

Dissertation

Bioanalytische Evaluierung neuartiger HIV- Proteaseinhibitoren als MDR-Modulatoren:

In situ und *in vitro* Studien

Martin Richter



Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008745

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008745>]

Bioanalytische Evaluierung neuartiger HIV- Proteaseinhibitoren als MDR-Modulatoren:

In situ und *in vitro* Studien



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Martin Richter

geboren am 23. September 1975 in Halle/Saale

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. habil. Andreas Hilgeroth
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Andreas Langner
3. PD Dr. rer. nat. habil. Hermann Lage

Halle/Saale, 25.05. 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008745

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008745>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	IX
1. Einleitung	I
2. Grundlagen	3
2.1. Resistenzen	3
2.1.1. Genetische Resistenz	3
2.1.2. HIV und viruseigene Resistenz	4
2.1.3. Ausbildung von Resistenz durch Veränderung der Membranfunktion	7
2.2. Multidrug-Resistance (MDR)	8
2.2.1. Transporter	9
2.2.2. Die Superfamilie der ABC-Transporter	9
2.2.3. P-Glykoprotein (P-gp)	12
2.2.4. Das Multidrug-resistance-associated-Protein (MRP)	17
2.3. MDR-Modulatoren	21
2.3.1. P-gp (MDR1)-Modulatoren	23
2.3.2. Modulatoren des MRP	27
2.4. Die Rolle von Membrantransportern im Intestinalepithel	27
2.5. HIV-Proteaseinhibitoren	30
2.5.1. Dimere 4-Aryl-1,4-Dihydropyridine	31
3. Zielstellung	33
4. Ergebnisse und Diskussion	35
4.1. P-gp Affinitätsstudien verschiedener HIV-Proteaseinhibitoren als potenzielle MDR-Modulatoren <i>in vitro</i>	35
4.1.1. Radioliganden-Bindungsassay	35

4.1.2.	<i>In-vitro</i> Zellversuche zur Überwindung der MDR am P-gp Transporter	37
4.1.2.1.	Untersuchungen zur P-gp Transporteraffinität an Mouse-T-Lymphoma Zellen	38
4.1.2.2.	MTT (Methyltetrazolium)-Test	38
4.1.2.3.	Fluorescence-Uptake-Assay zur Überwindung der MDR in P-gp exprimierenden Tumor-Zellen	41
4.1.3.	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	46
4.1.4.	Checkerboard-Studien (Epirubicin-Synergismus-Test)	55
4.1.5.	<i>In-vitro</i> Zellversuche an MDA-MB-231 (HTB-26) Zellen zur Überwindung der MDR an MRP-Transportern	59
4.2.	P-gp Affinitätsstudien verschiedener HIV-Protease-Inhibitoren als potenzielle MDR Modulatoren <i>in situ</i>	60
4.2.1.	<i>In situ</i> Perfusionsstudien	60
4.2.1.1.	Targeting der Membran-Efflux-Pumpe P-gp	60
4.2.1.2.	IC50-Werte der P-gp Hemmung	64
4.2.1.3.	Targeting der MRP-Transporter	65
4.3.	Testung auf Substrateigenschaften des dimeren 1,4-Dihydropyridins H17 (2)	66
4.3.1.	Testung auf Substrateigenschaft am P-gp	67
4.3.2.	Testung auf Substrateigenschaft am MRP	69
4.4.	Aussagefähigkeit von <i>in vitro</i> und <i>in situ</i> -Studien	71
5.	Materialien und Methoden	73
5.1.	Radioliganden-Bindungsassay	73
5.1.1.	Chemikalien und Geräte	73
5.1.1.1.	Chemikalien	73
5.1.1.2.	Geräte	74
5.1.2.	Bindungsassay und Caco-2-Zellpräparation	75
5.1.3.	Berechnung der IC50-Werte	76
5.2.	Untersuchungen zur P-gp Transporteraffinität an Mouse-T-Lymphoma-Zellen	76
5.2.1.	Mouse-T-Lymphoma-Zellpräparation	76
5.2.2.	Zytotoxizitätstests	77
5.2.2.1.	Chemikalien und Geräte	77

5.2.2.1.1.	Chemikalien	77
5.2.2.1.2.	Geräte	81
5.2.2.2.	Durchführung des Zytotoxizitätstestests (MTT-Assay)	81
5.2.3.	Checkerboard-Studien (Epirubicin-Synergismus-Test)	83
5.2.4.	Fluorescence-Uptake-Assay zur Überwindung der MDR in P-gp exprimierenden Tumor-Zellen	85
5.2.4.1.	Chemikalien und Geräte	85
5.2.4.1.1.	Chemikalien	85
5.2.4.1.2.	Geräte	86
5.2.4.2.	Durchführung des Assays	86
5.2.4.3.	Berechnung der inhibitorischen-Aktivitätsverhältnisse	87
5.2.4.4.	Der Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)-Aufbau und Funktionsweise	88
5.3.	Untersuchungen zur MRP-Transporteraffinität an MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26) Zellen - Fluorescence-Uptake-Assay	91
5.3.1.	Chemikalien unterschiedlich zu Kapitel 5.2.4.1.1.	92
5.3.2.	Geräte unterschiedlich zu Kapitel 5.2.4.1.2.	92
5.4.	<i>In situ</i> Perfusionsstudien	93
5.4.1.	Chemikalien und Geräte	93
5.4.1.1.	Chemikalien	93
5.4.1.2.	Geräte	94
5.4.2.	Durchführung von Studien an Tieren – rechtliche Voraussetzungen	95
5.4.3.	Durchführung des chirurgischen Eingriffes	95
5.4.4.	Mehrstufenperfusion	97
5.4.5.	Studiendesign	98
5.4.5.1.	P-gp Affinitätsstudien mit den Modellsubstanzen Talinolol und Saquinavir	98
5.4.5.2.	MRP-Affinitätsstudie mit Indometacin als Modellsubstanz	99
5.4.5.3.	Bestimmung des IC50-Wertes der P-gp Hemmung	99
5.4.5.4.	Testung des H17s auf Substrateigenschaft am P-gp und MRP	100
5.4.6.	Berechnungen	100
5.4.6.1.	Wassertransport	100
5.4.6.2.	Intestinale Permeabilität	101
5.4.6.3.	IC50-Werte der P-gp Hemmung	101

5.4.7.	Statistische Auswertung	102
5.5.	HPLC Analytik	102
5.5.1.	Chemikalien und Geräte	102
5.5.1.1.	Chemikalien	102
5.5.1.2.	Geräte	103
5.5.2.	Bestimmung von Talinolol enantioselektiv	104
5.5.2.1.	Chromatographische Bedingungen	104
5.5.2.2.	Probenbehandlung	106
5.5.2.3.	Validierung	107
5.5.3.	Bestimmung von Saquinavir	107
5.5.3.1.	Chromatographische Bedingungen	107
5.5.3.2.	Probenbehandlung	108
5.5.3.3.	Validierung	108
5.5.3.3.1.	Spezifität	109
5.5.3.3.2.	Linearität	109
5.5.3.3.3.	Richtigkeit und Präzision	109
5.5.3.3.4.	Bestimmungs- und Nachweisgrenze	110
5.5.4.	Bestimmung von Indometacin	111
5.5.4.1.	Chromatographische Bedingungen und Probenbehandlung	111
5.5.4.2.	Validierung	111
5.5.5.	Bestimmung von H17	111
5.5.5.1.	Chromatographische Bedingungen	111
5.5.5.2.	Probenbehandlung	111
5.5.5.3.	Validierung	112
6.	Zusammenfassung und Ausblick	113
7.	Literaturverzeichnis	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung des HI-Virus	5
Abbildung 2	Strukturproteine und Enzyme des HI-Virions mit den jeweils codierenden Genen	5
Abbildung 3	Replikation des HI-Virus	6
Abbildung 4	Graphische Darstellung über den Efflux von P-gp Substraten aus der Zellmembran und der Zelle in den Extrazellularraum bei besetzter ATP-Bindungsstelle	13
Abbildung 5	Zweidimensionale Darstellung des P-gps und dreidimensionale Ansicht.	16
Abbildung 6	Vereinfachte schematische Darstellung des MRP1 mit zusätzlicher transmembranärer Domäne (TMD ₀) und MRP5 als Beispiel eines Vertreters der MRP-Familie, dem diese Domäne fehlt.	17
Abbildung 7	Vergleichende Darstellung von MRP1, MDR1 und MXR.	17
Abbildung 8	Schematische Darstellung des Transportes von Arzneistoffen und Xenobiotika über MRP	19
Abbildung 9	Lokalisation des MRP1 und P-gps am Beispiel der Blut-Testis-Schranke	19
Abbildung 10	Verapamil als „fast-diffuser“	25
Abbildung 11	Mögliches Bindungsverhalten von Makromolekülen am P-gp	26
Abbildung 12	Lipodystrophie- und Lipogynäkomastie-Syndrom	30
Abbildung 13	Das dimere 1,4-Dihydropyridin H17 und H19	32
Abbildung 14	Änderung der ³ H-Verapamil-Bindung an P-gp durch Zusatz von DMSO in verschiedenen Konzentrationen	35
Abbildung 15	Konzentrationsabhängige Verdrängung des radioaktiv markierten Liganden ³ H-Verapamil zur Bestimmung der IC ₅₀ -Werte am Beispiel des H17s und H19s	37
Abbildung 16	MTT-Reaktion zum Formazan	39
Abbildung 17	FACS-Analyse von HX (1) bei 0,2; 1; 5; 10 und 20 μM	45
Abbildung 18	FACS-Analyse von Substanz 13 bei 1 und 10 μM	46
Abbildung 19	Mögliche Symmetriemodelle des P-gps	47
Abbildung 20	Verapamil und Dactinomycin	49
Abbildung 21	Checkerboard-Studie (Epirubicin-Synergismus-Test) von Substanz 8	58

