständen der Referenzgefäße die höchste Konzentration an freiem Wirkstoff vorhanden ist und in jenem vom jeweils siebenten Well die geringste Konzentration.

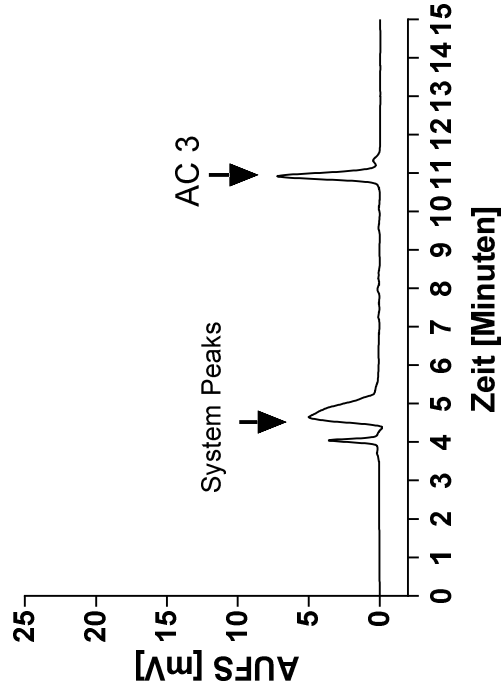
Somit ergibt sich, dass das Ausmaß der Proteinbindung direkt proportional zur Menge an Proteinen ist, denn je höher die Proteinkonzentration im Well ist, desto mehr Substanz wird an Proteine gebunden und desto weniger liegt frei vor.