Abbildung 22	Graphische Darstellung der effektiven Permeabilitäten P_{eff} [$\bullet 10^{-4}$ cm/s] für Talinolol allein und die Koperfusion von Talinolol mit Ritonavir und Verbindung 2 (H17)	63
Abbildung 23	Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\bullet 10^{-4}$ cm/s] für Saquinavir allein und die Koperfusion von Saquinavir mit Ritonavir und Verbindung 2 (H17)	64
Abbildung 24	Effektive Permeabilitäten von H17 (2), Saquinavir, R- und S-Talinolol jeweils bei alleiniger Perfusion und in Koperfusion mit Vinblastin	68
Abbildung 25	Effektive Permeabilitäten von H17 (2) allein und in Koperfusion mit Indometacin sowie die umgekehrte Konstellation der direkten Bestimmung von Indometacin allein und in Koperfusion mit H17	70
Abbildung 26	Mikroskopische Aufnahme der Mouse-T-Lymphoma Stamm-Zelllinie L5718v Zelllinie 250fach vergrößert.	77
Abbildung 27	96-Well-Platten vor und nach der Inkubation mit MTT	82
Abbildung 28	Checkerboard (Epirubicin-Synergismus)-Test; Bestückung der well-Platten und Farbänderung je nach Zytotoxizität nach allen Inkubationsphasen	84
Abbildung 29	Seitwärtsstreuung (SSC) und Vorwärtsstreuung (FSC) nach Auftreffen des Lasers auf ein Partikel und Cell Sorting einer Analyse nach deren Zellarten	88
Abbildung 30	Aufbau und Funktionsweise eines modernen FACS-Gerätes: (vereinfachte Darstellung) sowie eine Aufnahme aus dem Inneren einer solchen Maschine	89
Abbildung 31	Mikroskopische Aufnahme der HTB26 Zelllinie	90
Abbildung 32	Darstellung des Perfusionsmodells	96
Abbildung 33	Chiraspher NT Säulenmaterial	104
Abbildung 34	Chromatogramm der Enantiomerentrennung des Analyten Talinolol und dem internen Standard Pindolol nach Extraktion aus Tyrode-Puffer erfasst bei $\lambda=245$ nm	105
Abbildung 35	Chromatogramm der Trennung von H17, Saquinavir, Ritonavir und des internen Standards A-86093.0 bei $\lambda=240$ nm	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Familie der SLC-Transporter: Kurzübersicht ausgewählter Subfamilien und deren Liganden	9
Tabelle 2	Übersicht über die drei ABC-Transporter-Subfamilien, die vor allem mit der Entstehung von MDR in Verbindung gebracht werden (MDR, MRP, MXR)	10
Tabelle 3	Familie der ABC-Transporter: Kurzübersicht ausgewählter Subfamilien und deren Liganden	12
Tabelle 4	Einige Arzneistoffgruppen mit Beispielen, die sowohl entweder CYP3A- und P-gp-Substrat, -Inhibitor oder beides sind	29
Tabelle 5	MTT Absorptionen bei einer Modulatorkonzentration von 30µM und der DMSO-Kontrolle	40
Tabelle 6.1	x-fache Steigerung des inhibitorischen Potenzials im Vergleich zur Kontrollsubstanz Verapamil eingesetzt in 10 Mikromolarer Konzentration	43
Tabelle 6.2	x-fache Steigerung des inhibitorischen Potenzials im Vergleich zur Kontrollsubstanz Verapamil eingesetzt in 10 Mikromolarer Konzentration	44
Tabelle 7	P-gp inhibitorische Aktivitätsverhältnisse ausgewählter Tetra- und Bistypen im Vergleich zu Verapamil unter Beachtung ihrer Wasserstoffbrücken-Funktionen	51
Tabelle 8	Für die Überwindung der MDR als ideal ermittelte Kombinationskonzentrationen zwischen den jeweiligen Testsubstanzen und Epirubicin	57
Tabelle 9	Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für Talinolol allein und die Koperfusion von Talinolol mit Ritonavir und Verbindung 2 (H17)	62
Tabelle 10	Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für Saquinavir allein und die Koperfusion von Saquinavir mit Ritonavir und Verbindung 2 (H17)	64
Tabelle 11	IC50-Werte der P-gp Hemmung in µM mit Talinolol und Saquinavir als Modellschubstanzen	65
Tabelle 12	Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für Indometacin allein und die Koperfusion von Indometacin mit Verbindung 2 (H17) und Probenecid	66
Tabelle 13	Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für H17 (2) bei alleiniger und in Koperfusion mit Vinblastin (100µM) bzw. Indometacin (1mM)	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 14	Eingesetzte Modulatorkonzentrationen zur Bestimmung des IC50-Wertes der P-gp Hemmung	99
Tabelle 15	Retentionszeiten für H17, Saquinavir, Ritonavir und den internen Standard A-86093.0	106
Tabelle 16	Linearitätsparameter der Kalibriergeraden zur Bestimmung von Saquinavir aus Tyrode-Puffer	108
Tabelle 17	Richtigkeit und Präzision für das Analyseverfahren zur Bestimmung von Saquinavir aus Tyrode-Puffer	109

Abkürzungen

5CFDA, AM	5-Carboxyfluorescein-diazetat-azetoxymethylester
Å	Angström
ABC	ATP-Binding-Cassette
ABCP	ABC-Transporter in Placenta
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARA	Anthracycline-resistance associated
ART	Anti-Retrovirale-Therapie
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
cAMP	cyclic Adenosin-Monophosphate
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin dependent Kinase
cGMP	cyclic Guanosin-Monophosphate
CHO	Chinese Hamster Ovary
cMOAT	canalicular Multispecific Anion Transporter
CYP	Cytochrom P-450
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-D6	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked Immuno-Sorbent-Assay
env	envelope
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAR	Fluorescence-Activity-Ratio
FBS	Fetal Bovine Serum
FIC	Fractional Inhibitory Concentration
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
FIX	Fractional Inhibitory Index

Abkürzungen

gag	group antigen
gp	Glykoprotein
GSH	Glutathion
^3H	tritiertes Wasserstoff
HBBS	Hanks' balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HEP-G2	Leber-Karzinom-Zelllinie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance liquid Chromatography
HUGO	Human Gene Nomenclature Committee
IC	Inhibitory Concentration
Indo	Indometacin
kD	kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LRP	Lung Resistance related Protein
LTR	Long Terminal Repeat
M	Molarität
MCF	Multidrug-resistente Brustkrebszelllinie
MCT	Monocarbonsäuretransporter
MDA-MB	Humane Brustkrebs-Zelllinie
MDR	Multidrug-Resistance
MES	Morpholinethanolsulfonsäure
mg	Milligramm
MIC	Mean Inhibitory Concentration
min	Minute
ml	Milliliter
MLP	MRP-like-Protein
mM	Millimolar
MRK-16	anti-P-gp Antikörper, Mouse anti human P-gp monoclonal
MRP	Multidrug-resistance associated Protein
MTT	Methyltetrazolium
MXR	Mitoxantrone-resistance protein
MW	Mittelwert
X	

Abkürzungen

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NRTI	Nucleosidischer Reverse-Transkriptase Inhibitor
OCT	Organic Cation-Transporter
PBS	Phosphate buffered Saline
P _{eff}	Effektive Permeabilität
PFV	Peakflächenverhältnis
P-gp	P-Glykoprotein
pH	Potentia hydrogenii
PMEA	9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin
pol	polymerase
PXE	Pseudoxanthoma Elasticum
Rit	Ritonavir
RLB	Radioliganden-Bindungsassay
RNS	Ribonucleinsäure
s	Sekunde
Saq	Saquinavir
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEM	Standard Error of Mean
SLC	Solute Carrier
TAL	Talinolol
TAP	Telomerase associated Protein
u.a.	und andere
Upm	Umdrehungen pro Minute
u.v.m.	und viele mehr
VBL	Vinblastin
ZNS	Zentral-Nervensystem
λ	Symbol für Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μM	Mikromol

Danksagung

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und an der Medizinischen Fakultät der Universität Szeged am Institut für Mikrobiologie durchgeführt.

Ich möchte hier die Gelegenheit ergreifen einigen Personen meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

PD Dr. rer. nat. Andreas Hilgeroth für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit die vorliegende Arbeit unter seiner Betreuung selbständig anzufertigen. Hierbei möchte ich mich besonders für seine uneingeschränkte Unterstützung, die ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge bedanken, die mir immer neue Einsichten und Ideen zum Vollenden dieses Promotionsvorhabens gaben und maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beitrugen. Nicht zuletzt aber ebenso für die Möglichkeit einen wichtigen Teil meiner Studien im Ausland anzufertigen, was dieser Arbeit eine internationale Note verlieh und uns eine langjährige, erfolgreiche und zukunftssträchtige Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Professor Molnár einbrachte.

Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Josef Molnár für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe an der Universität Szeged in Ungarn, die Hilfestellung bei der Erlernung verschiedenster mikrobiologischer Auswerteverfahren, vor allem der FACS-Analyse, und das Nahebringen der ungarischen Kultur.

Professor Dr. rer. nat. Hildegard Spahn-Langguth für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe die chirurgischen Fähigkeiten für die *in situ* Studien zu erwerben und hierbei insbesondere Dr. Abeer Hanafy für das Einarbeiten in die Perfusionstechnik und Frau Frenzel für ihre Hilfsbereitschaft bei analytischen Fragestellungen.

Dr. rer. nat. Petra Froberg dafür, dass ich zu jeder Zeit in ihrem Labor die HPLC-Analytik durchführen durfte und hierbei insbesondere Dr. Guntram Drutkowski für das Einarbeiten in die HPLC-Analytik und die Datenauswertung.

Dr. rer. nat. Cornelia Dressler für das zur Verfügungstellen der Daten aus dem Radioliganden-Bindungsassay und dessen Durchführung.

Annamaria Molnár, Gabriela Spengler und Nóra Gyémánt für ihre Hilfe bei dem Umgang mit verschiedensten Zellkulturen und das Einarbeiten in mikrobiologische Untersuchungsmethoden sowie ihre unermüdliche Geduld mir die ungarische Sprache nahe zu bringen.

Der gesamten Arbeitsgruppe *Wirkstoffdesign und Analytik* für das wundervolle Arbeitsklima und die hervorragende Zusammenarbeit, die meine Promotionszeit nicht nur im wissenschaftlichen Bereich zu einem unvergesslichen Erlebnis machte.

Der Europäischen Union und dem BMBF für die Förderung vor allem bei den Auslandsaufenthalten.

Alexandra Eisenschmidt für die Hilfe bei der Erstellung der Strukturformeln und für alles Andere.

Meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung und endlose Zuversicht, die es mir zusammen letztlich ermöglichten die kleinen und großen Anforderungen und Katastrophen, die das Leben bereit hält zu meistern, und dadurch den denkbar besten Grundstein für mein Leben schufen.

1. Einleitung

Das Phänomen der Multidrug-Resistance (MDR) ist eine der bisher am wenigsten ergründeten Ursachen des Scheiterns von Arzneistoffen bei der Bekämpfung zahlreicher Erkrankungen und Infektionen. So ist sie bei der Krebsbehandlung mit vielen Chemotherapeutika und der Behandlung des Human Immunodeficiency Virus (HIV) mit HIV-Protease- und Reverse Transkriptase-Inhibitoren jeweils ein wesentlicher therapielimitierender Faktor in Bezug auf die Ausbildung körpereigener Resistenzen gegen diese Arzneistoffe.

Das Erscheinungsbild der MDR wurde von dem Amerikaner *Ling* in den siebziger Jahren entdeckt. Er analysierte CHO-Zellen und stellte fest, dass sie nach längerer Zytostatika-Exposition gegen diese Medikamente resistent wurden. Das Phänomen hierbei war, dass es sich bei den Zellen zwar um entartete aber doch körpereigene Zellen handelte⁵⁵.

Das Prinzip der MDR besteht darin, dass zahlreiche transmembranäre sowie zelluläre Transportersysteme, man spricht in diesem Zusammenhang auch von Efflux-Pumpen, in der Lage sind, Xenobiotika zu erkennen und sie unter Energieverbrauch gegen ein Konzentrationsgefälle aus den Zellen oder schon während der Diffusion in die Zelle aus der Zellmembran hinaus, in den Extrazellularraum zu transportieren. Das heißt, die Akkumulation von Pharmaka in der Zelle wird durch den Efflux drastisch vermindert und somit reichen die Wirkstoffspiegel für eine effektive Therapie nicht aus. Die notwendige Energie dafür wird durch ATP-Hydrolyse bereitgestellt^{39,118}. Daher wurden diese Systeme unter dem Begriff ATP-binding-cassette- (ABC) Transporter zusammengefasst. Sie treten ubiquitär im Organismus auf, werden aber in besonderem Maße ebenfalls in Tumorzellen gebildet. Auch wenn der Transport zahlreicher Efflux-Pumpen sättigbar ist, führen Dosiserhöhungen selten zum gewünschten Effekt, da einhergehend mit solchen Erhöhungen ebenso die Intensitäten der Nebenwirkungen steigen und diese das therapeutische Maß oftmals übertreffen. Ziel der heutigen Forschung ist die Überwindung der MDR, um gegen derartige Resistenzentwicklungen vorzugehen. Viele Substanzen zeigten im *in vitro* Versuch gute MDR Modulationseigenschaften, die aber in *in vivo* Versuchen nicht bestätigt werden konnten. So scheiterten viele Vertreter schon in präklinischen Studien, oder konnten die in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllen. Ursache hierfür scheint die immense Komplexität des Phänomens der MDR zu sein, die

1. Einleitung

sich nicht auf nur einen simplen Transportmechanismus beschränkt. Vielmehr erschweren das Zusammenspiel einzelner Transporter im Kontext der Biogenese der MDR, die unzureichende Kenntnis über eine Struktursymmetrie und dem Bindungsverhalten von Modulatoren an potenzielle Bindungsstellen der Transporter, bisher eine effektive Behandlungsstrategie.

2. Grundlagen

2.1. Resistenzen

Resistenzentwicklungen gehören zu den natürlichen Anpassungsmechanismen aller Organismen, ohne die ein Überleben unmöglich ist.

Ein gutes Beispiel dafür ist der Selektionsdruck, dem Mikroorganismen durch die Anwendung von Antibiotika gegenüberstehen. Hierüber erlangen manche, mit Hilfe mittlerweile allseits bekannter Mechanismen, Resistenzen, die sie gegen die angewandten Antibiotika immun machen. Es entsteht ein so genannter Genpool an resistenten Mikroorganismen⁸². Desweiteren existieren sogenannte körpereigene Resistenzen, die auf das Entfernen körperfremder Substanzen (Xenobiotika), wozu auch Chemotherapeutika, Antibiotika, Virustatika u.v.m. zählen, spezialisiert sind. Aufgrund der Zielstellung der Arbeit gilt dieser Art der Resistenzentwicklung hier besondere Beachtung.

2.1.1. Genetische Resistenz

Resistente Formen von Mikroorganismen zeigen im Vergleich zu ihren nichtresistenten Verwandten ein verändertes Genmuster. Die Aktivierung genetischer Informationen für die Biosynthese resistenter Faktoren eines Organismus kann durch vier Möglichkeiten induziert werden⁸².

Zum einen sind die Gene schon latent vorhanden und werden durch Genamplifikation bzw. durch Induktion verstärkt abgelesen.

Eine zweite Möglichkeit ist die Veränderung der vorhandenen Gene durch Mutationen. Dies geschieht einmal durch Transversion oder Transition einzelner Basen oder Basenpaare mit einer einhergehenden Veränderung des Protein-codes. Andererseits ist es möglich, dass durch so genannte Rasterverschiebungen Basenpaare eingeschoben oder aber auch verloren gehen können, was eine immense Änderung der Proteincodierung nach sich zieht. Nicht zuletzt ist eine weitere Möglichkeit der Mutationsausbildung die Aktivierung von Transposons, die innerhalb der Chromosomen für eine Delokalisierung von Genen sorgen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von springenden oder transponiblen Genen.

Der vierte Fall der genetischen Resistenz obliegt der Übertragung resistenzerzeugender Gene zwischen den Zellen. Diese interzelluläre Resistenzübertragung vollzieht sich durch

2. Grundlagen

den Austausch genetischen Materials, welche als Konjugation bezeichnet wird. Hierbei können die resistenzerzeugenden Gene entweder von Plasmiden durch Plasmidtransfer extrachromosomaler DNS oder aber über Transposons aus dem Chromosom einer anderen Zelle stammen.

Egal auf welche Art und Weise letztendlich eine Mutation entsteht, in allen Fällen sind Proteine die eigentlichen resistenzerzeugenden Faktoren, zu deren Biosynthese die besprochenen Gene erforderlich sind⁸².

Eine Sonderstellung nehmen die Viren in dieser Problematik ein. Ihre Mutationsraten sind besonders hoch. Das HI-Virus ist das beste Beispiel für diese Sonderstellung. Pro Patient und Tag finden bis zu 10^5 Punktmutationen (Veränderung eines Nukleotides) statt.

2.1.2. HIV und viruseigene Resistenz

Wie alle Retroviren trägt auch das HI-Virus seine genetische Information auf der RNS. Das Virusgenom wird hauptsächlich aus den Strukturgenen gag, pol und env gebildet. Es wird durch diverse Regulatorproteine, die ihre Aufgabe bei der Virusreplikation erfüllen, ergänzt. Das virale Gen pol codiert für die Virusproteine Protease, Integrase und Reverse-Transkriptase. Die Capsid-, Matrix- und Nukleocapsidproteine werden durch gag codiert und die HIV-Hüllproteine gp 120 sowie gp 41 durch env (Abbildung 1,2). Die beiden letzteren ermöglichen dem Virus ein Andocken an die CD4-Moleküle der menschlichen Zielzellen. Die Reverse-Transkriptase erlangt bei der Virusreplikation besondere Bedeutung, da sie das Virus befähigt, seine auf der RNS liegende genetische Information in proteincodierende DNS umzuschreiben. Die terminalen Enden des Genoms bilden LTR-Sequenzen, die Start und Ende der Transkription steuern.

2. Grundlagen

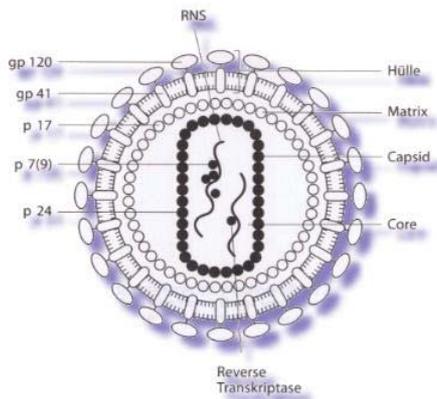


Abbildung 1

Schematische Darstellung des HI-Virus: links, die an dem Virusaufbau beteiligten Proteine und rechts die daraus resultierenden Viruskomponenten

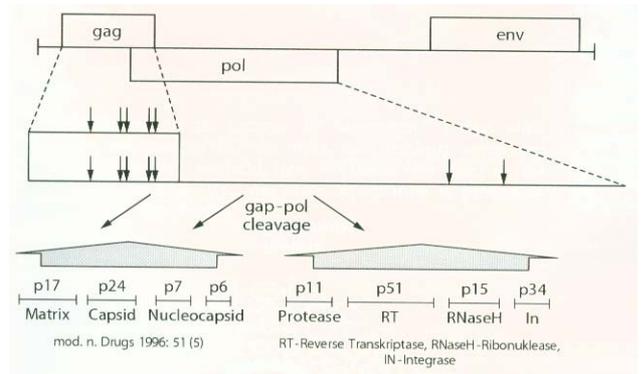


Abbildung 2

Strukturproteine und Enzyme des HI-Virus mit den jeweils codierenden Genen

Viren sind Lebensformen, die keine eigene Stoffwechsellage besitzen. Daher nutzt auch das HI-Virus den Stoffwechsel der Wirtszelle für seine Replikation. Die menschlichen Wirtszellen für das HI-Virus sind die CD4 Zellen des Immunsystems (T4-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen) sowie einige Gehirn-, Darm- und Hautzellen. Das CD4-Protein dieser Zellen ist gleichzeitig das Erkennungsmerkmal des Virus. Es befindet sich auf der Zelloberfläche und ist komplementär zu einem HIV-Hüllprotein, dem gp120. Mit diesem Hüllprotein „dockt“ das Virus an CD4 der Wirtszelle an und wird so in die Zelle aufgenommen. Nach dem Auflösen der Virushülle befindet sich die virale Erbinformation frei in der Wirtszelle. Das viruseigene Enzym Reverse Transkriptase katalysiert nun das Umschreiben der genetischen Information auf der viralen RNS in DNS, indem es die viruseigenen Nukleotide zu einer langen DNS-Kette zusammenfügt. In dieser Form ist das Virusgenom in die Chromosomen des Zellkerns der Wirtszelle integrierbar. Diesen Vorgang der Integration katalysiert wiederum ein anderes viruseigenes Enzym, die Integrase.

Jetzt aktiviert und kontrolliert das Virus den Zellstoffwechsel. Virale Proteine, die der Replikation des Virus dienen, werden von der Wirtszelle selbst produziert, indem die in den Zellkern eingeschleuste virale DNS bei der zelleigenen DNS-Replikation abgelesen wird. Die Kopien bestehen dann wieder aus RNS und werden so als Ausgangsmaterial für neue Viren genutzt. Von der Kopie werden lange Proteinketten gebildet, welche anfangs noch alle viralen Proteine beinhaltet. Diese sind noch eng miteinander verbunden und

2. Grundlagen

werden durch ein weiteres viruseigenes Protein, der Protease, voneinander getrennt. Sowohl die kopierten viralen RNS-Moleküle als auch die getrennten viralen Proteine

Vermehrung

- ① Eintritts-Inhibitoren
- ② Reverse Transkriptase-Inhibitoren und Nichtnukleosidale Reverse Transkriptase-Inhibitoren
- ③ Integrase-Inhibitoren
- ④ + ⑤ Protease-Inhibitoren

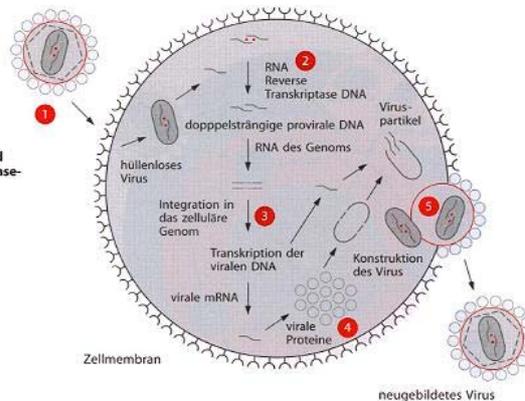


Abbildung 3

zwei bis drei Tage und produzieren in dieser Zeit ca. 10 Millionen HI-Viren. Es werden jeden Tag unbehandelt bis zu 10^9 neue Zellen infiziert. Gerade das HIV-Genom zeigt bei seiner Replikation eine ungewöhnlich hohe Mutationsrate. Ein Grund dafür ist die viruseigene Reverse-Transkriptase. Anders als andere Polymerasen besitzt sie weniger Korrekturmechanismen und beseitigt so Ablesefehler bei der Replikation selten. Der Umschreibevorgang ist daher mit einer viel höheren Fehlerrate behaftet. Für das Virus stellt dieser vermeintliche Mangel aber einen Vorteil dar, da im Prinzip kein Viruspartikel dem anderen 100-prozentig gleich ist und so in einem infizierten Organismus eine Vielzahl von unterschiedlichen Virustypen, sogenannte Quasispezies⁶⁵, nebeneinander existieren können. Bei einigen davon kann dann die ART (Anti-retrovirale Therapie) je nach Mutation weniger wirksam bleiben.