5.4.1 Chromatogramme AGP Bindung von AC 3: Wells 1-4

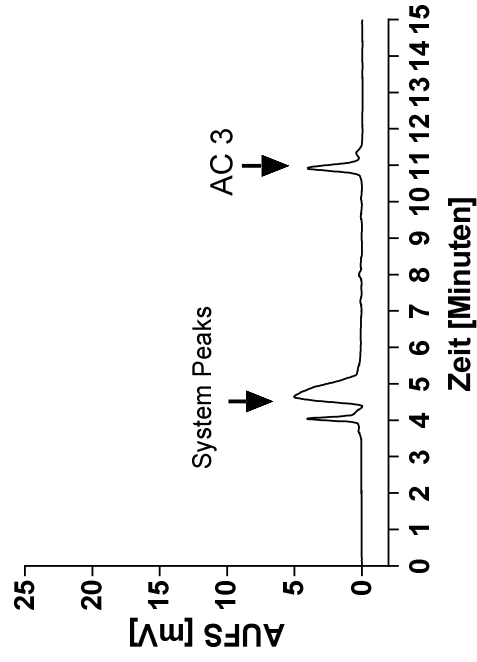


5.4.1 Chromatogramme AGP Bindung von AC 3: Wells 5-8

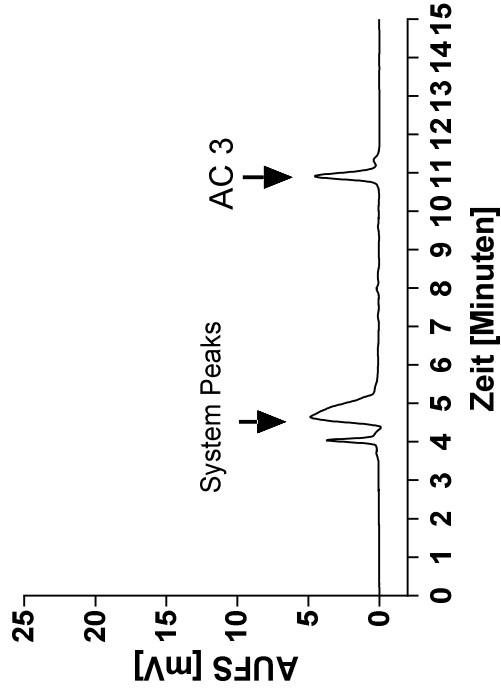
AC 3 AGP 4



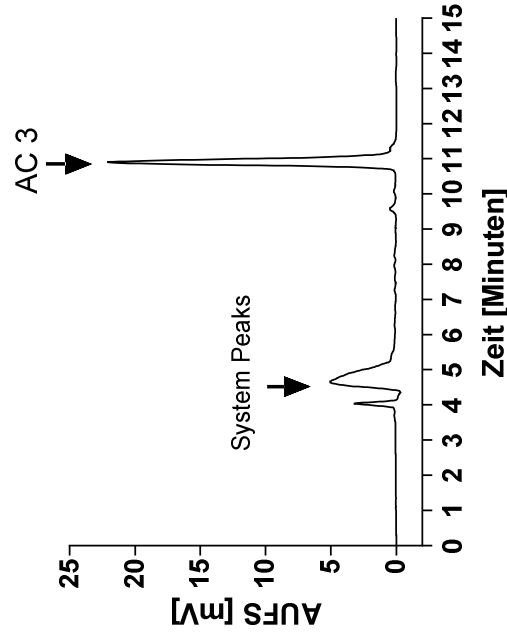
AC 3 AGP 6



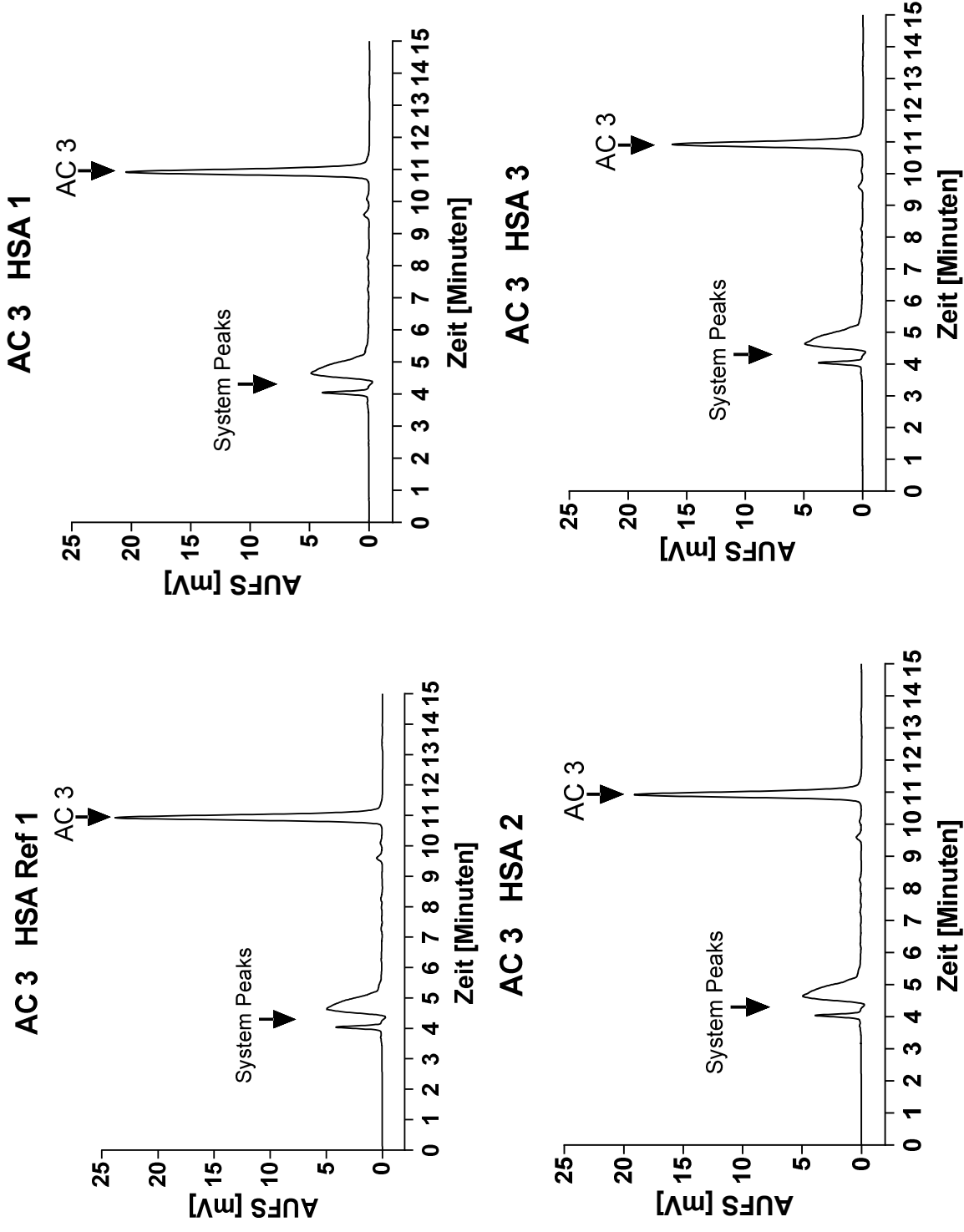
AC 3 AGP 5



AC 3 AGP Ref 2

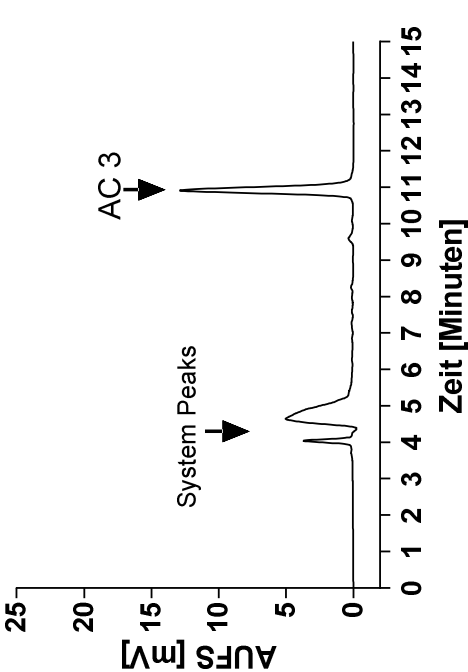


5.4.2 Chromatogramme HSA Bindung von AC 3: Wells 1-4

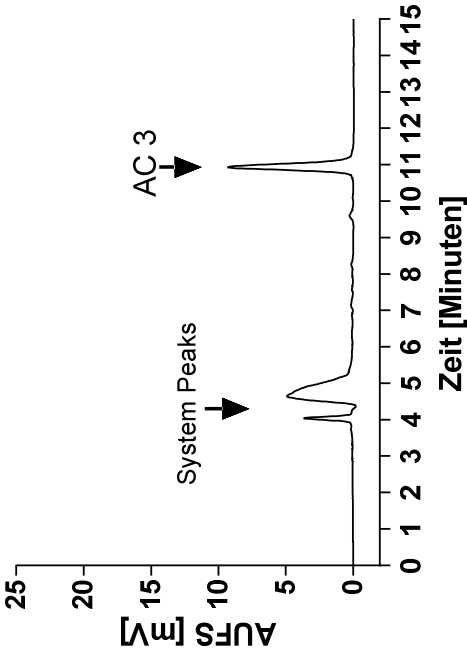


5.4.2 Chromatogramme HSA Bindung von AC 3: Wells 5-8

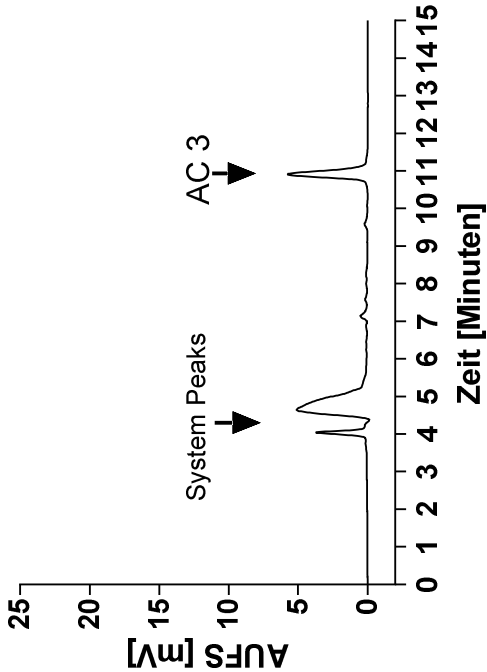
AC 3 HSA 4



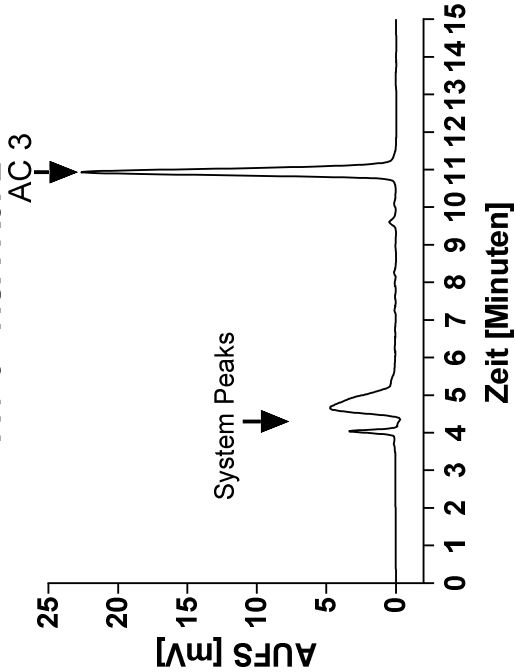
AC 3 HSA 5



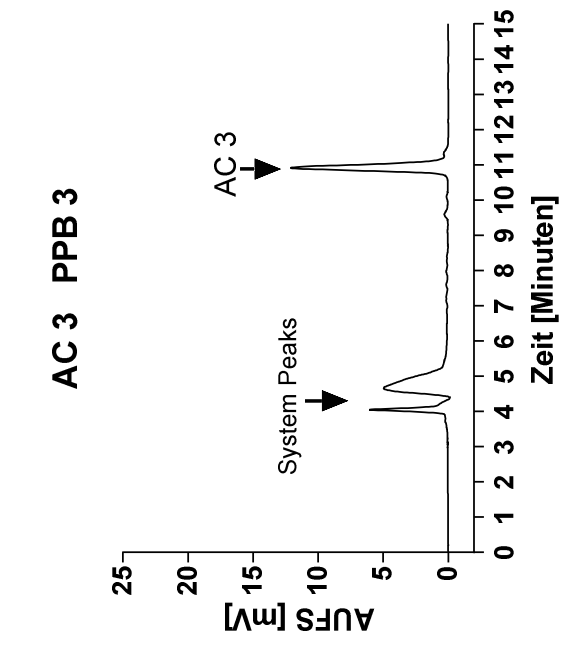
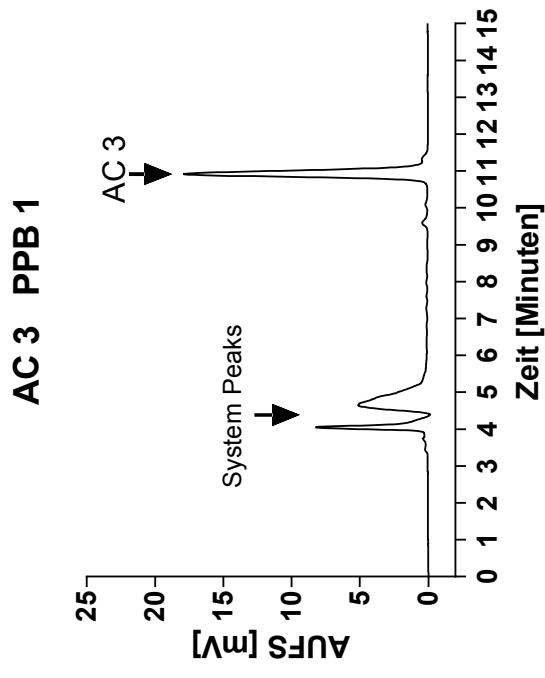
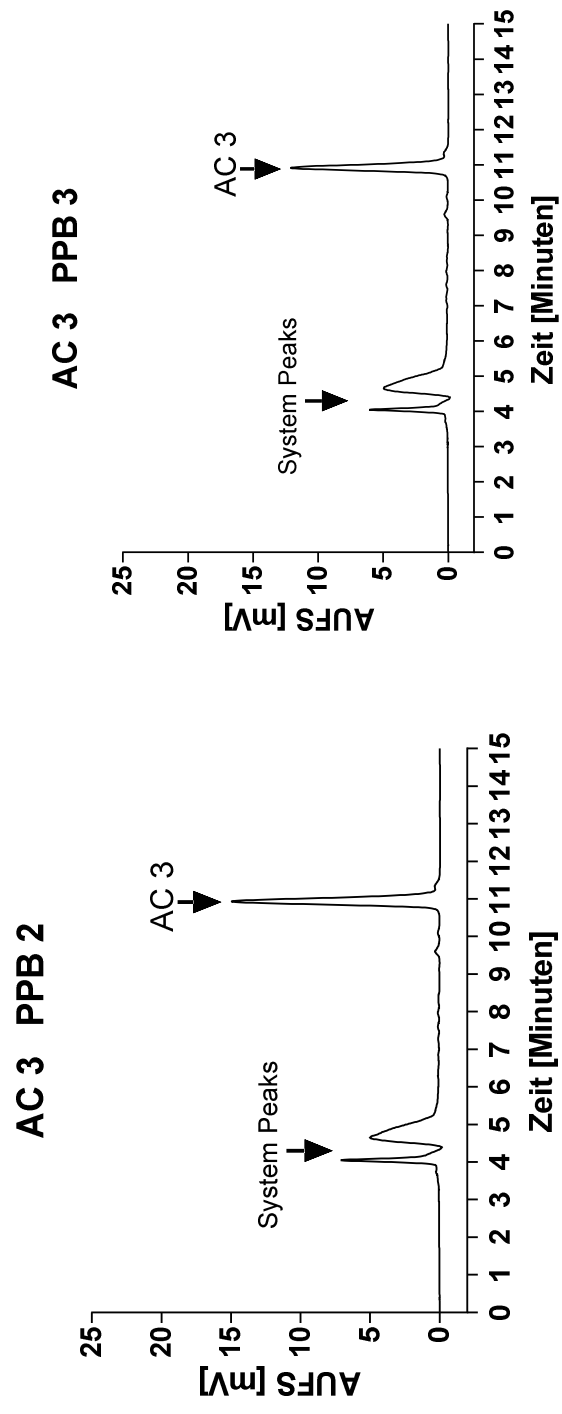
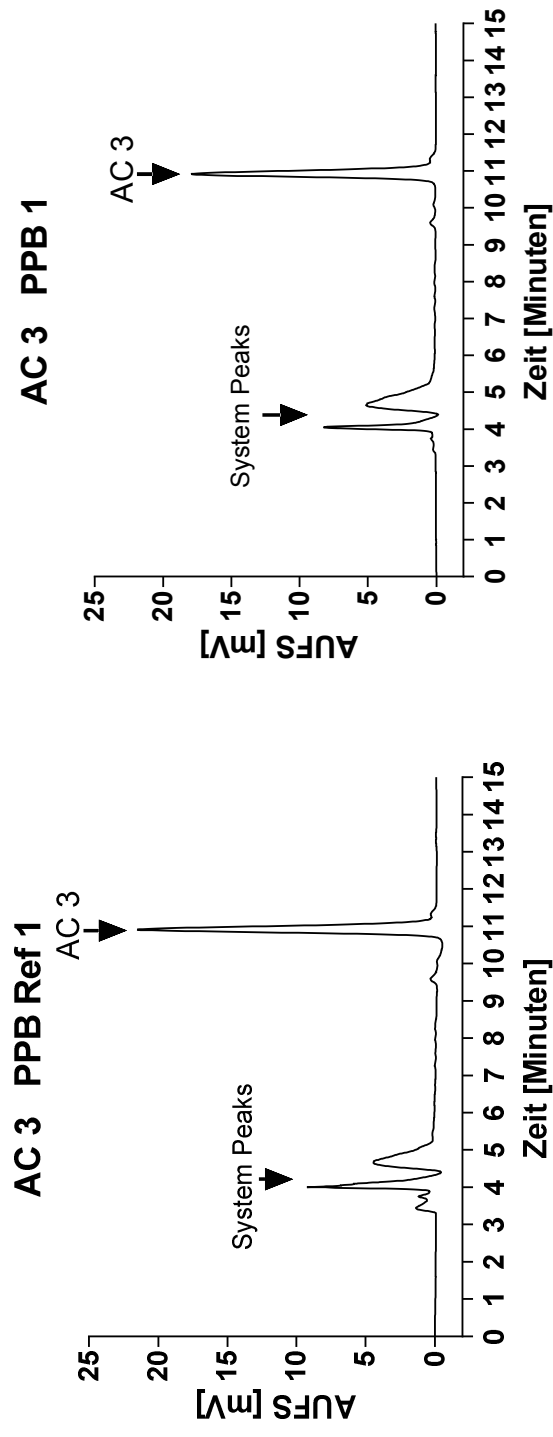
AC 3 HSA 6



AC 3 HSA Ref 2

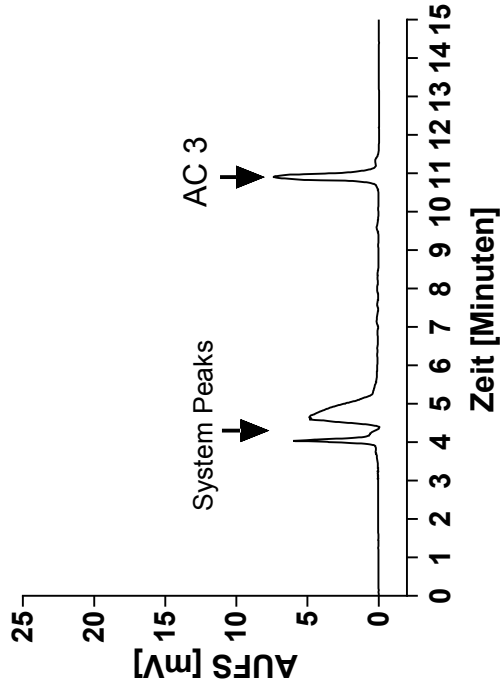


5.4.3 Chromatogramme Plasmaprotein-Bindung von AC 3: Wells 1-4

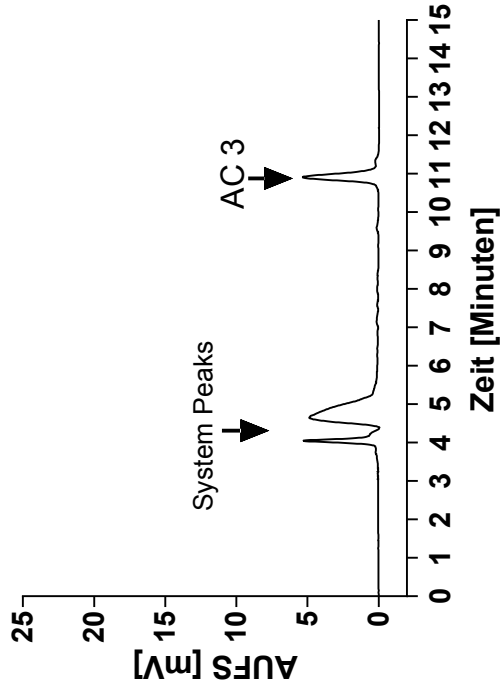


5.4.3 Chromatogramme Plasmaprotein-Bindung von AC 3: Wells 5-8

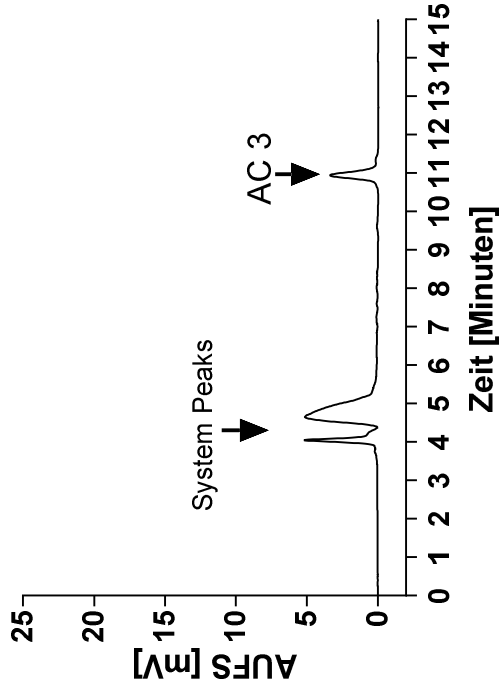
AC 3 PPB 4



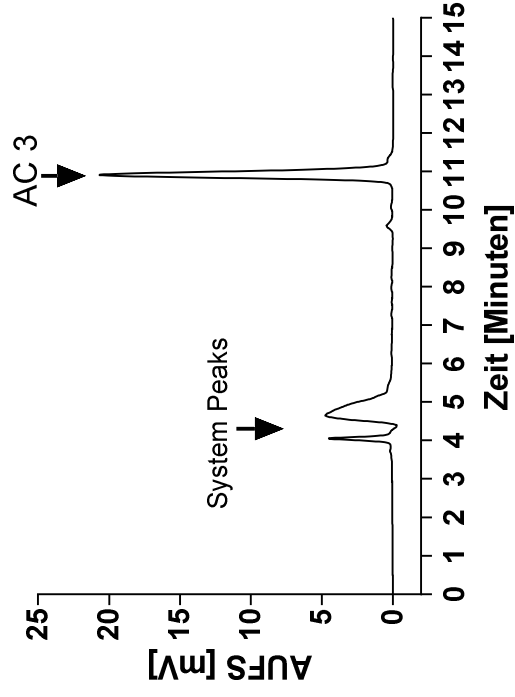
AC 3 PPB 5



AC 3 PPB 6



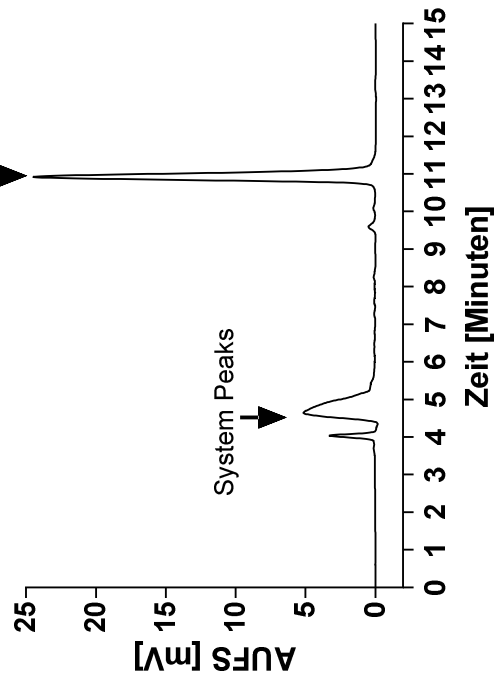
AC 3 PPB Ref 2



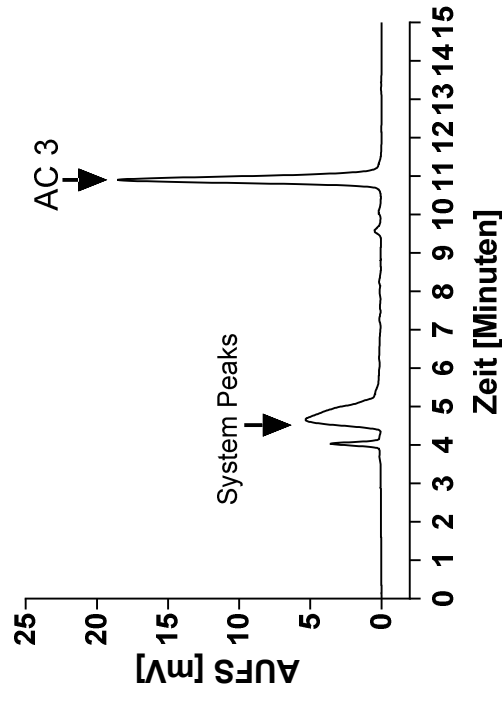
5.4.4 Chromatogramme Mikrosomale Bindung von AC 3: Wells 1-4