Man unterscheidet zwischen verschiedenen Ausprägungen einer Resistenz. Zum einen spricht man von genotypischer Resistenz, wenn genetische Änderungen im Erbgut des HIV, wie Mutationen in den Nukleotid- bzw. Aminosäure-Sequenzen, zu einer verminderten Empfindlichkeit des Virus auf eine Substanz führt. Zum anderen existiert die phänotypische Resistenz. Sie ist die durch Mutationen bedingte verminderte Empfindlichkeit des HIV auf bestimmte Substanzen und wird in einer x-fachen Erhöhung des IC50-Wertes der jeweiligen Substanz angegeben.

Von Kreuzresistenz spricht man, wenn sich eine Mutation auf die phänotypische Resistenz gegenüber mehreren Medikamenten gleichzeitig auswirkt. Wohingegen der Wirkverlust eines Medikaments über den Wiederanstieg der Viruslast im betroffenen Organismus beschrieben wird⁷. Beispielsweise kann bei dem NRTI Azidothymidin ein bis zu 50facher Wirkverlust auftreten. Dabei sind Aminosäuren an zwei Positionen der Reversen Transkriptase verändert (Position 41 und 215)¹¹⁷. Je besser die Virusreplikation

setzen sich an der Innenseite der Zellmembran zusammen und bilden nach Exozytose neue HIV-Partikel. (Abbildung 3) HIV-infizierte T4-Helferzellen überleben

2. Grundlagen

unterdrückt wird, desto weniger Mutationen können durch die Reverse Transkriptase in das Virus-Genom eingebaut werden und um so geringer ist die Gefahr, dass die eingesetzten Medikamente zu schnell ihre Wirkung durch Resistenzen verlieren können. Deshalb gilt für antiretrovirale Medikamente weiterhin: je mehr Mutationen zum vollen Wirkungsverlust einer Substanz notwendig sind, umso langsamer wird diese Substanz während der Therapie auch an Wirkung verlieren. Aus diesen Gründen existiert bis jetzt noch keine Monotherapie gegen das HI-Virus, sondern es wird durch die etablierten Kombinationstherapien eine vorzeitige Resistenzbildung weitgehend eingeschränkt. Auch HIV-Suppressionsraten von nahezu 99%, wie sie mit heutigen Kombinationstherapien erreicht werden, können weder die HIV-Replikation noch die Resistenzentwicklung vollständig verhindern⁷⁸.

2.1.3. Ausbildung von Resistenz durch Veränderung der Membranfunktion

Jede pharmakologisch wirksame Substanz muss in der Lage sein mit Membranen wechselzuwirken, um diese schließlich passieren zu können und so in die Zelle zu gelangen. Es existieren verschiedene und zahlreich beschriebene Transportmechanismen durch Membranen. Das intestinale Epithel stellt hierbei eine der bekanntesten Absorptionsbarrieren dar. Der passive Transport entlang eines Konzentrationsgefälles und der aktive Transport, der sich die dafür benötigte Energie häufig durch Spaltung von ATP bereitstellt. Zum passiven Transport zählt die Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. Ihre Geschwindigkeit hängt von der Stärke des Konzentrationsgefälles (Ficksches Gesetz), vom Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizient und von physikochemischen Eigenschaften, wie Ionisationsgrad, Molekülgröße, Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen, Lipophilie und der Protein-Gewebebindung ab. Am häufigsten tritt die transzelluläre Diffusion auf. Sie gilt nur für lipophile Substanzen, da diese als einzige über die Phospholipiddoppelschicht der Membran in die Zelle eindringen und sie auf diesem Weg auch wieder verlassen. Vereinzelt tritt für hydrophile Substanzen auch eine parazelluläre Diffusion auf. Hierbei diffundieren die Verbindungen durch den Interzellularraum. Natürlich tritt diese Form der Diffusion nur in solchen Geweben auf, deren Endothelzellen auch über den nötigen Abstand bzw. „Verschmelzungsgrad“ verfügen.

Die Diffusion in diesem Sinn ist nur für niedermolekulare Stoffe möglich. Makromolekulare Stoffe nutzen unter anderem das Prinzip der Endozytose, um in die Zelle zu gelangen. Hierbei handelt es sich um keinen von den Substanzen aktiv betriebenen

2. Grundlagen

Prozess. Rezeptorvermittelt bilden sich Einstülpungen in der Zellmembran, die sich letztendlich zu Vesikeln abschnüren, die den Stoff enthalten.

Der Carrier-vermittelte Transport kann ein aktiver Transportmechanismus sein. Der für den Transport von Substanzen nötige Konzentrationsgradient, wird durch die Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen und durch den Na^+/H^+ -Transporter an der apikalen Seite der Membran aufrechterhalten¹²³. Somit ist auch ein Transport gegen ein Konzentrationsgefälle möglich. Da die Kapazitäten eines Carriers beschränkt sind, ist dieser Mechanismus sättigbar.

Veränderungen des Transportes durch Zellmembranen können durch Fremdstoffe und demzufolge auch durch Arzneistoffe induziert werden, und so deren eigenes Eindringen in die Zelle erschweren, sowie ihren aktiven Rücktransport aus der Zelle über Membran-Efflux-Pumpen erleichtern. Dieses Erscheinungsbild stellt also einen Teil der körpereigens angelegten Resistenzmechanismen dar. Die Membran-Efflux-Pumpen gehören zur Gruppe der ABC-Transporter. Ihre wichtigsten Vertreter sind die P-Glykoproteine und die MDR-assoziierten Proteine (MRP-Typen). Sie sind verantwortlich für die Multidrug-Resistance von Krebszellen gegen Zytostatika und körpereigene Resistenzen gegen HIV-Protease-Inhibitoren. Die Eigenschaften dieser Transporter bei Resistenzausbildungen und deren effektive Modulation stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit.

2.2. Multidrug-Resistance (MDR)

Unter dem Überbegriff Multidrug-Resistance werden Resistenzerscheinungen zusammengefasst, die auf körpereigene Strukturen zurückzuführen sind. Hierzu zählen die membranständigen exsorbitiven Transporter und Halbtransporter, die unter Aufwendung von Energie, die ihnen durch ATP-Hydrolyse bereitgestellt wird, dazu befähigt werden Stoffe auch entgegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle oder während deren Diffusion in die Zelle, direkt aus der Membran zu entfernen. Sie werden daher auch unter dem Begriff ATP-binding-cassette (ABC)-Transporter zusammengefasst. Der Phänotyp dieser Resistenzentwicklungen äußert sich demnach in unzureichenden Gewebe- und Plasmakonzentrationen der betroffenen Arzneistoffe. Viel versprechende und effektiv erscheinende Therapien werden durch solche intrakorpuskulären Vorgänge immer häufiger bis hin zum Scheitern limitiert. Im Folgenden wird auf die Transporterfamilien und insbesondere auf die Superfamilie der ABC-Transporter eingegangen und die bisherigen Erkenntnisse über ihre Struktur und Substratspezifität zusammengetragen.

2. Grundlagen

2.2.1. Transporter

Die Aufnahme von Substanzen in das Blut und ihr Transfer ins Gehirn und andere Gewebestrukturen, die sich vom Blut durch Gewebeschranken trennen, wurde vor kurzem noch durch die rein physikochemischen Eigenschaften der Arzneistoffe charakterisiert. Heutzutage ist bewiesen, dass bei diesen Prozessen Transportproteine eine entscheidende Position einnehmen. Im menschlichen Genom existieren 533 proteincodierende Transkripte, die Transporter für anorganische und organische Substanzen darstellen. Die meisten von ihnen werden in zwei große Superfamilien eingeteilt, in die solute carrier (SLC)-Familie (Tabelle 1), welche wiederum in 32 Subfamilien unterteilt ist und in die genannte ABC-Familie mit sieben Subfamilien (Tabelle 2), die zum Großteil für die Problematik der MDR entscheidend sind. In der SLC-Familie ist nur ein kleiner Teil an dem Transport von Arzneistoffen beteiligt, wie zum Beispiel die organischen Anionentransporter OAT1 bis OAT3 und die organischen Kationentransporter OCT1 bis OCT3. Einige andere Carrier aus der SLC-Familie, wie die Transporter SLC1, 2, 6 und die SLC7-Familie, transportieren vorwiegend Aminosäuren.

Tabelle 1:

Familie der SLC-Transporter: Kurzübersicht ausgewählter Subfamilien und deren Liganden²².