AC 3 Mikrosomal Ref 1

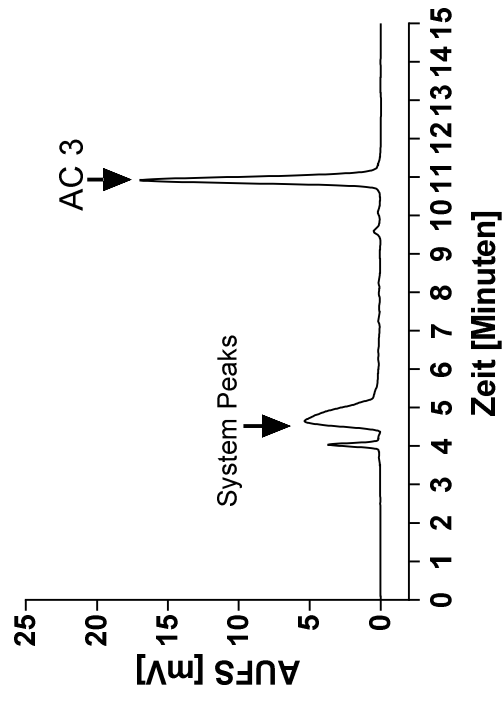
AC 3



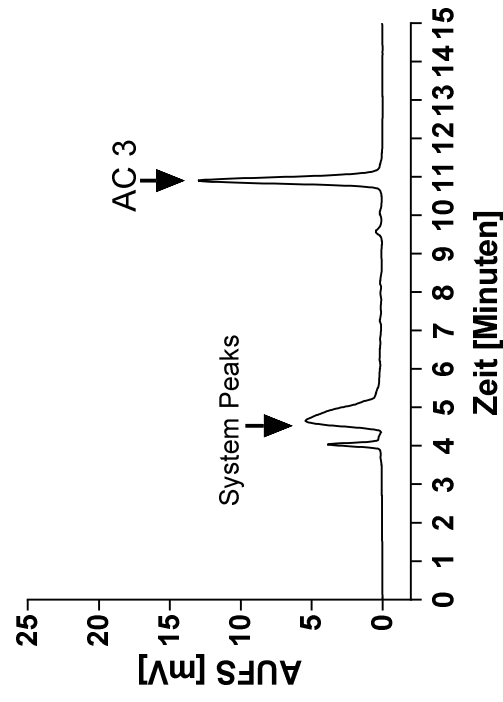
AC 3 Mikrosomal 1



AC 3 Mikrosomal 2

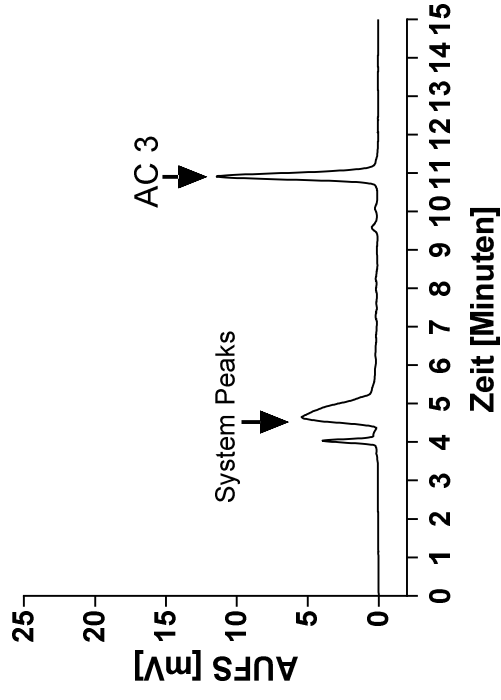


AC 3 Mikrosomal 3

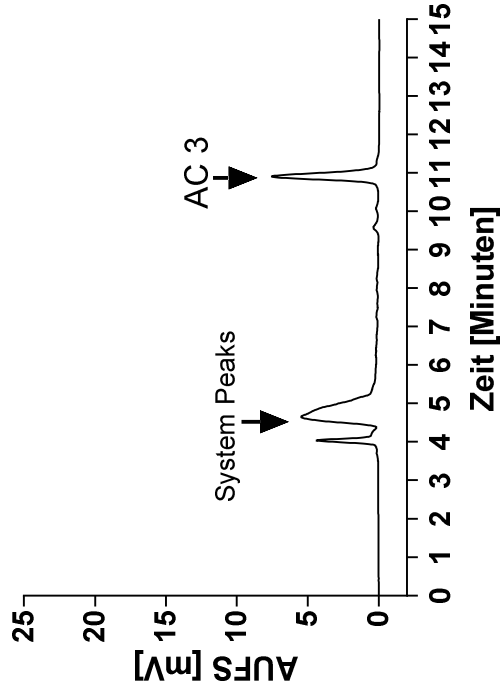


5.4.4 Chromatogramme Mikrosomale Bindung von AC 3: Wells 5-8

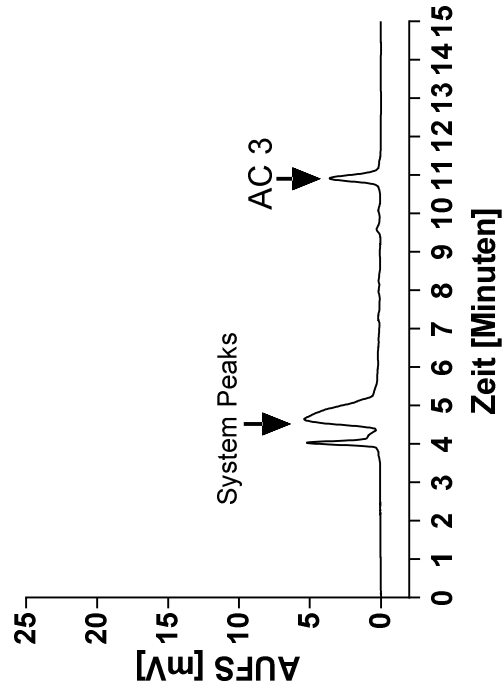
AC 3 Mikrosomal 4



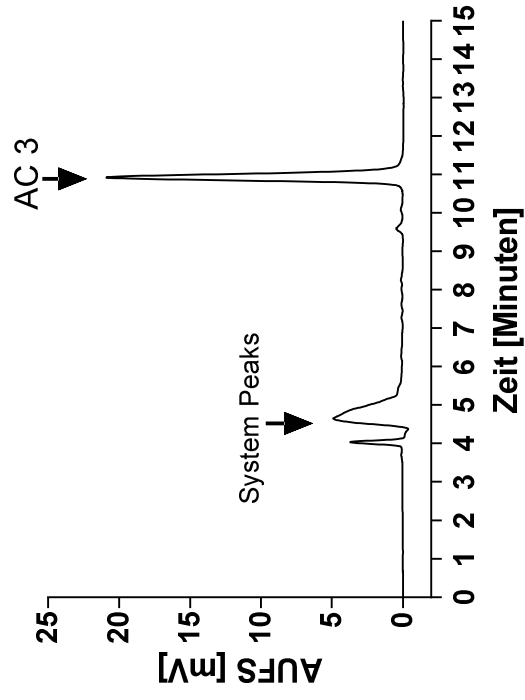
AC 3 Mikrosomal 5



AC 3 Mikrosomal 6

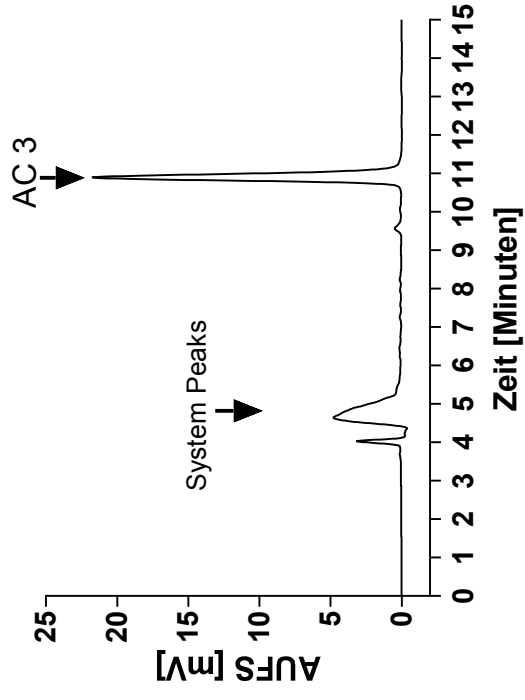


AC 3 Mikrosomal Ref 2

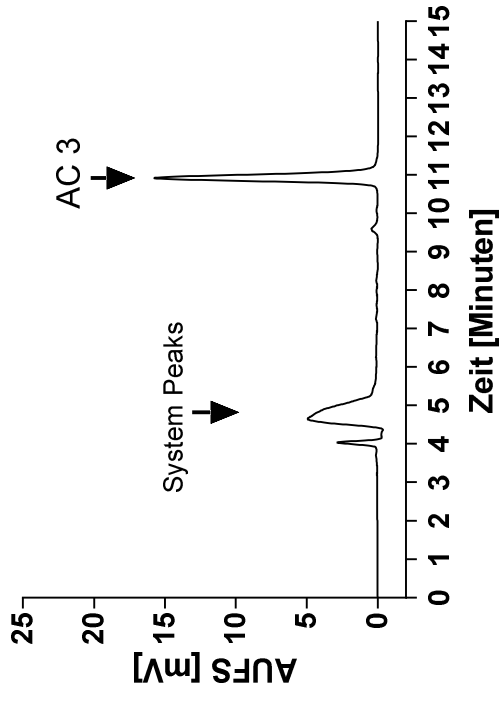


5.4.5 Chromatogramme Intestinale Bindung von AC 3: Wells 1-4

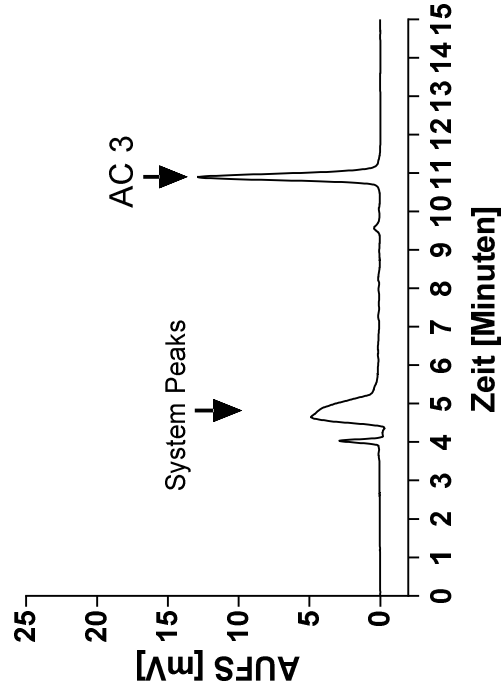
AC 3 Intestinal Ref 1



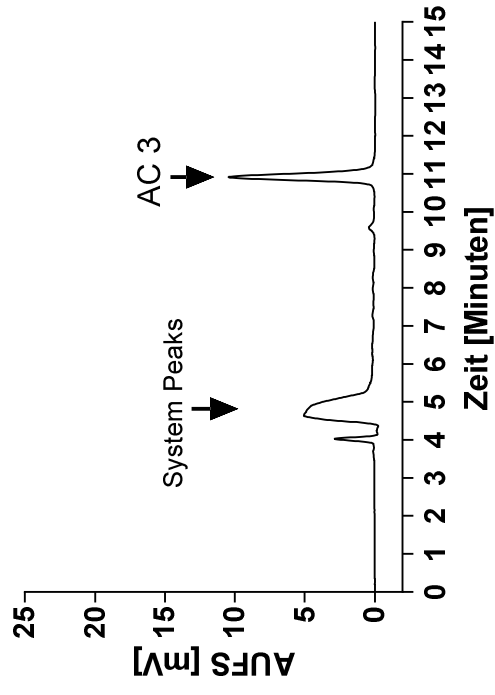
AC 3 Intestinal 1



AC 3 Intestinal 2

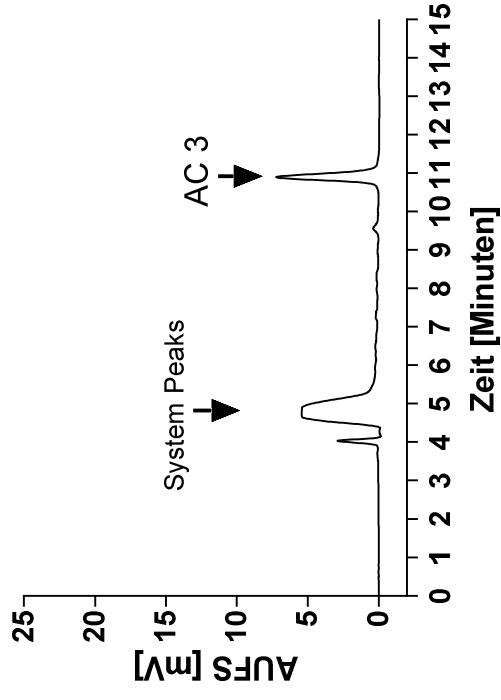


AC 3 Intestinal 3

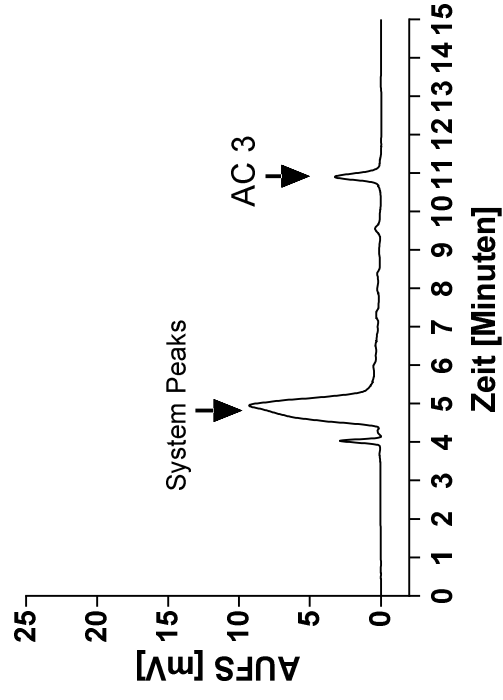


5.4.5 Chromatogramme Intestinale Bindung von AC 3 Wells 5-8

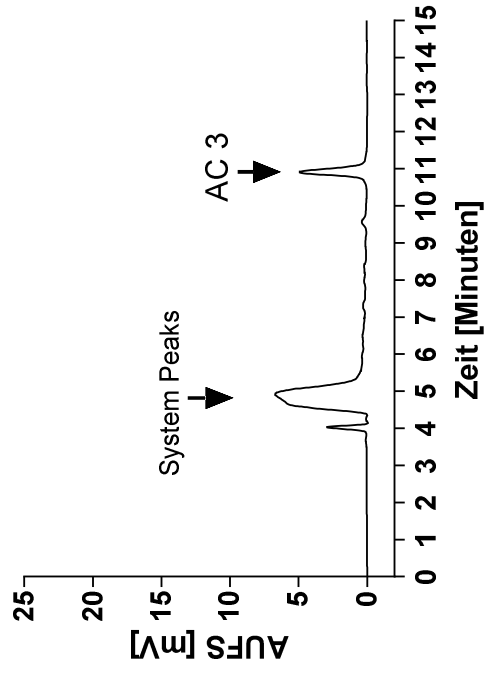
AC 3 Intestinal 4



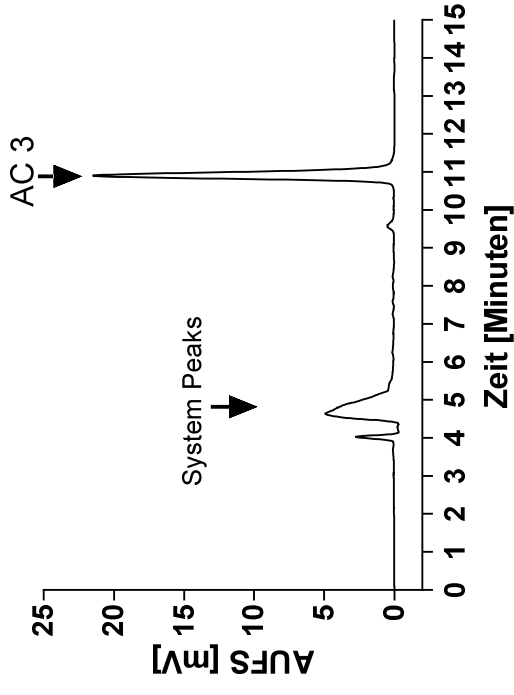
AC 3 Intestinal 6



AC 3 Intestinal 5

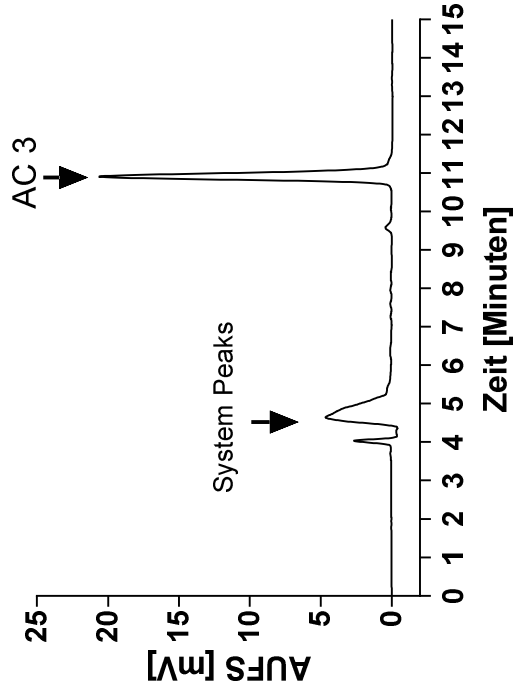


AC 3 Intestinal Ref 2

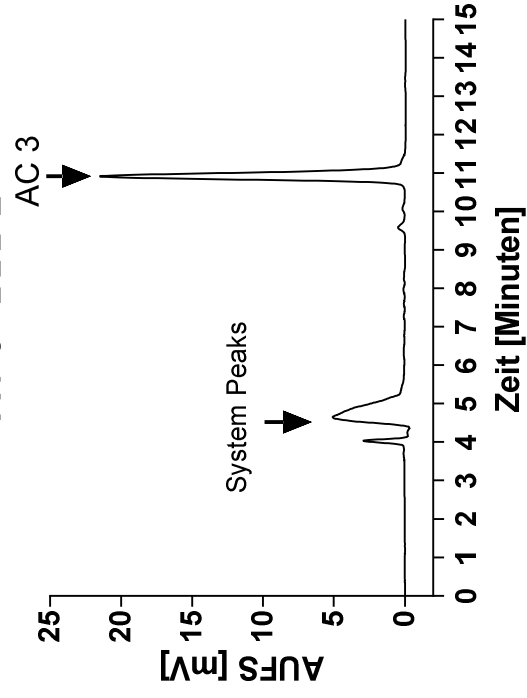


5.4.6 Chromatogramme Brain Absorption von AC 3: Wells 1-4

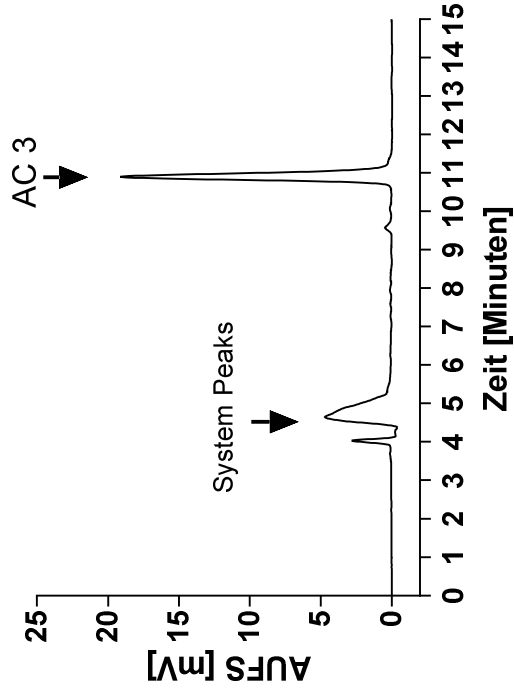
AC 3 BBB Ref 1



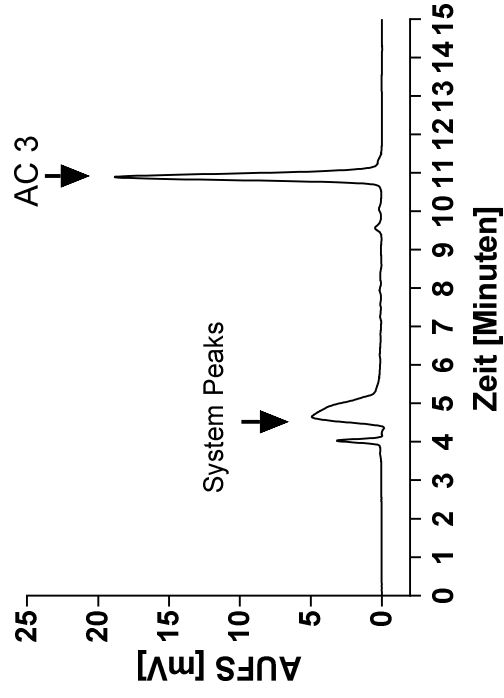
AC 3 BBB 2



AC 3 BBB 1

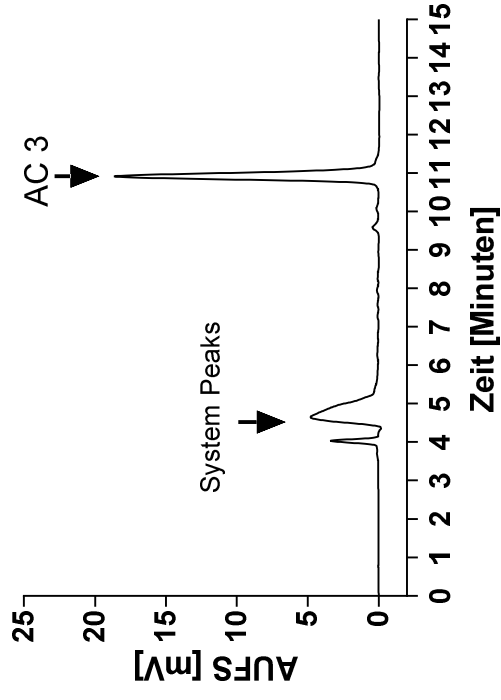


AC 3 BBB 3

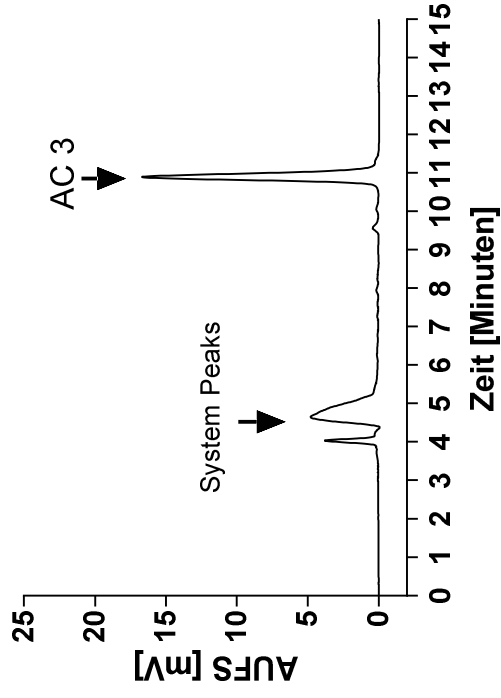


5.4.6 Chromatogramme Brain Absorption von AC 3 Wells 5-8

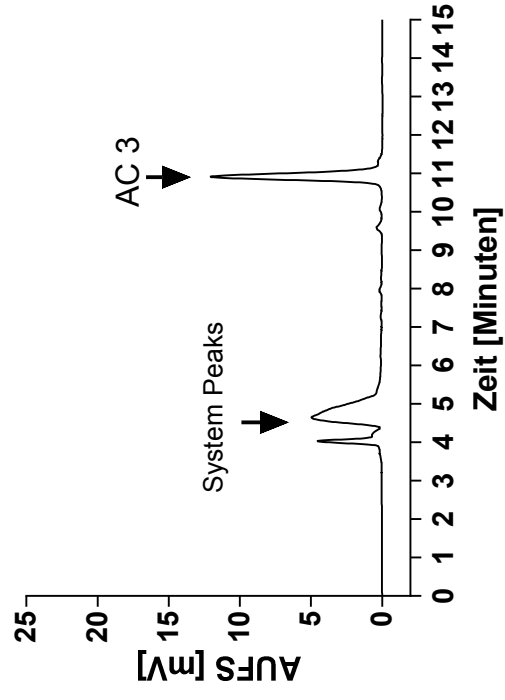
AC 3 BBB 4



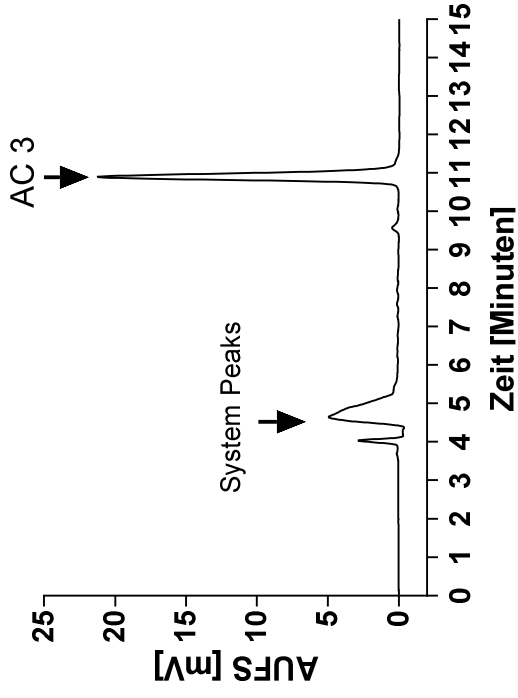