Symbol der Unterfamilie	Anzahl der Transporter	Name	Liganden
3	A1, A2	Aminosäuretransporter (neutral)	L-DOPA
7	A1-A11	Aminosäuretransporter (kationisch)	
10	A1, A2	Na ⁺ /Gallensäure Kotransporter	
15	A1, A2	Oligopeptid- und H ⁺ /Peptidtransporter	β- Lactamantibiotika, ACE-Hemmer
16	A1-A10	Monocarbonsäuretransporter (MCT)	Benzoe-, Milchsäure Fettsäuren (kurzkettig)
21	A1-A14	Organischer Anionentransporter (OAT)	Fexofenadin, Prostaglandine β- Lactamantibiotika
22	A1-A11, A1L, A1LS	Organischer Anionen- und Kationentransporter	Penicilline, Verapamil, Chinidin, Dopamin, Tetraethylammonium

2.2.2. Die Superfamilie der ABC-Transporter

Über 100 Mitglieder dieser Familie, die sich in sieben Subfamilien untergliedert, sind bis heute identifiziert. Die meisten dieser Vertreter besitzen die beschriebene Transportfunktion. Sie sind auf das Vorhandensein von ATP angewiesen, aus dem sie die

2. Grundlagen

Tabelle 2

Übersicht über die drei ABC-Transporter-Subfamilien, die vor allem mit der Entstehung von MDR in Verbindung gebracht werden (MDR, MRP, MXR)

Unterfamilie	HUGO-Bezeichnung	Synonyme	Aminosäuren	Vorkommen	wichtige Substrate	wird in Verbindung gebracht mit::
MDR1	ABCB1	PGY1, P-gp	1280	apikale intestinale Membran (bes. Kolon) Nebennierenrinde, renaler Tubulus, Blut-Hirn-Schranke,	vielzählige lipophile und amphiphile Substanzen	körperlig. Resistenz
MDR3	ABCB4	PGY3, MDR2/MDR3	1279	Leber, apikale intestinale Membran	Phosphatidylcholin	Vererbbares, familiäres Cholestase
MRP1	ABCC1	MRP, GS-X	1531	Lunge, Hoden, basolaterale Membranen (bes. intestinal-jejunum), ubiquitär	org. Anionen, GSH-Konjugate	körperlig. Resistenz
MRP2	ABCC2	cMOAT	1545	Leber, Intestinum, Niere, apikale Membranen	org. Anionen, Platinverbindungen, wie Cisplatin, Glucuronide (Bilirubin)	Dubin-Johnson-Syndrom
MRP3	ABCC3	cMOAT2, MLP2, MOAT-D	1527	Leber, Kolon, Pankreas, basolaterale Membranen	Glucuronide, Gallensalze	?
MRP4	ABCC4	MOAT-B	1325	Prostata, Lunge, Pankreas, Hoden, Ovarium, Gallenblase, basolaterale Membranen	org. Anionen, Nucleotidanaloga (PMEA)	?
MRP5	ABCC5	SMRP, MOAT-C	1437	basolaterale Membranen, ubiquitär	org. Anionen, Nucleotidanaloga, GSH-Konjugate	?
MRP6	ABCC6	ARA, MLP1, MOAT-E	1503	Leber, Niere, basolaterale und apikale Membranen	anion. Peptide (BQ-123)	Pseudoxanthoma elasticum
MRP7	ABCC10	EST182763	1513	?	?	?
MXR	ABCG2	BCRP, ABCP	655	Plazenta, Leber, Intestinum, apikale Membranen	Mitoxantron, zahlreiche lipophile und amphiphile Substanzen	körperlig. Resistenz

2. Grundlagen

nötige Energie für den Transport von Substanzen aus der Zelle und der Zellmembran durch ATP-Hydrolyse beziehen. Dieser Mechanismus wurde evolutionär angelegt und dient der Zelle zum Schutz vor Xenobiotika, was das Vorkommen von ATP abhängigen Transportern in Bakterien, Protozoen, Pilzen bis hin zum Menschen belegt^{5,82}. Aufgrund dessen findet man auch gerade in Tumoren hohe Expressionsraten dieser Transporter.

Die Familie der ABC-Transporter besitzt als Strukturmerkmal vier funktionelle Domänen. Zwei hydrophobe zur Membranverankerung, die als transmembranere Domänen bezeichnet werden und zwei hydrophile zur Bindung von ATP. Diese sind im zytoplasmatischen Raum angelegt, wo auch die ATP-Hydrolyse stattfindet.

Das Mukoviszidose-assoziierte CFTR-Protein (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) ist ein wohlbekanntes Beispiel für einen in Säugetieren verbreiteten ABC-Transporter⁹³. Die am Golgi-Apparat lokalisierten Halbtransporter TAP1 und TAP2¹²² sind, wie das Lung Resistance-related Protein (LRP), Vertreter für intrazelluläre Transporter. TAP1 und TAP2 transportieren Peptide in das endoplasmatische Retikulum zur Antigenpräsentation³⁸. Das im Mittelpunkt des Interesses stehende Proteinprodukt des MDR-1 Gens, das P-Glykoprotein (P-gp), ist wie die Multidrug-Resistance associated Proteine (MRPs) ein transmembranerer Transporter. Sie bewirken einen Efflux von Xenobiotika in den Extrazellularraum. Zusätzlich ist das P-gp aufgrund seiner Lokalisation in der Lage, auch sich noch in der Membran befindende körperfremde Stoffe aus der Zelle zu entfernen. Vor kurzem wurde ein weiteres Mitglied der ABC-Superfamilie charakterisiert. Es handelte sich um ein sogenanntes „Schwesterprotein“ des P-Glykoproteins (SPGP), welches zu fast zwei Dritteln mit der Sequenz des Humanen MDR-1 Gens übereinstimmt. Es transportiert in Hepatozyten Gallensalze⁵⁹. Ganz und gar neue Transporter in der Gruppe der ABC-Superfamilie stellen das MXR (Mitoxantrone-resistance protein) und das Lung resistance Protein (LRP) dar. Das MXR wurde aus einer stark Mitoxantron-resistenten Kolon-Karzinom-Zelllinie (S1-M1-80) geklont und trägt daher zum einen diesen Namen. Weil es ebenso in einer Multidrug-resistenten Brustkrebszelllinie (MCF-7), während des Versuches der Identifizierung von körpereigenen Arzneimittelresistenzen, die nicht auf das P-gp zurückgeführt werden konnten, entdeckt wurde, ist es auch unter dem Namen „breast cancer resistance protein“ (BCRP) bekannt. Fast gleichzeitig wurde derselbe Transporter in der Plazenta identifiziert und kann daher ferner als „ABC transporter in placenta“ (ABCP) benannt werden (Tabelle 2). Da es nur eine ATP-Bindungsstelle besitzt wird es allgemein auch als Halbtransporter bezeichnet. Das LRP ist am wenigsten erforscht. Sein Transportmechanismus ist dem der

2. Grundlagen

anderen Mitglieder dieser Familie verschieden, weil das LRP seine Substrate nicht aus der Zelle heraus transportiert, sondern vielmehr für eine intrazelluläre Redistribution sorgt. Vor allem befördert es Substanzen aktiv aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Die Nomenklatur und die Einteilung dieser Transporterfamilie sind noch wenig einheitlich. Ein Ausschnitt aus einer anderen Möglichkeit der Einteilung im Vergleich zu Tabelle 2 ist in Tabelle 3 dargestellt²². Besondere Aufmerksamkeit galt in dieser Arbeit dem P-gp und dem MRP, den beiden bekanntesten Strukturen der Familie. Deswegen soll im Folgenden verstärkt auf deren Eigenschaften eingegangen werden.

Tabelle 3:

Familie der ABC-Transporter: Kurzübersicht ausgewählter Subfamilien und deren Liganden²².

Symbol der Unterfamilie	Anzahl der Transporter	Name	Liganden
A	A1-A12	ABC1	Estramustin, Lipide
B	B1-B11 z.B. B1	MDR/TAP MDR1, P-gp	Steroide, hydrophobe, basische Substanzen
C	C1-C12 z.B. C1 z.B. C2	CFTR/MRP MRP1 MRP2/cMOAT	anion. Konjugate z.B. mit Glutathion, Sulfat, Gallensäuren
D	D1-D4	ALD	Fettsäuren (langkettig)
E	E1	OABP	
F	F1-F3	GCN20	
G	G1-G5, G8	WHITE	Chemotherapeutika

2.2.3. P-Glykoprotein (P-gp)

Der Transport von Substanzen durch Biomembranen in Extrazellularräume ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Exkretion von Xenobiotika. Das P-gp ist wohl der wichtigste Vertreter von transmembranären Transportproteinen. Es war gleichzeitig auch der erste bekannte, humane Vertreter der ABC-Transporter-Familie. Seine Entdeckung durch *Juliano* und *Ling* 1976 bewies, dass der Transport durch Membranen nicht ausschließlich von den rein physikochemischen Eigenschaften der Stoffe gesteuert wird⁵⁵. P-gp wurde erstmals in CHO Tumorzellen identifiziert. Hier sorgte es für einen Efflux von Zytostatika in den Extrazellularraum und reduzierte so die Konzentration in der Zelle auf

2. Grundlagen

ein nicht toxisches Niveau. Mittlerweile wird das P-gp für zahlreiche körpereigene Resistenzmechanismen verantwortlich gemacht. Es zeichnet sich durch eine Vielzahl strukturell vollkommen unterschiedlicher Substrate aus, was darauf schließen lässt, dass es mehrere Substratbindungsstellen im Molekül gibt und auch darauf zurückzuführen ist, dass das P-gp gegebenenfalls seine Konformation und Transporteigenschaften ändern kann. So ist es neben Resistenzentwicklungen gegen Zytostatika auch für die Resistenzausbildungen gegen fast alle HIV-PI, wie z.B. Saquinavir und Ritonavir verantwortlich^{34,114}. Zellen, die mit dem HI-Virus infiziert wurden und gleichzeitig hohe P-gp Expressionsraten aufwiesen, zeigten eine geringere intrazelluläre Akkumulation von HIV-PI als solche, die kein P-gp exprimierten⁸⁷. Wegen seiner Fähigkeit Substanzen über eine Art Ausstülpmechanismus aus der Zelle zu expedieren, wird es als „Flippase“³⁹ oder auch als „vacuum cleaner“¹¹⁵ bezeichnet. Hierbei werden Substanzen u.a. aus der Membran gebunden.

Bisher sind im menschlichen Organismus zwei MDR Gene gefunden worden, MDR1 und MDR3. In der Maus hingegen wurden drei MDR-Mitglieder charakterisiert: *mdr1a*, *mdr1b* und *mdr2*²⁶, wobei *mdr1a/1b* dem humanen MDR1 Gen weitestgehend entsprechen. Das humane MDR3 und das murine *mdr2* Gen sind bisher kaum untersucht. Bekannt ist, dass sie eine Rolle beim Phosphatidylcholintransport spielen^{96,127}. Neue Erkenntnisse zeigen jedoch auch für diese Gene eine Teilnahme am exsorptiven Transport von Arzneistoffen durch Membranen. So wurde kürzlich in MDR3 transfizierten Zellen von einem

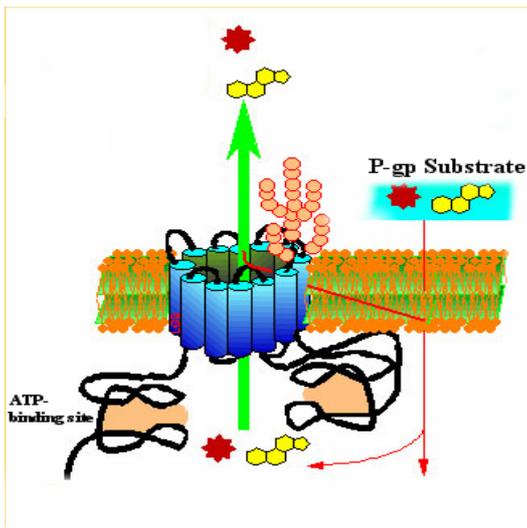


Abbildung 4

Graphische Darstellung über den Efflux von P-gp Substraten aus der Zellmembran und der Zelle in den Extrazellulärraum bei besetzter ATP-Bindungsstelle.

vermehrten Efflux von zytotoxischen Substanzen, wie Paclitaxel und Vinblastin, durch polarisierte Monolayer-Membranen berichtet¹¹². Allerdings ist die Intensität des Transportes im Vergleich zum MDR1 gering und selten detektierbar. P-gp ist ein Protein welches durch das Multidrug-Resistance-Gen MDR1 kodiert wird. Sein Molekulargewicht beträgt 170kD. Es setzt sich aus zwei strukturell homologen Hälften zusammen. Jede zeichnet sich durch sechs transmembranere α -helikale Regionen mit je einer ATP-Bindungsstelle aus. Die beiden Hälften könnten durch interne Genduplikation entstanden sein⁷², weisen untereinander eine 43%ige Homologie auf und

2. Grundlagen

sind über eine sogenannte Linkerregion miteinander verbunden (C-Region). Diese beteiligt sich wahrscheinlich an dem Mechanismus der Substraterkennung und der damit verbundenen ATP-Hydrolyse⁴⁹. An der ersten extrazellulären Schleife vom C-Terminus ist das P-gp drei Mal N-glykosyliert (N-glykosilation sides – Abbildung 5). Allerdings scheint diese Glykosylierung für seine Funktion als Multidrug-Transporter nicht wesentlich. Zwei weitere Domänen stellen die Nukleotid-bindenden Domänen dar. Jede zeichnet sich durch drei übereinstimmende Regionen aus. Sie werden Walker A und Walker B Motif genannt. Die dritte Region ist die schon erwähnte Linkerregion (C-Region)⁹⁸. Beide ATP-Bindungsstellen sind in der Lage ATP zu hydrolysieren. Allerdings geschieht dies nie simultan. Vielmehr erfolgt die Energiebereitstellung durch die Hydrolyse von ATP abwechselnd. Während die eine Hälfte ihre ATP-Speicher füllt, stellt die andere Energie durch ATP-Hydrolyse bereit. ATP-Hydrolyse und Substratbindung sind eng miteinander verbunden^{91,126}. Die bereitgestellte Energie nutzt das Protein für eine Konformationsänderung. Diese Konformationsänderung ist für den Stofftransport von übergeordneter Bedeutung, denn hierdurch unterliegt das Molekül einer Wandlungsfähigkeit, die es ihm ermöglicht, auch wegen der unterschiedlichen Bindungsstellen, zahlreiche, strukturell vollkommen unterschiedliche Stoffe zu transportieren¹³⁴. Außerdem existiert ein sogenannter genetischer Polymorphismus, der sich interindividuell in verschiedenen Ausprägungen der Membran-Efflux-Pumpe äußert^{64,124}. Bis zu vier verschiedene Konformationen des Proteins wurden postuliert^{132,133}. Photoaffinitätsstudien zeigten, dass die transmembranären Regionen 5 und 6 sowie 11 und 12 plus die jeweilige extrazelluläre Schleife (Abbildung 5) besonders starke Wechselwirkungen mit Substraten eingehen⁷⁶. Verschiedene andere Studien zeigten, dass Änderungen in der Membranzusammensetzung, das Bindungsverhalten sowie den Transport von Substanzen und damit auch die Aktivität der P-gp eigenen ATPase beeinflussen⁹⁴. Diese Studien weisen darauf hin, dass Änderungen in der Plasmamembranfunktion bei der Interaktion zwischen den Bindungsstellen und den Nukleotid-bindenden Domänen eine maßgebliche Rolle spielen. P-gp besitzt mindestens zwei verschiedene Bindungsstellen, die jeweils nach dem Substrat, was zu ihrer Entdeckung führte benannt wurden. Die Rhodamine123- oder Verapamil-Bindungsstelle und die Hoechst 33342-Bindungsstelle¹⁰⁸. Demnach erfolgte auch eine Klassifikation von P-gp-Substraten. Sie werden in diese eingeteilt, die nur an der Hoechst 33342-Bindungsstelle binden wie Colchicin, solche die nur an der Rhodamine123- oder Verapamil-Bindungsstelle binden wie Daunorubicin, solche, die Affinitäten zu beiden

2. Grundlagen

Bindungsstellen besitzen wie Vinblastin und diejenigen, die an keiner der beiden binden, wie einige Steroide¹⁰⁷. Diese Tatsache gab Hinweise auf die Existenz weiterer Bindungsstellen, wie etwa einer für Steroide¹⁰⁶. Dihydropyridine finden zum Beispiel über das Zytosol Zugang zum P-gp, doch ist ihre Bindungsstelle bisher unbekannt. Mittlerweile existieren bekräftigte Beweise für zwei zusätzliche Bindungsstellen⁷². Alle können in Transporter- und Modulator-Bindungsstellen eingeteilt werden¹³⁴. Es wird weiterhin diskutiert, ob sich die Konformation des P-gps seinen Liganden und/oder Substraten anpasst und somit die Vermutung über substratinduzierte Konformationsänderungen im Molekül bekräftigt wird^{76,132}. Neben der Entfernung von Xenobiotika und toxischen Substanzen in das Lumen, Urin und Galle, besteht die physiologische Funktion des P-gps darin, Steroide zu transportieren. P-gp tritt in den verschiedensten Geweben und Organen auf. Neben der immensen Aktivität in Tumorzellen, scheint sein exkretorisches Potenzial im Gastrointestinaltrakt, wo es an der apikalen Membran lokalisiert ist und besonders im Kolon einer hohen Expression unterliegt^{30,92}, sowie an der Blut-Hirn-Schranke außerordentlich hoch zu sein⁷¹. Es tritt aber auch in Epithelzellen verschiedener exkretorischer Organe auf wie der Leberzellmembran, dem proximalen Tubulus der Niere, den Enterozyten des Darms, der Gallenblase und der Lunge. Außerdem konnte es in der Plazenta nachgewiesen werden. Während der Schwangerschaft wird es hier stark auf der luminalen Seite des exkretorischen Epithels exprimiert. Man nimmt an, dass es durch die hohe Konzentration und Kombination der Hormone Estrogen und Progesteron zu einer vermehrten Ausbildung des P-gps im uterinen exkretorischen Epithel kommt, um so den Fötus zu schützen, weil die Blut-Plazenta-Schranke wenig effektiv ist³². Das P-gp unterliegt also einer physiologisch immensen ubiquitären Verbreitung. Daher sollten Modulatoren über eine hohe Selektivität verfügen.⁷¹

2. Grundlagen

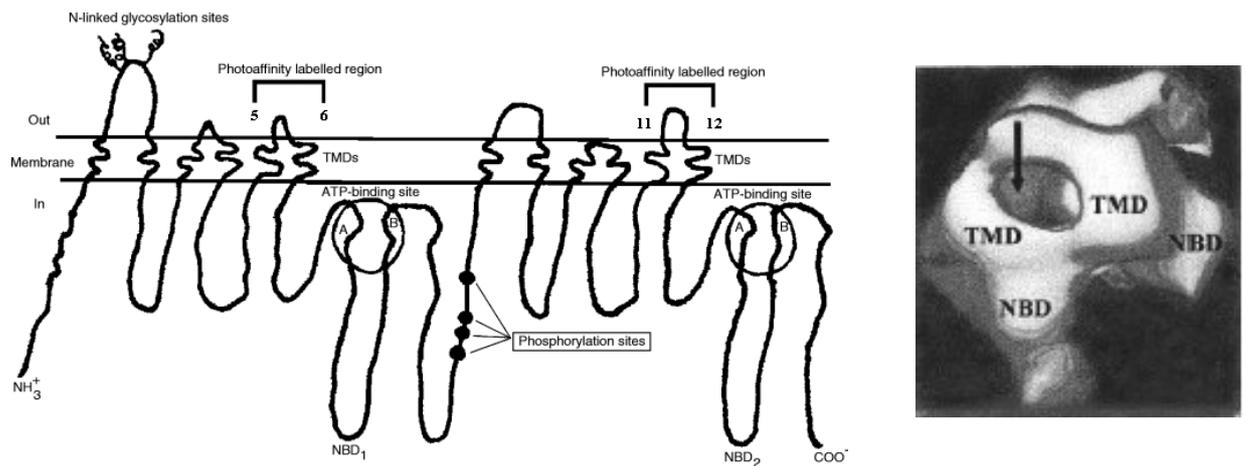


Abbildung 5

Zweidimensionale Darstellung des P-gps und dreidimensionale Ansicht^{91,39}. Die transmembranären Domänen bilden eine offene Pore (Pfeil). TMD = transmembranäre Domäne, NBD = Nukleotid-bindende Region

Allerdings erschließt sich aus dieser physiologischen Funktion des P-gps eine neue Problematik. Eine Hemmung dieses Membrantransporters erscheint durch sein rezistentausbildendes Potenzial legitim. Doch konnte an Knockout-Mäusen ($mdr1a^-/mdr1b^+$, $mdr1a^+/mdr1b^-$, $mdr1a^-/mdr1b^-$, $mdr1a^+/mdr1b^+$) bei denen entweder das murine $mdr1a$ oder das $mdr1b$ Gen oder beide Gene nicht exprimiert oder abgelesen wurden, ein erhebliches Defizit bei der Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Exkretion verschiedenster Substanzen festgestellt werden. Vor allem machte sich bei den Knockout-Mäusen das Defizit in einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke bemerkbar¹⁰⁰. Einige Zellgifte wie Vinblastin führten bei den Knockout-Mäusen verglichen mit den Kontrolltieren zu einer doppelt so hohen Konzentration im Gehirn. Hierbei waren sowohl das $mdr1a$ als auch das $mdr1b$ Gen für einen gesunden Zustand der Mäuse notwendig^{99,102}. Die Expression des MDR1-Gens wird neben den zytotoxischen Substanzen und Chemotherapeutika unter anderem auch noch durch „Hitze-Schock“ und einem niedrigen extrazellulären pH-Wert stimuliert. Ähnliche Versuche führte *Unadkat* auch mit P-gp Inhibitoren und dessen Modulator Verapamil an der humanen Plazenta durch¹²⁵.

Eine effektive und gleichzeitig selektive Hemmung des P-gps ist in der Tumorthherapie und der antiretroviralen Therapie des HIV absolut erstrebenswert, doch sollte auch die physiologische Funktion dieses Transporters nicht außer Acht gelassen werden.