AC 3 BBB 5



AC 3 BBB 6



AC 3 BBB Ref 2



5.5 Raw Data Tabellen

Die bei der HPLC Analyse ermittelten Peakflächen der untersuchten Substanzen wurden, wenn nötig, nachintegriert und dann in diese Excel Arbeitsblätter der Transil Software eingetragen. Sie bilden die Grundlage der Auswertungen und Berechnungen.

5.5.1 raw data Tabelle der AGP- Bindung

Please enter the peak area or concentration data in column G below					
Please leave missing data fields blank					
test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
AC 1	A-1	Ref 1	116,400		
AC 1	B-1	Well 1	100,500		
AC 1	C-1	Well 2	115,100		
AC 1	D-1	Well 3	86,200		
AC 1	E-1	Well 4	83,600		
AC 1	F-1	Well 5	87,100		
AC 1	G-1	Well 6	68,700		
AC 1	H-1	Ref 2	132,000		
AC 2	A-2	Ref 1	285,900		
AC 2	B-2	Well 1	280,900		
AC 2	C-2	Well 2	264,300		
AC 2	D-2	Well 3	243,100		
AC 2	E-2	Well 4	249,600		
AC 2	F-2	Well 5	248,300		
AC 2	G-2	Well 6	231,200		
AC 2	H-2	Ref 2	309,900		
AC 3	A-3	Ref 1	239,700		
AC 3	B-3	Well 1	158,400		
AC 3	C-3	Well 2	147,900		
AC 3	D-3	Well 3	105,600		
AC 3	E-3	Well 4	83,900		
AC 3	F-3	Well 5	53,000		
AC 3	G-3	Well 6	46,100		
AC 3	H-3	Ref 2	261,300		
AC 4	A-4	Ref 1	435,600		
AC 4	B-4	Well 1	262,000		
AC 4	C-4	Well 2	178,600		
AC 4	D-4	Well 3	130,400		
AC 4	E-4	Well 4	46,000		
AC 4	F-4	Well 5	29,600		
AC 4	G-4	Well 6	23,800		
AC 4	H-4	Ref 2	457,500		
AC 5	A-5	Ref 1	26,600		
AC 5	B-5	Well 1	15,100		
AC 5	C-5	Well 2	18,800		
AC 5	D-5	Well 3	10,700		
AC 5	E-5	Well 4	9,500		
AC 5	F-5	Well 5	4,000		
AC 5	G-5	Well 6	3,400		
AC 5	H-5	Ref 2	30,800		

Abb.: 37 Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem AGP Binding Kit – raw data (Screenshot)

5.5.2 raw data Tabelle der HSA- Bindung

Please enter the peak area or concentration data in column G below					
Please leave missing data fields blank					
test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
AC 1	A-1	Ref 1	151,400		
AC 1	B-1	Well 1	63,300		
AC 1	C-1	Well 2	33,200		
AC 1	D-1	Well 3	18,500		
AC 1	E-1	Well 4	8,400		
AC 1	F-1	Well 5	5,100		
AC 1	G-1	Well 6	3,000		
AC 1	H-1	Ref 2	99,600		
AC 2	A-2	Ref 1	293,900		
AC 2	B-2	Well 1	229,800		
AC 2	C-2	Well 2	195,800		
AC 2	D-2	Well 3	168,000		
AC 2	E-2	Well 4	129,800		
AC 2	F-2	Well 5	78,900		
AC 2	G-2	Well 6	42,000		
AC 2	H-2	Ref 2	296,200		
AC 3	A-3	Ref 1	287,100		
AC 3	B-3	Well 1	246,900		
AC 3	C-3	Well 2	230,500		
AC 3	D-3	Well 3	195,800		
AC 3	E-3	Well 4	154,400		
AC 3	F-3	Well 5	111,500		
AC 3	G-3	Well 6	69,400		
AC 3	H-3	Ref 2	272,300		
AC 4	A-4	Ref 1	444,900		
AC 4	B-4	Well 1	402,300		
AC 4	C-4	Well 2	351,400		
AC 4	D-4	Well 3	312,500		
AC 4	E-4	Well 4	245,400		
AC 4	F-4	Well 5	238,400		
AC 4	G-4	Well 6	147,100		
AC 4	H-4	Ref 2	486,500		
AC 5	A-5	Ref 1	28,900		
AC 5	B-5	Well 1	14,200		
AC 5	C-5	Well 2	9,100		
AC 5	D-5	Well 3	10,100		
AC 5	E-5	Well 4	7,500		
AC 5	F-5	Well 5	4,800		
AC 5	G-5	Well 6	5,500		
AC 5	H-5	Ref 2	22,200		

Abb. 38: Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem HSA Binding Kit – raw data (Screenshot)

5.5.3 raw data Tabelle der PPB- Bindung

Please enter the peak area or concentration data in column G below					
Please leave missing data fields blank					
test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
AC 1	A-1	Ref 1	123,100		
AC 1	B-1	Well 1	34,800		
AC 1	C-1	Well 2	22,000		
AC 1	D-1	Well 3	14,400		
AC 1	E-1	Well 4	7,100		
AC 1	F-1	Well 5	3,300		
AC 1	G-1	Well 6	1,100		
AC 1	H-1	Ref 2	131,700		
AC 2	A-2	Ref 1	326,000		
AC 2	B-2	Well 1	208,100		
AC 2	C-2	Well 2	181,700		
AC 2	D-2	Well 3	131,100		
AC 2	E-2	Well 4	89,900		
AC 2	F-2	Well 5	62,300		
AC 2	G-2	Well 6	34,800		
AC 2	H-2	Ref 2	274,900		
AC 3	A-3	Ref 1	259,800		
AC 3	B-3	Well 1	211,200		
AC 3	C-3	Well 2	177,100		
AC 3	D-3	Well 3	142,500		
AC 3	E-3	Well 4	108,900		
AC 3	F-3	Well 5	63,100		
AC 3	G-3	Well 6	40,500		
AC 3	H-3	Ref 2	246,900		
AC 4	A-4	Ref 1	492,400		
AC 4	B-4	Well 1	401,900		
AC 4	C-4	Well 2	309,100		
AC 4	D-4	Well 3	261,500		
AC 4	E-4	Well 4	198,200		
AC 4	F-4	Well 5	116,100		
AC 4	G-4	Well 6	67,600		
AC 4	H-4	Ref 2	503,300		
AC 5	A-5	Ref 1	22,300		
AC 5	B-5	Well 1	11,500		
AC 5	C-5	Well 2	10,900		
AC 5	D-5	Well 3	8,900		
AC 5	E-5	Well 4	6,700		
AC 5	F-5	Well 5	4,700		
AC 5	G-5	Well 6	3,500		
AC 5	H-5	Ref 2	27,600		

Abb.: 39 Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem PPB Binding Kit – raw data (Screenshot)

5.5.4 raw data Tabelle der Mikrosomalen Bindung

Please enter the peak area or concentration data in column G below					
Please leave missing data fields blank					
test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
AC 1	A-1	Ref 1	140,6		
AC 1	B-1	Well 1	96,9		
AC 1	C-1	Well 2	56,7		
AC 1	D-1	Well 3	41,9		
AC 1	E-1	Well 4	29,3		
AC 1	F-1	Well 5	75,8		
AC 1	G-1	Well 6	4,3		
AC 1	H-1	Ref 2	104,2		
AC 2	A-2	Ref 1	317,8		
AC 2	B-2	Well 1	304,3		
AC 2	C-2	Well 2	295,3		
AC 2	D-2	Well 3	276,9		
AC 2	E-2	Well 4	295,9		
AC 2	F-2	Well 5	291,6		
AC 2	G-2	Well 6	173,4		
AC 2	H-2	Ref 2	312,1		
AC 3	A-3	Ref 1	294,4		
AC 3	B-3	Well 1	223,5		
AC 3	C-3	Well 2	202,9		
AC 3	D-3	Well 3	155,4		
AC 3	E-3	Well 4	136,8		
AC 3	F-3	Well 5	90,1		
AC 3	G-3	Well 6	42		
AC 3	H-3	Ref 2	251,9		
AC 4	A-4	Ref 1	155,2		
AC 4	B-4	Well 1	146,1		
AC 4	C-4	Well 2	132,7		
AC 4	D-4	Well 3	146,1		
AC 4	E-4	Well 4	134,2		
AC 4	F-4	Well 5	123,3		
AC 4	G-4	Well 6	109,3		
AC 4	H-4	Ref 2	153,8		
AC 5	A-5	Ref 1	31,2		
AC 5	B-5	Well 1	17,6		
AC 5	C-5	Well 2	12,6		
AC 5	D-5	Well 3	12,2		
AC 5	E-5	Well 4	5,2		
AC 5	F-5	Well 5	3,3		
AC 5	G-5	Well 6	9,9		
AC 5	H-5	Ref 2	32,5		

Abb. 40: Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem Mikrosomal Binding Kit – raw data (Screenshot)

5.5.5 raw data Tabelle der Intestinalen Absorption

Please enter the peak area or concentration data in column G below					
Please leave missing data fields blank					
test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
AC 1	A-1	Ref 1	102,7		
AC 1	B-1	Well 1	118,6		
AC 1	C-1	Well 2	91,3		
AC 1	D-1	Well 3	60,9		
AC 1	E-1	Well 4	52,1		
AC 1	F-1	Well 5	37,6		
AC 1	G-1	Well 6	23,2		
AC 1	H-1	Ref 2	103,3		
AC 2	A-2	Ref 1	319,1		
AC 2	B-2	Well 1	314,8		
AC 2	C-2	Well 2	313,7		
AC 2	D-2	Well 3	303,3		
AC 2	E-2	Well 4	298,3		
AC 2	F-2	Well 5	283,8		
AC 2	G-2	Well 6	263,5		
AC 2	H-2	Ref 2	314,9		
AC 3	A-3	Ref 1	262		
AC 3	B-3	Well 1	188,6		
AC 3	C-3	Well 2	154,4		
AC 3	D-3	Well 3	125,4		
AC 3	E-3	Well 4	86,5		
AC 3	F-3	Well 5	59,6		
AC 3	G-3	Well 6	38,6		
AC 3	H-3	Ref 2	258,2		
AC 4	A-4	Ref 1	162,6		
AC 4	B-4	Well 1	156		
AC 4	C-4	Well 2	144,2		
AC 4	D-4	Well 3	152,3		
AC 4	E-4	Well 4	138,5		
AC 4	F-4	Well 5	129,7		
AC 4	G-4	Well 6	121,7		
AC 4	H-4	Ref 2	157,4		
AC 5	A-5	Ref 1	35		
AC 5	B-5	Well 1	35,4		
AC 5	C-5	Well 2	30		
AC 5	D-5	Well 3	15,9		
AC 5	E-5	Well 4	14,5		
AC 5	F-5	Well 5	10,3		
AC 5	G-5	Well 6	7,5		
AC 5	H-5	Ref 2	36,9		

Abb.: 41 Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem Intestinal Absorption Kit – raw data (Screenshot)

5.5.6 raw data Tabelle der Gehirn Absorption:

Please enter the peak area or concentration data in column G below					
Please leave missing data fields blank					
test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
AC 1	A-1	Ref 1	64,7		
AC 1	B-1	Well 1	83,9		
AC 1	C-1	Well 2	80,3		
AC 1	D-1	Well 3	85,1		
AC 1	E-1	Well 4	80,9		
AC 1	F-1	Well 5	77,9		
AC 1	G-1	Well 6	73,3		
AC 1	H-1	Ref 2	72		
AC 2	A-2	Ref 1	337,1		
AC 2	B-2	Well 1	338,4		
AC 2	C-2	Well 2	324,9		
AC 2	D-2	Well 3	332		
AC 2	E-2	Well 4	303,4		
AC 2	F-2	Well 5	304,3		
AC 2	G-2	Well 6	308,5		
AC 2	H-2	Ref 2	314,3		
AC 3	A-3	Ref 1	247,7		
AC 3	B-3	Well 1	228,5		
AC 3	C-3	Well 2	258,8		
AC 3	D-3	Well 3	224,9		
AC 3	E-3	Well 4	223,2		
AC 3	F-3	Well 5	199		
AC 3	G-3	Well 6	143,3		
AC 3	H-3	Ref 2	255,4		
AC 4	A-4	Ref 1	156,4		
AC 4	B-4	Well 1	152,9		
AC 4	C-4	Well 2	148,1		
AC 4	D-4	Well 3	148		
AC 4	E-4	Well 4	150,1		
AC 4	F-4	Well 5	148,4		
AC 4	G-4	Well 6	136,5		
AC 4	H-4	Ref 2	151,3		
AC 5	A-5	Ref 1	36		
AC 5	B-5	Well 1	33,1		
AC 5	C-5	Well 2	30,4		
AC 5	D-5	Well 3	27		
AC 5	E-5	Well 4	27,9		
AC 5	F-5	Well 5	19,1		
AC 5	G-5	Well 6	11,1		
AC 5	H-5	Ref 2	41,2		

Abb. 42: Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem Brain Absorption Kit – raw data (Screenshot)

5.6 Transil- Ergebnisse: AGP Binding Kit

TransilXL AGP Binding Kit
Version 2 Revision 00

required input

optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number:

FIQT

Date:

Dec. 2015

Assay volume AGP:

240,0 µl

AGP concentration:

30,0 µM

α:

1,50

Quality Control Parameters

Saturation Threshold

99,9%

compound bound

Outlier Threshold

1,5

standard deviations

Threshold for outlier detection

0,98

r²

Max difference of references:

30%

MS saturation threshold

100000000

maximum detectable K_d

0,0014

model choice threshold

0,8

r²

	Compound name	sample volume [µL]	stock conc. [µM]	K _d AGP	fb	r ²	TQI ¹
No 1	AC 1	15,0 µl	80,0 µM	4,86E-05	29,2%	± 0,05	0,9667
No 2	AC 2	15,0 µl	80,0 µM	1,31E-04	13,3%	± 0,03	0,9142
No 3	AC 3	15,0 µl	80,0 µM	6,66E-06	75,0%	± 0,01	0,9968
No 4	AC 4	15,0 µl	80,0 µM	1,40E-06	93,5%	± 0,01	0,9561
No 5	AC 5	15,0 µl	80,0 µM	3,77E-06	84,1%	± 0,03	0,9656
No 6		15,0 µl	80,0 µM				
No 7		15,0 µl	80,0 µM				
No 8		15,0 µl	80,0 µM				
No 9		15,0 µl	80,0 µM				
No 10		15,0 µl	80,0 µM				
No 11		15,0 µl	80,0 µM				
No 12		15,0 µl	80,0 µM				

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

ID	Compound name	K _d HSA	fu*
No 1	AC 1	2,74E-06	0,5%
No 2	AC 2	2,32E-05	3,8%
No 3	AC 3	4,57E-05	3,6%
No 4	AC 4	6,78E-05	4,2%
No 5	AC 5	5,49E-05	5,9%
No 6			
No 7			
No 8			
No 9			
No 10			
No 11			
No 12			

Model Parameters

maximum detectable K_d: > 0,0014

fb HSA max: < 29,6%

fb AGP max: < 1,4%

1. Plasma protein binding

Physiological HSA conc.: 5,88E-04

Physiological AGP conc.: 2,00E-05

fb max: < 30,3%

fu min: < 69,7%

Abb.: 43 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des AGP Binding Kits (Screenshot)

Diskussion der Ergebnisse des AGP-Binding Kit:

Beim Test mit dem AGP Binding Kit zeigte sich eine sehr hohe Bindungsrate von 93,5 % der Substanz AC 4 , eine ebenfalls hohe Bindungsraten von AC 5 mit 84,1 % und AC 3 mit 75 %,

Die Substanz AC 1 hatte nur eine mittelmäßige Bindungsrate von 29,2 %

Die mit Abstand niedrigste Bindungsrate wurde bei AC 2 festgestellt mit einem Wert von 13,3 %

Der ungebundene Anteil lag bei AC 3 und AC 5 mit 5,9 % am höchsten, mit 4,2 % lagen auch AC 4 und AC 2 in diesem Bereich. Lediglich AC 1 wies einen ungebundenen Anteil von nur 0,5 % auf.

Der TQI war bei allen Messungen in einem guten Bereich, wobei AC 4 mit 7,6 den niedrigsten Score erreichte, AC 5 und AC 6 mit hatten mit 8,3 und 8,4 noch höhere Werte und AC 2 und AC 3 erzielten einen Score von 9,4 und 9,6.

schon gute Qualität der Analyse

Anhand der raw data Tabelle zeigt sich, dass die Werte trotz des eigentlich guten Ergebnisses nicht immer so gut zueinander passen. So liefert die Analyse von Substanz AC 1 im Well 2 und im Well 5 widersprüchliche Werte. Beide Werte sind höher als die von Wells in denen eine geringere Proteinkonzentration vorhanden war. Gründe für Ausreißer dieser Art könnten zum Beispiel sein, dass Pipettierfehler passiert sind. Auch bei AC 2 und AC 5 gab es je einen Wert, der inkonsistent war. Wenn ein einzelner Wert nicht zu den anderen passt wird dieser nicht in die weitere Kalkulation miteinbezogen, da der Sinn der Analyse darin liegt möglichst valide Daten zu liefern.