2.2.4. Das Multidrug-resistance-associated-Protein (MRP)

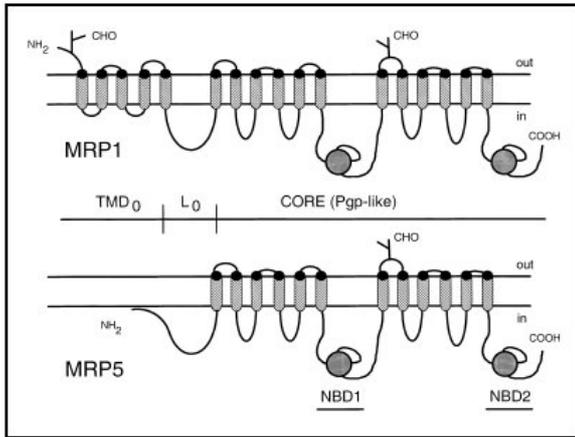


Abbildung 6

Vereinfachte schematische Darstellung des MRP1 mit zusätzlicher transmembranärer Domäne (TMD₀) und MRP5 als Beispiel eines Vertreters der MRP-Familie, dem diese Domäne fehlt. Normalerweise formen die transmembranären Domänen, ähnlich dem P-gp, eine Pore (Abbildung 4). CHO = Kohlenhydratketten, L₀ = Linker-Region (verbindende Domäne), NBD = Nukleotid-bindende Domäne^{6,39}

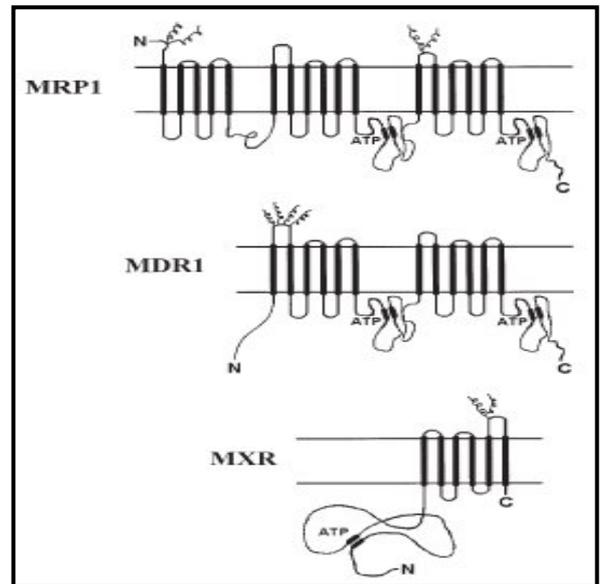


Abbildung 7

Vergleichende Darstellung von MRP1, MDR1 und MXR. Zu erkennen ist die Abnahme der transmembranären Domänen von MRP1 zu MXR. Während der N-Terminus im MRP1 außerhalb der Zelle liegt, befindet er sich in den anderen Transportern intrazellulär. Beim MXR ist seine reverse Anordnung erkennbar. Im Gegensatz zu allen anderen Transportern, befindet sich die Nukleotid-bindende Domäne vor der transmembranären Domäne⁷⁷.

Der zweite, für die Entstehung der MDR, bedeutsame ABC-Transporter wurde 1992 von *Cole et al.* in Doxorubicin-resistenten Lungenkarzinomzellen entdeckt und beschrieben, das Multidrug-resistance-associated Protein (MRP)¹⁴. Aufgrund der Entdeckung homologer MRP-Typen, bekam das von *Cole* gefundene MRP Gen den Terminus MRP1. In Folge der stetigen Erweiterung der Mitglieder der ABC-Transporter Superfamilie, wurden neue Nomenklatureschemata eingeführt (Tabelle 2). Eine komplette Übersicht über die neue als auch über die alte Nomenklatur findet sich auf folgender Internetseite: <http://www.gene.ucl.ac.uk/users/hester/abc.html>. MRP1 besitzt ein Molekulargewicht von 190 kDa, und zeigt zu P-gp eine nur 15%ige Homologie, ist aber ähnlich ubiquitär im Organismus verbreitet. Es ist auf dem Chromosom 16 lokalisiert⁷⁵. Mittlerweile wurden sechs weitere Homologe des MRPs beschrieben (MRP2-7, Tabelle 2)⁶, die mit MRP1 eine 34-58%ige Übereinstimmung aufweisen. Kürzlich konnte diese Reihe um noch zwei weitere Mitglieder ergänzt werden, das MRP8 und das MRP9. Ihre Bedeutung im

2. Grundlagen

physiologischen Kontext wurde noch nicht evaluiert, doch weisen sie wohl eine hochgradige Ähnlichkeit mit MRP5 auf^{12,72}. Im Vergleich zu P-gp besitzen die MDR assoziierten Proteine MRP1, 2, 3 und 6 eine zusätzliche N-terminale Domäne, die als TMD 0 bezeichnet wird und aus fünf transmembranären Regionen besteht. Eine zusätzliche ATP-Bindungsstelle liegt jedoch nicht vor. Die TMD 0 scheint wichtig für die Affinität zu organischen Anionen zu sein, die zu einem großen Teil von diesen Strukturen transportiert werden⁶. Beim Substrattransport spielt sie allerdings wohl aufgrund der fehlenden ATP-Bindungsstelle eine untergeordnete Rolle⁶. MRP1 besitzt zwölf potenzielle Glykosylierungsstellen, für die bis jetzt, wie auch für das P-gp, noch keine funktionsträchtigen Eigenschaften gefunden wurden¹. Andererseits scheint eine Phosphorylierung des MRP1-Proteins wichtig für seine Transportfunktion zu sein²⁸, was seine Zugehörigkeit zu den ABC-Transportern offensichtlich macht. MRP1 besitzt neben dem Transport organischer Anionen, die Fähigkeit verschieden neutrale, an Glutathion konjugierte Stoffe zu transportieren und fungiert damit als ausgesprochene Glutathion-S-Konjugat Pumpe (GS-X)⁵² (Abbildung 8). Außerdem vermag es Glucuronate, Gallensalze und Sulfat-Konjugate zu transportieren (Tabelle 2). Dies erklärt seine Fähigkeit sogar Substanzen wie Arsenit oder auch Methotrexat aus der Zelle zu transportieren und somit deren intrazelluläre Konzentration zu verringern⁶. Wobei Methotrexat als organisches Anion und Arsenit an Glutathion konjugiert transportiert wird. Die Substratspezifität des MRP1 ist trotz der geringen Homologie zu P-gp diesem ähnlich. Erkenntnisse von Jones belegten beispielsweise auch für den MRP1-Transporter einen Efflux von HIV-Proteaseinhibitoren aus CD4-Zellen⁵⁴. Doch existieren auch einige Unterschiede. Wie erwähnt ist das MRP ein Transporter für lipophile, organische und amphiphile Anionen. Diese Fähigkeit des Anionentransports besitzt das P-gp nicht, kann aber dafür amphiphile Kationen expedieren.

2. Grundlagen

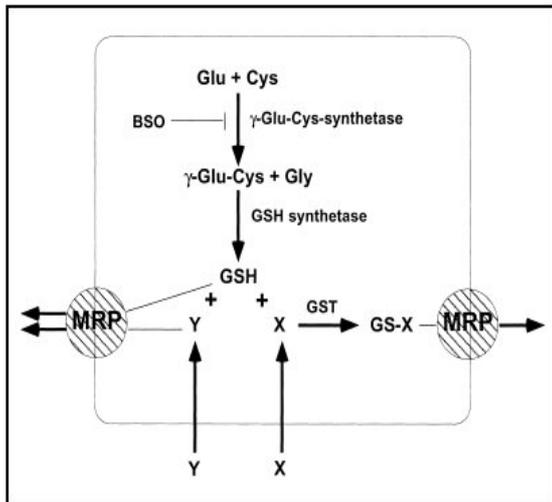


Abbildung 8

Schematische Darstellung des Transportes von Arzneistoffen und Xenobiotika über MRP. Gezeigt ist sowohl der Transport in Konjugation mit GSH über die Glutathion-S-Transferase (GST), als auch der unkonjugierte Transport⁶.

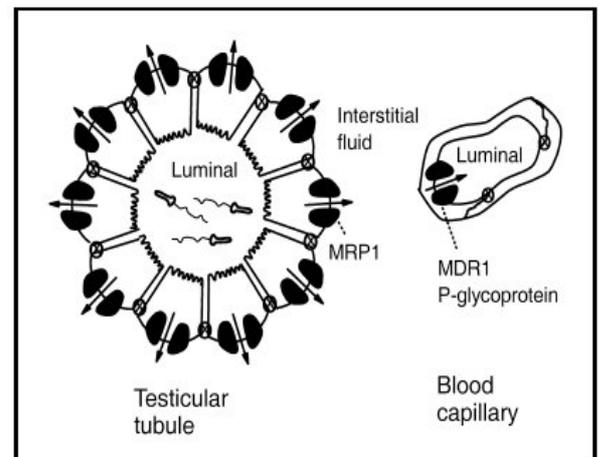


Abbildung 9

Lokalisation des MRP1 und P-gps am Beispiel der Blut-Testis-Schranke, ⊗ = tight junctions⁶

Schon lange bevor das MRP1 Gen entdeckt wurde, gab es Hinweise auf einen organischen Anionentransporter in Hepatozytenmembranen. Dieser Transporter wurde aufgrund dessen als „canalicular multispecific organic anion Transporter (cMOAT) bezeichnet. Durch das Bekannt werden des MRP-Gens, wurde dieser Transporter aufgrund seiner Eigenschaften den MRP-Typen zugeordnet und fortan MRP2 genannt. Auch MRP2 ist in der Lage, Resistenzen gegen einige Zytostatika wie Methotrexat, Cisplatin, Doxorubicin, u.a. zu erzeugen¹⁶. Neuerlich Studien ergaben auch eine Ausbildung einer Resistenz gegen Mitoxantron⁶. Bis auf die Cisplatin-Resistenz, die nur MRP2 nicht aber MRP1 zeigt⁸³, wird in Studien von *Borst* angenommen, dass sich das Resistenz-Spektrum des MRP2s mit dem des MRP1 weitestgehend deckt⁶. MRP2 findet sich vor allem in der Leber, den Nieren und im Intestinum und ist ebenso wie das P-gp auf der apikalen Seite von Membranen lokalisiert (Tabelle 2).

Der MRP-Subtyp, der mit 58% die höchste Strukturäquivalenz zu MRP1 bildet, ist das MRP3⁶³. Untersuchungen von *Kool* und *Hirohashi* zeigten, dass das MRP3 ebenfalls ein Transporter für organische Anionen ist^{47,62}. *Hirohashi* konnte weiterhin feststellen, dass MRP3 im Gegensatz zu seinen beiden Vorgängern Konjugate mit Glucuronsäure als Substrat bevorzugt⁴⁸. Da es sich als extrem schwierig erweist, transfizierte Zelllinien mit hohen MRP3 Expressionsraten zu erzeugen, können bisher wenig Aussagen über das wahre Ausmaß der MRP3 erzeugten Resistenz getätigt werden. Dies ist sogleich der

2. Grundlagen

Grund, weswegen bislang auch noch keine konkreten Aussagen zur physiologischen Funktion dieses Transporters gemacht werden konnten. Allerdings wurden schon Transportwege einiger weniger Zytostatika beschrieben⁶². MRP3 ist vorwiegend an der basolateralen Membran von Hepatozyten lokalisiert (Tabelle 2). Wahrscheinlich ermöglicht es dort einen Efflux organischer Anionen aus der Leber in das Blut, wenn die Sekretion in die Galle blockiert ist. Hinweise darauf geben Studien an der Leber cholestatischer Ratten. Diese Tiere zeigten einen massiven Anstieg der MRP3 Expression im hepatischen Gewebe⁸⁵. Gleiches stellten *Kool* und *König* anschließend auch an der humanen cholestatichen Leber fest^{60,62}.