5.7 Transil- Ergebnisse: HSA Binding Kit

Transil^{XL} HSA Binding Kit
Version 2 Revision 00

required input

optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number:	HJQT
Date:	Mar. 2015
Assay volume HSA:	240,0 µl
HSA concentration:	140,0 µM
α:	1,80

Quality Control Parameters

Saturation Threshold	99,9% compound bound
Outlier Threshold	1,5 standard deviations
Threshold for outlier detection	0,98 r^2
Max difference of references:	30%
MS saturation threshold	100000000
maximum detectable K_d	0,0014
model choice threshold	0,8 r^2

	Compound name	sample volume [µL]	stock conc. [µM]	K_d HSA	fb	r^2	TQI ¹
		15,0 µl	80,0 µM				
No 1	AC 1	15,0 µl	80,0 µM	2,74E-06	99,5% ± 0,00	0,9958	8,7
No 2	AC 2	15,0 µl	80,0 µM	2,32E-05	96,2% ± 0,00	0,9840	9,4
No 3	AC 3	15,0 µl	80,0 µM	4,57E-05	92,8% ± 0,00	0,9968	9,7
No 4	AC 4	15,0 µl	80,0 µM	6,78E-05	89,7% ± 0,01	0,9906	9,5
No 5	AC 5	15,0 µl	80,0 µM	5,49E-05	91,5% ± 0,01	0,8646	8,2
No 6							
No 7							
No 8							
No 9							
No 10							
No 11							
No 12							

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

ID	Compound name	K_d AGP	fu*
No 1	AC 1	4,86E-05	0,5%
No 2	AC 2	1,31E-04	3,8%
No 3	AC 3	6,66E-06	5,9%
No 4	AC 4	1,40E-06	4,2%
No 5	AC 5	3,77E-06	5,9%
No 6			
No 7			
No 8			
No 9			
No 10			
No 11			
No 12			

Model Parameters

maximum detectable K_d :	> 0,0014
fb HSA max:	< 29,6%
fb AGP max:	< 1,4%
1. Plasma protein binding	
Physiological HSA conc:	5,88E-04
fb max:	< 30,3%
Physiological AGP conc:	2,00E-05
fu min:	< 69,7%

Abb.: 44 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des HSA Binding Kits (Screenshot)

Diskussion der Ergebnisse des HSA Binding Kit:

Bei der Analyse mit dem HSA Binding Kit zeigte sich, dass alle fünf compounds starke Affinität zu HSA aufweisen. AC 1 hat mit einer Bindungsrate von 99,5 % den höchsten Wert und auch AC 2 zeigt mit 96,2 % hohe Affinität zu HSA. Etwas niedriger aber trotzdem hohe Werte ergeben sich auch für AC 3 mit 92,8 %, AC 4 mit 89,7 % sowie AC 5 mit 91,5 %

In dieser Analyse erreichte wiederum Substanz AC 3 mit einem TQI von 9,7 den höchsten Score im Vergleich. Aber auch die Qualität der anderen Substanzen war sehr gut, denn den niedrigsten Wert im Vergleich lieferte AC 5 mit einem Wert von 8,2. AC 1 lag noch etwas besser mit 8,7 und AC 2 und AC 4 konnten einen Wert von 9,4 und 9,5 erreichen.

Anhand der raw data Tabelle ergab sich nur für AC 4 und AC 5 jeweils ein Wert, der nicht zu den anderen passte.

5.8 Transil Analyse Ergebnisse: PPB Binding Kit

Transil^{XL} PPB Binding Kit
Version 2 Revision 0

required input

optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number:

Oct. 2015

Date:

240,0 µl

Assay volume:

140,0 µM

HSA + AGP concentration:

1,80

φ:

Quality Control Parameters

Saturation Threshold

99,9% compound bound

Outlier Threshold

1,5 standard deviations

Threshold for outlier detection

0,98 r^2

Max difference of references:

30%

MS saturation threshold

100000000

model choice threshold

0,8000 r^2

	Compound name	sample volume [µL]	stock conc. [µM]	k_D	fb		r^2	TQI ¹
		15,0 µl	80,0 µM					
No 1	AC 1	15,0 µl	80,0 µM	1,15E-06	99,8%	± 0,04%	0,9805	7,4
No 2	AC 2	15,0 µl	80,0 µM	1,86E-05	97,1%	± 0,13%	0,9963	9,7
No 3	AC 3	15,0 µl	80,0 µM	2,59E-05	95,9%	± 0,19%	0,9964	9,6
No 4	AC 4	15,0 µl	80,0 µM	2,18E-05	96,6%	± 0,20%	0,9945	9,6
No 5	AC 5	15,0 µl	80,0 µM	2,59E-05	95,9%	± 0,41%	0,9881	8,6
No 6								
No 7								
No 8								
No 9								
No 10								
No 11								
No 12								

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

Model Parameters

1. Plasma protein binding

Physiological HSA conc. 5,88E-04

Physiological AGP conc. 2,45E-05

Abb.: 45 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des PPB Binding Kits (Screenshot)

Diskussion der Ergebnisse des PPB-Binding Kit:

Die Ergebnisse des Versuchs mit dem Plasmaproteinbindungskit zeigen, dass von den fünf getesteten Substanzen AC 1 fast vollständig an die beiden Plasmaproteine AGP und HSA gebunden wird. Bei ihr wird einen Anteil von 99,8 % an die Proteine des PPB-Kits gebunden. Die Güte dieser Analyse war zwar gut mit einem Wert von 7,4 bleibt aber hinter den TQI Werten der Analysen der anderen Kandidaten zurück. AC 5 konnte einen Wert von 8,6 des Quality Index erreichen, während AC 2, AC 3 und AC 4 mit Werten von 9,6 und 9,7 eine besonders hohe Analysequalität zeigten. Die ungebundene Fraktion war bei AC 3 und AC 5 mit je 4,1 % am größten. Bei AC 4 ergab sich ein frei zur Verfügung stehender Anteil von 2,9 % und bei AC 2 wurden 3,4 % wirksamer Anteil errechnet.

Bei den rohen Daten der PPB Analyse lässt sich feststellen, dass bei AC 2, AC 3 und AC 5 je ein Ausreißer unter den Werten befunden hat, bei AC 1 waren sogar 2 widersprüchliche Werte im Ergebnis. Einzig AC 4 hatte nur passende Ergebniswerte. Die Plasmaproteinbindung war insgesamt gesehen bei allen recht hoch, was mit der Lipophilie des Anthrachinongrundgerüsts aller Substanzen zu begründen ist.

Die größten Differenzen ergaben sich in der AGP Bindung, wo der gebundene Anteil des stark affinen AC 4 mehr als sechsmal so groß war, wie jener von AC 2 mit der geringsten Affinität. Die höchsten Bindungsaffinitäten in der Plasmaproteinbindung weist AC 1 auf, sowohl bei dem PPB Kit, als auch beim HSA Kit mit jeweils über 99,5% gebundenem Anteil.

Der TQI Wert aller drei Plasmaproteinanalysen lag im guten Bereich, wobei die im Vergleich schlechtesten Werte mit 7,4 bei PPB von AC 1 und mit 7,6 von AC 4 bei AGP erzielt wurden.

5.9 Transil Analyse Ergebnisse: Microsomal Binding Kit

Transil^{XL} Microsomal Binding Kit
Version 2 Revision 00

required input

optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number: QTWX
Date: Mar. 2015
Assay volume LB: 240,0 µl
Lipid content: 1,00 µl
γ: 1,80

Quality Control Parameters

Saturation Threshold 99,9% compound bound
Outlier Threshold 1,5 standard deviations
Threshold for outlier detection 0,98 r²
Max difference of references: 30%
MS saturation threshold 100000000
model choice threshold 0,8 r²

Compound name		sample volume [µL]	stock conc. [µM]	logMA _{mic}		r ²	TQI ¹
		15,0 µl	80,0 µM				
No 1	AC 1	15,0 µl	80,0 µM	3,85	± 0,15	0,9964	6,5
No 2	AC 2	15,0 µl	80,0 µM	2,30	± 0,02	0,9999	8,9
No 3	AC 3	15,0 µl	80,0 µM	3,13	± 0,04	0,9854	8,4
No 4	AC 4	15,0 µl	80,0 µM	1,98	± 0,09	0,9840	9,4
No 5	AC 5	15,0 µl	80,0 µM	3,58	± 0,01	0,9982	8,6
No 6							
No 7							
No 8							
No 9							
No 10							
No 11							
No 12							

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

ID	test article	fu _{mic} (0,5 mg/ml)
1	AC 1	32,9%
2	AC 2	94,5%
3	AC 3	71,7%
4	AC 4	97,3%
5	AC 5	47,8%
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		

C_{microsomal protein} 0,5 mg/ml

Model Parameters (fu_{mic})

C_{lipid}/C_{protein} 0,581 µl/mg
V_{lipid} 0,29 µl
V_{total assay} 1000,0 µl

Abb.: 46 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des Microsomal Binding Kits (Screenshot)

Diskussion der Ergebnisse des Microsomal-Binding Kit:

Die Bindung an Lebermikrosomen war bei allen 5 Testsubstanzen nicht hoch, aber zumindest bei vier Substanzen hoch genug, um korrekte Ergebnisse zu liefern. Einzig AC 4 lag mit einem Wert von 1,98 für die Membranaffinität knapp unter dem nötigen Wert von 2 für valide Messergebnisse. Im Gegensatz zur intestinalen Absorption konnte die Gewebefixierung an Lebermikrosomen bei AC 2 akkurat ermittelt werden. Die Membranaffinität von AC 1, AC 3 und AC 5 lag mit Werten zwischen 3,13 und 3,85 in einem niedrigen Bereich. Der freie Anteil an Wirkstoff in Gegenwart von Lebermikrosomen war sehr unterschiedlich von 32,9% bei AC 1 bis zu 97,3 % bei AC 4. Wenn dieser Wert aufgrund der zu niedrigen Affinität nicht gewertet würde wäre AC 2 jene Substanz deren freier Anteil mit 94,5 % ebenfalls sehr hoch ist. Der freie Anteil von AC 1 war am niedrigsten mit 32,9 %, bei AC 5 konnten zumindest immerhin noch 47,8 % freier Anteil ermittelt werden. Unerwartet war, dass Substanz AC 3 trotz eines logMA Wertes von 3,13 einen freien Anteil von 71,4 % zeigte.

Der schlechteste TQI aller Versuche wurde bei AC 1 bei der mikrosomalen Bindung erzielt. Die Werte in raw data Tabelle zeigen eindeutig, dass hier ein Pipettierfehler passiert sein muss, da der Wert von Well 5 mit der zweithöchsten Proteinkonzentration viel zu hoch ist, sogar höher, als jener von Well 2, der von den proteinhaltigen Wells die zweitgeringste Konzentration enthalten hat. Die anderen Werte der Analyse würden zusammenpassen, aber dieser massive Ausreißer sorgt für den nur mittleren TQI von 6,5 der im Vergleich mit allen anderen Analysen der schlechteste Wert war, der erzielt wurde.

5.10 Transil Analyse Ergebnisse: Intestinal Absorption Kit

Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit
Version 2.00

required input

optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number:
Date:
Assay volume IA:
Lipid content:
γ:

Quality Control Parameters

Saturation Threshold	99,9% compound bound
Outlier Threshold	1,5 standard deviations
Threshold for outlier detection	0,98 r ²
Max difference of references:	30%
MS saturation threshold	100000000
model choice threshold	0,8 r ²

	Compound name	sample		stock conc. [µM]	logMA		r ²	TQI ¹
		volume [µL]	15,0 µl		80,0 µM			
No 1	AC 1	15,0 µl	80,0 µM	3,04	± 0,04	0,9889	9,3	
No 2	AC 2	15,0 µl	80,0 µM	1,75	± 0,06	0,9926	9,7	
No 3	AC 3	15,0 µl	80,0 µM	3,18	± 0,02	0,9986	8,8	
No 4	AC 4	15,0 µl	80,0 µM	1,90	± 0,09	0,9004	9,5	
No 5	AC 5	15,0 µl	80,0 µM	3,01	± 0,21	0,9488	8,6	
No 6								
No 7								
No 8								
No 9								
No 10								
No 11								
No 12								

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

Intestinal Permeability Coefficient
Please enter the molecular weight and number of halogen atoms of the parent molecule (without counterions)

Compound name	MW parent molecule; without counterion	Number of atoms				MW _{eff}	Predicted P _{int} [cm/sec]
		Fluorine	Chlorine	Bromine	Iodine		
No 1	AC 1	274,00				274	2,21E-05
No 2	AC 2	389,00				389	1,61E-06
No 3	AC 3	439,00				439	1,13E-05
No 4	AC 4	374,00				374	2,55E-06
No 5	AC 5	514,00				514	6,09E-06
No 6							
No 7							
No 8							
No 9							
No 10							
No 11							
No 12							

Volume of Distribution

plasma protein binding data e.g. from TRANSIL HSA and AGP Binding experiments			logK ^{B/F}	Predicted VD [L/kg]
K _D ^{HSA} [mol/L]	K _D ^{AGP} [mol/L]	free fraction f _u		
2,74E-06	4,86E-05	0,5%	2,33	0,91909
2,32E-05	1,31E-04	3,8%	1,41	0,39629
4,57E-05	6,66E-06	5,9%	1,20	2,62584
3,18E-06	2,66E-04	0,5%	2,27	0,24100
5,49E-05	3,77E-06	5,9%	1,20	2,14153

Model Parameters

1. Vss
logMA A 0,5255
logK^{B/F} B -0,3403
constant const -0,8425

2. Pint
A 7440
B 1,0E+07
C 2,5E-07
D 202
α 0,6
β 4,395
γ 16

Plasma Parameters
Physiological HSA conc. 5,88E-04
Physiological AGP conc. 2,00E-05

Abb.: 47 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des Intestinal Absorption Kits (Screenshot)

Diskussion der Ergebnisse des Intestinal Absorption Kit:

Die Analyse der Affinität zu intestinalen Membranen ergab bei AC 2 und AC 4 keine validen Werte, ihr Ergebnis für den logMA lag jeweils unter der für akkurate Ergebnisse nötigen Grenze von 2.

Die Ergebnisse der anderen compounds ergaben ebenfalls keine hohen Affinitäten, aber die Ergebnisse waren zumindest hoch genug um genaue Ergebnisse zu liefern. Die Membranaffinitäten von AC 1, AC 3 und AC 5 lagen mit Werten knapp über 3 im niedrigen Bereich.

Die Ermittlung des Permeabilitätskoeffizienten zeigte, dass die Bioverfügbarkeit der getesteten Substanzen sehr unterschiedlich ist. AC 1 lieferte mit Abstand die höchsten Werte mit 22,10, und auch die Bioverfügbarkeit von AC 3 mit einem Wert von 11,3 sowie jene von AC 5 mit einem Wert für Pint von 6,09 ist als gut einzustufen, da ein Wert von über 10 einer Bioverfügbarkeit von über 90% entspricht. AC 2 und AC 4 zeigten sehr niedrige Werte von nur 1,61 und 2,55 und sind im Vergleich schlecht bioverfügbar.

Durch die Kombination der Ergebnisse des Intestinalen Bindungskits sowie der Plasmaproteinbindung konnte auch das scheinbare Verteilungsvolumen der Testsubstanzen berechnet werden. Dabei ergaben sich für AC 3 und AC 5 hohe Werte von 2,63 bzw 2,14 was zeigt, dass diese Substanzen stark verteilt werden. AC 1 weist im Vergleich ein mittleres Verteilungsvolumen von 0,92 l/kg auf während AC 2 und AC 4 sich kaum verteilen mit niedrigen V_D Werten von 0,4 bei AC 2 und 0,24 bei AC4.

Der Transil Quality Index lag bei allen Analysen zur Intestinalen Bindung über 8,6 was einem sehr guten Ergebnis entspricht, AC 2 konnte sogar mit einer Güte von 9,7 analysiert werden. In den Rohdaten sieht man, dass es bei diesen Analysen keinen Wert gab der nicht zu den anderen passte und somit einen Ausreißer darstellte.

5.11 Transil Analyse Ergebnisse: Brain Absorption Kit

Transil^{XL} Brain Absorption Kit
Version 2 Revision 00

required input

optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number: ILNY
Date: Oct. 2015
Assay volume: 240,0 µl
Lipid content: 1,00 µl
γ: 1,80

Quality Control Parameters

Saturation Threshold 99,9% compound bound
Outlier Threshold 1,5 standard deviations
Threshold for outlier detection 0,98 r^2
Max difference of references: 30%
MS saturation threshold 100000000
model choice threshold 0,8 r^2

	Compound name	sample	sample	logMA _{brain}		r^2	TQI ¹
		volume [µL]	conc. [µM]				
		15,0 µl	80,0 µM				
No 1	AC 1	15,0 µl	80,0 µM	1,58	± 0,02	0,9997	8,3
No 2	AC 2	15,0 µl	80,0 µM	1,77	± 0,13	0,7269	8,2
No 3	AC 3	15,0 µl	80,0 µM	2,23	± 0,12	0,9064	8,5
No 4	AC 4	15,0 µl	80,0 µM	1,45	± 0,13	0,9486	8,4
No 5	AC 5	15,0 µl	80,0 µM	2,76	± 0,13	0,9498	9,5
No 6							
No 7							
No 8							
No 9							
No 10							
No 11							
No 12							

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

ID	test article	availability	logBB	fu Brain	logMA _{brain}	logK ^{B/F}	PSA	plasma free fraction f _u
1	AC 1	-	-	19,6%	1,6	-		
2	AC 2	-	-	12,8%	1,8	-		
3	AC 3	-	-	4,7%	2,2	-		
4	AC 4	-	-	26,0%	1,5	-		
5	AC 5	-	-	1,4%	2,8	-		
6		-	-			-		
7		-	-			-		
8		-	-			-		
9		-	-			-		
10		-	-			-		
11		-	-			-		
12		-	-			-		

Model Parameters

1. logBB

logMA_{brain} A 0,499
logK^{B/F} B -0,2445
PSA D -0,0196
constant const 0,0882

2. fu brain

fu_const 0,805359639
fu_slope -0,95860678

Plasma Parameters

Physiological HSA conc. 5,88E-04
Physiological AGP conc. 2,00E-05

Abb.: 48 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des Brain Absorption Kits (Screenshot)

Diskussion der Ergebnisse des Brain Absorption Kit:

Die Analyse der Gehirn Absorption zeigte leider nur wenig verwertbare Ergebnisse, da sowohl AC 1, als auch AC 2 und AC 4 so geringe Affinität zeigten, dass ihre Ergebnisse als nicht akkurat zu betrachten sind. Die Ergebnisse der Membranaffinität zur Blut- Hirn-Schranke von AC 3 und AC 5 sind zwar ebenfalls sehr niedrig mit Werten von 2,23 bei AC 3 und 2,76 bei AC 5, aber hoch genug um korrekte Ergebnisse zu liefern.

Der hohe freie Anteil im Gehirn von AC 4 mit 26,2%, AC 1 mit 19,6% und AC 2 mit immerhin noch 12,8% ist nicht aussagekräftig, da dies lediglich zeigt, dass diese compounds wenn sie im Gehirn vorlägen, wenig Affinität zu Gehirngewebe hätten. Der freie Anteil der auswertbaren Substanzen AC 3 und AC 5 liegt mit 4,7 % bei AC 3 vergleichsweise um ein vielfaches höher als bei AC 5 mit nur 1,5 % frei verfügbarem und damit wirksamen Anteil.

Die Qualität der Gehirnabsorptionsbestimmungen war durchwegs sehr gut, obwohl die Affinitäten sehr gering waren. Bei den nicht akkuraten Ergebnissen von AC 1, AC 2 und AC4 gab es jeweils nur einen Ausreißer, bei den verwertbaren Ergebnissen von AC 3 gab es einen etwas stärker abweichenden Datenpunkt und bei AC 5 waren alle Datenpunkte gut.

Durch eine Wiederholung der Versuche mit AC 1, AC 2 und AC 5 mit dem brain absorption low affinity compounds Testkit könnte man feststellen, ob dennoch ein geringer Teil ins Hirn penetrieren könnte, der dann dort wirken könnte.

5) Zusammenfassung

Substanz	MG (g/mol)	EW [mg]	Löslichkeit in DMSO	Stammlösung	λ Absorptionsmax.
AC 1	274	1,01	gut löslich	Farbwechsel: Gelb→Rot →Gelb	233 nm
AC 2	389	1,56	gut löslich	Schwach gelblich	265 nm
AC 3	439	1,76	gut löslich	Gelb	252 nm
AC 4	370	1,48	gut löslich	Farbwechsel: Gelb→Rot →Gelb	270nm
AC 5	530	2,12	gut löslich	Hellgelb	263nm
Linezolid	337	1,35	gut löslich	Farblos	254nm

Tab.6: Eigenschaften der neuen Anthrachinone und des Standard Linezolid

In dieser Diplomarbeit wurden mit in-vitro Transil^{XL} Testsystemen der Firma Sovicell präklinische Versuche durchgeführt, um neue Anthrachinone hinsichtlich ihrer Proteinbindung und Gewebsbindung zu charakterisieren.

Es handelt sich um Anthrachinonderivate, die aufgrund ihrer Grundstruktur lipophile Eigenschaften haben.

Während der Probenvorbereitung konnten Charakteristika der Substanzen festgestellt werden.

Die gefärbten, photosensitiven Substanzen haben sich im Molekulargewicht stark unterschieden, jedoch waren sie alle gut in DMSO löslich, was daran liegen könnte, dass sie in 100% DMSO gelöst und die Lösung anschließend mit Puffer aufgefüllt wurde .

Bei AC 1 und AC 4 konnte eine ungewöhnliche Farbveränderung während des schrittweise Auffüllens mit Pufferlösung beobachtet werden, die allerdings wieder zurückging sobald mehr Pufferlösung zugesetzt wurde.

Die Absorptionsmaxima waren bei allen Testsubstanzen im Bereich von 230-270nm.

	AC 1	AC 2	AC 3	AC 4	AC 5	Linezolid
f_b HSA	99,5%	96,2%	92,8%	89,7%	91,5%	12,90%
f_u HSA	0,5%	3,8%	5,9%	4,2%	5,9%	< 59,8 %
TQI HSA	8,7	9,4	9,7	9,5	8,2	7,9
f_b AGP	29,2%	13,3%	75,0%	93,5%	84,1%	20,10%
f_u AGP	0,5%	3,8%	5,9%	4,2%	5,9%	59,80%
TQI AGP	8,3	9,4	9,6	7,6	8,4	8,2
f_b PPB	99,8%	97,1%	95,9%	96,6%	95,9%	37,40%
f_u PPB	0,2%	2,9%	4,1%	3,4%	4,1%	62,60%
TQI PPB	7,4	9,7	9,6	9,6	8,6	8,4
$\log MA_{INT}$	3,04	1,75	3,18	1,90	3,01	
P_{INT} [10^{-6} cm/sek]	22,10	1,61	11,30	2,55	6,09	
VD [l/kg]	0,92	0,40	2,63	0,24	2,14	
TQI INT	9,3	9,7	8,8	9,5	8,6	
$\log MA_{MIC}$	3,85	2,30	3,13	1,98	3,58	
f_u_{MIC} [0,5 mg/ml]	32,9%	94,5%	71,7%	97,3%	47,8%	
TQI MIC	6,5	8,9	8,4	9,4	8,6	
$\log MA_{BRAIN}$	1,58	1,77	2,23	1,45	2,76	
f_u_{BRAIN}	19,6%	12,8%	4,7%	26,2%	1,5%	
TQI BRAIN	8,3	8,2	8,5	8,4	9,5	

Tab. 7: Gesamtübersicht der Ergebnisse der Transil Kit Versuche

An der Gesamtübersicht in Tabelle 5 zeigt sich, dass die Qualität der Analysen, die durch den Transil Quality Index ausgewiesen wird, durchwegs sehr gut war.

Nur die Analyse der mikrosomalen Bindung von AC 1 war von mittlerer Qualität mit einem TQI von 6,5, da hier mutmaßlich durch einen Pipettierfehler ein sehr stark abweichender Wert gemessen wurde.

Mit der Ausnahme von 2 guten Werten mit einem TQI von 7,4 bzw 7,6 waren alle übrigen Analysen mit Werten über 8,2 sehr gut.

Alle fünf Testsubstanzen zeigten hohe Bindungsraten an Plasmaproteine. Die Bindung an AGP und HSA gleichzeitig (f_b PPB) sowie die Bindung an HSA (f_b HSA) waren besonders stark ausgeprägt. Die Substanzen AC 4 und AC 5 und ganz besonders AC 3 zeigen

außerdem auch hohe Affinität zu AGP. Der ungebundene Anteil überstieg bei keinem dieser Versuche 6%.

Das Testsystem wurde mit der Substanz Linezolid validiert und die Ergebnisse waren etwas höher als jene der Literatur. [25]

Mittels der Ergebnisse zur Plasmaproteinbindung konnte in Folge durch Kombination mit den Resultaten der intestinalen Absorption das Verteilungsvolumen der Substanzen bestimmt werden, wobei sich für die Substanzen AC 3 und AC 5 die höchsten Werte ergaben.

Die Versuche mit dem Microsomal Binding Kit zeigen, dass die getesteten Anthrachinonderivate generell geringe Affinität zu Lebermikrosomen aufweisen, weshalb sie stärker der Metabolisierung unterliegen.

Die Werte der Membranaffinität von AC 2 und AC 4 liegen allerdings unter den für valide Ergebnisse nötigen 2,5.

Der freie Anteil von AC 3 war überraschend hoch mit über 71 % obwohl AC 3 gute Membranaffinität aufwies.

Die Membranaffinität der Testsubstanzen zu mikrosomalen Membranen fiel besser aus, als jene bei der zu intestinalen und Gehirnmembranen.

AC 1, AC 3 und AC 5 zeigen höhere Werte bei der intestinalen Absorption, AC 2 und AC 4 liegen auch bei diesem Versuch unter der angegebenen Grenze der Membranaffinität für valide Messergebnisse.

Außerdem haben AC 1 und AC 3 sehr hohe Permeabilitätskoeffizienten, AC 5 liegt mit einem Wert von 6,9 noch im mittleren Bereich, wohingegen AC 2 und AC 4 sehr geringe Werte haben und folglich auch eine geringe Bioverfügbarkeit.

Bei dem Testkit der Gehirn Absorption liegen nur die Ergebnisse der Membranaffinität von AC 3 und AC 5 über dem Mindestwert von 2, der für eine genaue Messung nötig sind.

Der freie Anteil im Gehirn ist bei AC 3 mit 4,7 % gering, allerdings mehr als dreimal so hoch wie jener von AC 5.

6) Summary

In this diploma thesis in-vitro test kits were used to perform preclinical analysis to characterize new anthrachinones in terms of binding to plasma proteins and membranes. During the preparation for analysis some physicochemical attributes were shown. The coloured substances were photosensitive, and their solubility in DMSO was good, maybe because the substances were solved in 100% DMSO and the buffer was added bit by bit afterwards.

Two substances showed a colour change from yellow to red and back to yellow while the buffer was added.

The measured absorption maxima were between 230 and 270 nm.

The Overview shows that all measures were precise. Only one trial had an average score of 6.5 at the transil quality index, maybe that's because of a mistake during pipetting.

Except for two measures that scored "good" all the trials scored excellent in terms of TQI.

All five substances bound with high affinity rates to plasmaproteins, most to HSA combined with AGP or to HSA only.

The substances AC 4 and AC 5 and especially AC 3 showed high affinity to AGP too.

The unbound fraction was less than 6% in all plasmaprotein trials.

The Testkit was validated with Linezolid and the results were a bit higher than in literature. [25]

The volume of distribution could be calculated with the results of plasma protein binding and intestinal absorption. AC 3 and AC 5 had the highest results for volume of distribution.

Anthrachinones exhibit low affinity to microsomal membranes and so they underlie metabolism more. The results of AC 2 and AC 4 were too low for being measured accurately. The unbound fraction of AC 3 was surprisingly high, because it had good affinity to microsomal membranes too.

The affinity to microsomal membranes was higher than to intestinal and brain membranes.

AC 1, AC 3 and AC 5 showed high results on intestinal absorption assay, AC 2's and AC 4's affinity was again too low for valid results.

The intestinal permeability coefficient was high at AC 1 and AC 3 and average at AC 5.

AC 2 and AC 4 have very low results and therefore less bioavailability.

For the brain absorption kit only AC 3 and AC 5 have high enough affinity to the membranes, the unbound fraction in brain of AC 3 was low, but at least 3 times higher than of AC 5.

7) Conclusio

Durch den Einsatz von Transil^{XL} Kits schafft man die Möglichkeit auf einfache Weise und in vergleichsweise kurzer Zeit unterschiedlichste valide Daten zu ermitteln, die in der Präklinik von großer Bedeutung und wegweisend dafür sein können, ob ein Wirkstoffkandidat weiterentwickelt wird.

So bietet der Transil Kit zum Beispiel im Bereich der Wirkstoffentwicklung zentral wirksamer Arzneimittel eine Möglichkeit, im Vergleich zu herkömmlichen Methoden, wie der zerebralen Mikrodialyse, unkompliziert und mit geringem Zeit- und Ressourcenaufwand auch im Hochdurchsatz Substanzen zu ermitteln, die einerseits die Blut-Hirn Schranke überwinden können und andererseits im Gehirn nicht an Gewebe gebunden werden, sondern frei vorliegen um an Zielrezeptoren andocken zu können. Da diese beiden Eigenschaften selten in einem Molekül zu finden sind, sondern lipophile Substanzen, die die Blut-Hirn Schranke durchdringen können zumeist im Gehirn eine hohe Gewebsbindung aufweisen und nur in geringem Ausmaß frei verfügbar sind, ist hier großes Potential für den Einsatz dieser in-vitro Systeme. [14]

Die Möglichkeiten der Wirkstoffentwicklung aus den im Zuge der Diplomarbeit getesteten Substanzen sehe ich kritisch.

Die Substanzen sind lichtempfindlich und somit instabil, aufgrund ihrer Struktur sehr lipophil und binden folglich stark an Plasmaproteine.

I

Weil in der Technologie von Transil Kits aufgereinigte Proteine eingesetzt werden, deren Bindungsstellen alle verfügbar sind, wohingegen im humanen Plasma nur ein Teil der Bindungsstellen nicht abgedeckt und somit zugänglich ist, können sich im Versuch höhere Werte für die Plasmaproteinbindung ergeben, als das im humanen Plasma der Fall ist. In wie weit sich das mit dem Faktor ausgleicht, dass nur HSA und AGP im PPB Kit vermessen und dabei Bindungen andere Plasmaproteine sowie Lipoproteine vernachlässigt werden, ist nicht bekannt.

Von den analysierten Substanzen AC 1- AC 5 sind vor allem die Ergebnisse von AC 2 und AC 4 als problematisch zu sehen. Beide zeigen zu den drei getesteten Geweben so geringe Affinität, dass sie Versuche mit höher konzentrierten Kits wiederholt werden müssen um verlässliche Werte zu erhalten. Aus der geringen Membranaffinität resultiert eine starke Metabolisierung und aufgrund der geringen intestinalen Permeabilitationskoeffizienten der beiden Substanzen ergibt sich zusätzlich eine geringe Bioverfügbarkeit.

AC 1 ist fast vollständig an Plasmaproteine gebunden, weshalb sich durch verringerte Elimination ein Depoteffekt einstellen kann, und hat einen hohen P_{int} Wert, woraus sich eine hohe Bioverfügbarkeit ergibt. Durch diese Kombination könnte es in weiterer Folge zu Problemen in der Dosierungsfindung kommen. Ebenso sollte die Messung der Penetration der Blut-Hirn Schranke bei AC 1 mit dem Brain Absorption Kit low affinity compounds wiederholt werden, da sich wie bei AC 2 und AC 4 auch hier die mit der bisherigen Messung erhaltenen Werte nur wenig von jenen der Referenzen unterschieden haben.

AC 3 und AC 5 sind, wie die übrigen Testsubstanzen, stark an Plasmaproteine gebunden, weisen eine gewisse Membranaffinität zu allen drei getesteten Geweben auf und sind aufgrund der hohen P_{int} Werte gut bioverfügbar.

Beide Substanzen hatten ausreichend hohe Werte um die Gehirnabsorption valide auszuwerten, jedoch wies nur AC 3 mit einem freien Anteil von 4,7 % akzeptable Werte auf, offensichtlich bindet AC 5 stärker an Gehirngewebe und ist nur zu knapp über 1 % frei verfügbar. Damit bestätigt sich auch, dass jene Moleküle, die die Blut-Hirn- Schranke überwinden können zumeist nur zu geringen Anteilen frei verfügbar im Gehirn vorliegen. Obwohl AC 3 und AC 5 jene Substanzen mit dem höchsten Molekulargewicht in der Testreihe waren und beide eine hohe Plasmaproteinbindung aufweisen ergab sich für diese Substanzen ein hoher V_D Wert. Die Problematik in einem hohen scheinbaren Verteilungsvolumen liegt jedoch darin, dass durch die starke Verteilung die auch ins Fettgewebe erfolgt höheren Dosen verabreicht werden müssen um notwendige Plasmaspiegel zu erreichen.

Um weitere Aussagen über die Substanzen treffen zu können müssten noch weitere ergänzende Tests zur Pharmakokinetik erfolgen.

8) Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Henderson Hasselbalch-Gleichung [J. Wilthner, Zeichenprogramm]	2
Abb. 2: Formel für Verteilungskoeffizient P [J. Wilthner, Zeichenprogramm]	2
Abb. 3: Transportprozesse Blut-Hirn Schranke [DAZ 2012, Nr. 8, S. 62 , 23.02.2012]	5
Abb. 4: Allgemeine Struktur der neuen Anthrachinone [J. Wilthner, Zeichenprogramm]	6
Abb. 5: Glucofrangulin A [Hänsel, R.; et al. (1999). Pharmakognosie, Springer-Verlag]	7
Abb. 6: Reaktionsgefäße (Wells) einer Transil-Testkit Reihe [Foto: J.Wilthner]	10
Abb. 7: Transil ^{XL} -Testkit Reihen mit Decapper [Foto: J.Wilthner]	10
Abb. 8: Analysenwaage: Sartorius H110 [Foto: J.Wilthner]	11
Abb. 9: Galaxy 16 DH Zentrifuge [Foto: J.Wilthner]	11
Abb. 10: Plattenschüttler: MixMate [Foto: J.Wilthner]	12
Abb. 11: Vortex Mini-Shaker [Foto: J.Wilthner]	12
Abb. 12: VWR Hitachi Chromaster HPLC Anlage [Foto: J.Wilthner]	12
Abb. 13: Farbwechsel bei Hst. der Stammlösung AC 1 durch Zugabe v PBS [Foto: J.Wilthner]	14
Abb. 14: Farbwechsel bei Hst. der Stammlösung AC 4 durch Zugabe v PBS [Foto: J.Wilthner]	14
Abb. 15: Stammlösungen: frisch bereitet, gelb gefärbt [Foto: J.Wilthner]	15
Abb. 16: Entfärbung der Stammlösung von AC 3 [Foto: J.Wilthner]	15
Abb.17: UV Vis Spektrometer UV-1800 [Foto: J.Wilthner]	16
Abb.18: Kolbenhubpipette, Transil-Platte und Öffner [Foto: J.Wilthner]	17
Abb. 19: Inkubation am Mix-Mate Plattenschüttler [Foto: J.Wilthner]	18
Abb. 20: HPLC Vials (Fläschchen) [Foto: J.Wilthner]	19
Abb 21: Screenshot der Hauptseite der Arbeitsmappe	21
Abb. 22: Screenshot des raw Data-Arbeitsblattes	22
Abb. 23: Diagramm MA-Estimation (Screenshot) [Analyseauswertungen, Mikrosomal Binding Kit]	23
Abb. 24: Diagramm K _D -Estimation (Screenshot) [Analyseauswertungen, HSA Binding Kit]	23
Abb. 25: Diagramm Reference Check (Screenshot) [Analyseauswertungen, Mikrosomal Binding Kit]	24
Abb. 26: Diagramm Vergleich Signale und Referenzen (Screenshot)	24
Abb. 27: Formel für die Berechnung der Dissoziationskonstante K _D [J.Wilthner, Zeichenprogramm]	25
Abb. 28: Formel für die Berechnung der Konzentration an freiem Anteil [A] [J.Wilthner, Zeichenprogramm]	25
Abb. 29: Formel für die Berechnung des gebundenen Anteils f _b [J.Wilthner, Zeichenprogramm]	25
Abb. 30: Formel für die Berechnung der Membranaffinität MA [J.Wilthner, Zeichenprogramm]	26
Abb. 31: Formel der Massenbilanz [J.Wilthner, Zeichenprogramm]	26
Abb. 32: Formel für die Berechnung des freien Wirkstoffanteils f _u [J.Wilthner, Zeichenprogramm]	26
Abb. 33: Formel für die Berechnung der intrinsischen Clearance Cl _{int} [J.Wilthner, Zeichenprogramm]	27

Abb. 34: Formel für die Berechnung des scheinbaren Verteilungsvolumens V_D [J.Wilthaner, Zeichenprogramm]	27
Abb. 35: Formel für die Berechnung des freien Wirkstoffanteils im Gehirn $f_{u,brain}$ [J.Wilthaner, Zeichenprogramm]	27
Abb. 36: Exemplarische Darstellung eines UV/VIS Spektrogramms am Bsp von AC 3 (Foto: J. Wilthaner)	30
Abb. 37 Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem AGP Binding Kit – raw data (Screenshot)	45
Abb.: 38 Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem HSA Binding Kit – raw data (Screenshot)	46
Abb.: 39 Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem PPB Binding Kit – raw data (Screenshot)	47
Abb.: 40 Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem Microsomal Binding Kit – raw data (Screenshot)	48
Abb.: 41 Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem Intestinal Absorption Kit – raw data (Screenshot)	49
Abb.: 42 Übersicht der Rohdaten der Analyse mit dem Brain Absorption Kit – raw data (Screenshot)	50
Abb.: 43 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des AGP Binding Kits (Screenshot)	51
Abb.: 44 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des HSA Binding Kits (Screenshot)	53
Abb.: 45 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des PPB Binding Kits (Screenshot)	55
Abb.: 46 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des Microsomal Binding Kits (Screenshot)	57
Abb.: 47 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des Intestinal Absorption Kits (Screenshot)	59
Abb.: 48 Main Page: Übersicht der Ergebnisse des Brain Absorption Kits (Screenshot)	61

9.) Literaturverzeichnis

- [1] Freissmuth, M.; et al (2016). Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie, Springer-Verlag, 2. Auflage 6: 71-74.
- [2] Kreyher, V. (2001). Gesundheits- und Medizinmarketing, R.v.Decker's Verlag, 2: 97-98
- [3] Sovicell GmbH (2012). User Guide Transil^{XL} Microsomal Bindung Kit, Version 2.00
- [4] Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K.; (2013). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevir, Urban & Fischer Verlag, 11. Auflage 1 36-37, 45- 46
- [5] Schunack, W.; Mayer, K.; Haake, M. (1981). Arzneistoffe, Springer-Verlag, 1: 13-15
- [6] Fricker, G.; Langguth, P., Wunderli-Allenspach, H. (2004). Biopharmazie, Wiley-vch Verlag, 5.1: 3-5
- [7] Hallbach, J. (2011). Klinische Chemie und Hämatologie, Georg Thieme Verlag, 3. Auflage, 21: 311
- [8] Reichl, F.-X.; Mohr, K.; Hein, L.; Hickel, R. (2007). Atlas der Pharmakologie und Toxikologie für Zahnmediziner, Georg Thieme Verlag, 1: 36
- [9] Roewer, N.; Thiel, H. (2014). Anästhesiologische Pharmakotherapie, Georg Thieme Verlag, 3. Auflage, 1: 38-39
- [10] Obach, R. S.; Baxter, J. G.; Liston, Th. E.; Silber, B. M.; Jones, B. C.; Macintyre, F.; Rance, D. J.; Wastall, Ph.; (1997). The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data, J Pharmacol Exp Ther. 283(1):46-58.
- [11] Obach, R. S. (1999). Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. Drug Metab Dispos. 27(11):1350-1359
- [12] Sovicell GmbH (2012). User Guide Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit, Version 2.00
- [13] Alavijeh, M.S.; Qaiser, M.Z. and Palmer, A.M. (2005). Drug Metabolism and Pharmacokinetics, the Blood Brain Barrier, and Central Nervous System Drug Discovery. NeuroRX, 2:554-571
- [14] Teresaki, T. and Pardridge, W.M. (2000). Targeted drug delivery to the brain. Journal of Drug Targeting, 8:353-355
- [15] Maurer T.S.; DeBartolo, D.B., Tess, D.A. and Scott, D.O. (2005). Relationship between exposure and non specific binding of thirty-three central nervous system drugs in mice. Drug Metabolism and Disposition, 33:175-181
- [16] Summerfield, S.G.; Read, K.; Begley, D.J.; Obradovic, T.; Hidalgo, I.J.; Coggon, S.; Lewis, A.V.; Porter, R.A. and Jeffrey, P. (2007). Central nervous system drug disposition: the relationship between in situ brain permeability and brain free fraction. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 322:205-213

- [17] Summerfield, S.G.; Stevens, A.J.; Cutler, L.; del Carmen Osuna, M.; Hammond, B.; Tang, S-P.; Hersey, A.; Spalding, D.J. and Jeffrey, P. (2006). Improving the in vitro prediction of in vivo central nervous system penetration: integrating permeability, P-glykoprotein efflux, and free fractions in blood and brain. *J. Pharmacol Exp Ther* 316:1282-1290
- [18] Lui, X.; Chen, C. and Smith, B.J. (2008). Progress in brain penetration evaluation in drug discovery and development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325:349-356
- [19] Teuscher, E.; Melzig, M.; Lindequist, U. (2012). *Biogene Arzneimittel, Wissenschaftliche Buchgesellschaft*, 7. Auflage, 26:1191-1194
- [20] Sovicell GmbH (2012). User Guide Transil^{XL} HSA Binding Kit, Version 2.00
- [21] A physiological model for the estimation of the fraction dose absorbed in humans, Willmann, S.; Schmitt, W.; Keldenich, J.; Dressmann, J.B.; 2004 *Journal of Medicinal Chemistry* 47(16): 4022-4031
- [22] Sovicell GmbH (2012). User Guide Transil^{XL} Brain Absorption Kit, Version 2.01
- [24] Sovicell GmbH (2012). User Guide Transil^{XL} PPB Binding Kit, Version 2.00
- [25] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00601> , Zugriff am 02.01.2017

10.) Tabellenverzeichnis

Tab. 1.: Verwendete Chemikalien bzw. Reagenzien und Hersteller	Seite 9
Tab. 2: Allgemeine Laborgeräte geordnet nach dem jeweiligen Hersteller	Seite 11
Tab. 3: Technische Daten der VWR Hitachi Chromaster HPLC Anlage	Seite 12
Tab. 4.: Eigenschaften Testsubstanzen AC 1- AC 5 und des Standards Linezolid	Seite 29
Tab. 5: Absorptionsmaxima der Prüfsubstanzen und des Standards Linezolid	Seite 31
Tab. 6: Charakteristika der neuen Anthrachinone und des Standard Linezolid	Seite 63
Tab. 7: Ergebnisse der Analysen mit den Transil Kits	Seite 64