Eine der interessantesten Entdeckungen in der Unterfamilie der MDR assoziierten Proteine ist das MRP4. Am häufigsten sind Transkripte dieses Transporters in der Prostata an basolateralen Membranen zu finden (Tabelle 2)⁶⁷. Vor einiger Zeit konnte festgestellt werden, dass dieser Transporter als Efflux-Pumpe für Nukleosidanaloga agiert. Ebenso konnten Resistenzausbildungen gegen Methotrexat bewiesen werden⁶⁷. Besondere Aufmerksamkeit gilt der Fähigkeit des MRP4s Resistenzen gegen nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren wie Azidothymidin (AZT) oder PMEA, eingesetzt bei der antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion, durch einen Efflux aus dem Intrazellularraum zu erzeugen¹⁰¹. Da es sich bei den genannten reversen Transkriptaseinhibitoren um organische Anionen handelt, gilt erwartungsweise auch das MRP4, wie seine Vorgänger, als Transporter der solchen. Außerdem erzeugt das MRP4 wahrscheinlich gegen zahlreiche Purinanaloga Resistenzen. Darunter auch einige Zytostatika wie das Thioguanin und das 6-Mercaptopurin⁶. Doch gilt diese Aussage bisher noch als hypothetisch. Eine weitere Vermutung besteht darin, dass das MRP4 bevorzugt Phosphat-Konjugate transportiert. Ob es ebenso GSH-, Glucuronid- und Sulfat-Konjugate transportiert ist noch nicht sichergestellt⁶. Seine physiologische Funktion ist unbekannt.

Das MRP5 besitzt ein dem MRP4 entsprechendes Resistenzausbildungsprofil, denn auch das MRP5 favorisiert Purin- und Nukleosidanaloga⁶³. Nach Studien von *Borst*, ist das MRP5 ebenfalls ein organischer Anionen- und GSH-Konjugat-Transporter und rechtfertigt damit seine Aufnahme in die MRP-Subfamilie. Bis auf einige Thiopurine, die als Chemotherapeutika von MRP5 transportiert werden¹³⁹, wuchs das Spektrum der Zytostatika, die MRP5 befördert, nicht weiter an. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass MRP5 vor allem eine Efflux-Pumpe für Nukleosidanaloga darstellt. *McAleer* stellte eine gewisse MRP5 vermittelte Resistenz gegen Schwermetalle fest⁸¹. Analysen von *Jedlitschky* über die mögliche physiologische Funktion des MRP5 und deren Rolle bei der Entstehung

2. Grundlagen

der MDR ergaben eine aktive Transportfunktion für cGMP und cAMP⁵³. Diese Erkenntnis weist nicht nur darauf hin, dass auch MRP5 bevorzugt Phosphat-Konjugate befördert, es könnte sich durchaus auch an einigen Prozessen der Signaltransduktion beteiligen. Die physiologische Funktion des MRP5s ist ebenso bisher noch ungeklärt. Allerdings blieben homozygote Mäuse mit ausgeschaltetem MRP5-Gen für mindestens ein Jahr gesund¹³⁹.

MRP6 zeigt die Eigenschaften eines amphiphilen Anionen-Transporters, der weder GSH- noch Glucuronat-Konjugate transportiert. Es wird vor allem in der Leber und den Nieren exprimiert. Wie das MRP1-Gen, ist auch MRP6 mit einem geringen Abstand zu MRP1 auf dem Chromosom 16 lokalisiert. Diese Tatsache bekräftigt die Vermutung, dass das MRP6-Gen zusammen mit MRP1 koamplifiziert wird und allein kaum eine Rolle bei der Resistenzbildung spielt⁶¹. Mittlerweile stellte sich heraus, dass ein genetisch bedingter Mangel an MRP6 zu Pseudoxanthoma elasticum (PXE) führt (Tabelle 2). PXE ist eine vererbliche degenerative Systemerkrankung elastischer Gewebe der Haut, der Augen und der Blutgefäße⁴, die oft schon im mittleren Erwachsenenalter zum Tod führt.

2.3. MDR-Modulatoren

Die am besten erforschte Target-Struktur auf dem Gebiet der MDR-Modulatoren, ist das MDR1 bzw. das P-gp. Eine Vielzahl von Substanzen mit den verschiedensten Strukturmerkmalen, wie es auch das Substratspektrum des P-gps aufweist, befinden sich derzeit in Untersuchungen und klinischen Studien. Aus diesem Grund existieren auch für das P-gp viel mehr Chemosensitizer, als für die anderen Mitglieder der ABC-Superfamilie, über die bei weitem noch nicht so viel in Erfahrung gebracht wurde. Oftmals wird deswegen in der Literatur der Übergriff MDR-Modulator, der eigentlich Chemosensitizer sämtlicher ABC-Transporter beinhaltet, nur für Modulatoren des P-gps gebraucht. Weil dies im Kontext der gesamten Multidrug-Resistance verwirrend ist und nicht nur das P-gp allein für deren Entstehung verantwortlich ist, soll diese Verallgemeinerung hier nicht verwendet werden.

MDR-Modulatoren (Chemosensitizer) sind Substanzen, die in der Lage sind, Bindungsstellen von Transportproteinen aktiv oder allosterisch zu besetzen und somit Arzneimitteln, wie Zytostatika oder auch HIV-Therapeutika, welche zumeist Substrate dieser Transportproteine darstellen, die Möglichkeit verschaffen, sich in der Zelle in angemessener Konzentration anzureichern, ohne einem Efflux in den Extrazellularraum zu unterliegen. Des Weiteren können einige MDR-Modulatoren die Beschaffenheit der Umgebung der Biomembran, in der sich der jeweilige Transporter transmembraner

2. Grundlagen

befindet, ändern und so den jeweiligen Arzneistoffen Zutritt in die Zelle verschaffen. Nicht zuletzt existiert ein indirekter Weg der Modulation durch Hemmung der Gen-Expression. Substanzen mit der zuletzt erwähnten Eigenschaft konnten bisher nur für das MDR1-Gen gefunden werden. Beispielsweise ist die Cyclooxygenase 2 ein Enzym, das neben der Entstehung entzündlicher Prozesse im Organismus auch an der Regulation der Expression des MDR1-Gens beteiligt ist. Diese Tatsache suggeriert für die sogenannten COX-2 Inhibitoren auch eine potenzielle Modulation der MDR1-Expression⁸⁶. Außerdem bietet sich die proteineigene ATPase als Angriffspunkt an, da die Hydrolyse des ATPs die nötige Energie für den Efflux von Substraten bereitstellt. Wird die ATPase gehemmt, oder werden die ATP-Speicher dieser Transportproteine geleert, führt dies auch zu einem weitgehenden Funktionsverlust.

Die Blockade der Biosynthese von Transportproteinen durch sogenannte antisense Oligonukleotide könnte ein alternativer Angriffspunkt in der Überwindung der Multidrug-resistance werden. Mittlerweile wurden in Bezug auf die mRNA von MRP oder P-gp eine Reihe von Oligonukleotiden synthetisiert und es existieren bemerkenswerte *in vitro* Testergebnisse⁸⁰. Trotzdem scheint es auch mit dieser Methode bisher unmöglich, Therapieansätze zur vollständigen Überwindung der MDR zu etablieren¹⁸. Daher bleibt die Funktionsmodulation der Membran-Efflux-Pumpen auf molekularer Ebene die vielversprechendste Methode. Auch die sich bisher als außerordentlich schwierig erwiesene Strukturaufklärung dieser Proteine, könnte über die Affinität der Modulatormoleküle zur Targetstruktur erleichtert werden.

Weitere, sich in den Anfängen der Forschung befindliche, Ansätze zur Bekämpfung der MDR sind Hemmung der Glukosylceramid-Synthetase, die ungehemmt die Arzneistoff-induzierte Apoptose in Tumorzellen unterdrückt⁸⁹, Ultraschall, der eine schonendere Alternative bei der P-gp-Hemmung darstellen soll⁷⁴, pulsierende elektromagnetische Feldstimulation in Zellen⁴⁶, besseres Targeting der Membrantransporter durch Nanopartikel⁸ und Liposomen³¹ in Kombination mit Hyperthermia und die photodynamische Therapie¹²⁰.

Alles in allem steht aber die Synthese neuer Arzneistoffe, die keine Formen von Resistenz entwickeln und eine Prävalenz zu Strukturen der MDR aufweisen, im Vordergrund.

2.3.1. P-gp (MDR1)-Modulatoren

P-gp ist in der Lage Substanzen mit einer Größe von 200 bis 1800 kDa zu transportieren. Wie bei den P-gp Substraten ist auch das Spektrum seiner Modulatoren dementsprechend vielseitig. Kalzium-Kanalblocker, Calmodulin-Antagonisten, Protein-Kinase C-Inhibitoren, Flavonoide, Steroide, Indolalkaloide, polyzyklische Verbindungen, zyklische Peptide, Makrolide und HIV-Proteaseinhibitoren sind Substanzgruppen aus denen es Vertreter mit nachweisbarer P-gp Affinität gibt. Außerdem existieren noch zahlreiche andere Verbindungen, die nur zur Modulation des P-gps synthetisiert wurden und keiner anderen Stoffgruppe zugeordnet werden¹³⁴. Im Moment existieren drei Generationen von MDR1-Modulatoren. Die erste Generation beinhaltet all jene Substanzen, die ursprünglich für eine andere Indikationsstellung verwendet wurden. Dazu gehören zum Beispiel der Kalziumkanalblocker Verapamil oder das Immunsuppressivum Cyclosporin A. Da es sich bei diesen Substanzen oftmals um kompetitive Hemmer (Substrate) des P-gps handelt, sind hohe Plasmakonzentrationen für eine ausreichende Transporter-inhibition notwendig, die zeitweise über das toxisch tolerierbare Maß hinaus gehen. Hieraus und aus der Tatsache der eigentlichen Indikationsstellung dieser Modulatoren ergeben sich häufig unerwünschte Nebenwirkungen.

Die zweite P-gp-Modulator-Generation wurde entwickelt, um die Toxizität der Substanzen aus Gruppe eins zu mäßigen. Zumeist handelt es sich um Analoga der Stoffe aus der ersten Generation. Dexverapamil, dem R-Enantiomer des Verapamils, fehlen beispielsweise kardiovaskuläre Effekte, des Verapamils, die aber für eine P-gp-Hemmung unerwünscht sind. Gleiches gilt für PSC 833 (Valspodar[®]), die mit am besten erforschte Substanz der zweiten Generation von P-gp Modulatoren. Es weist als Cyclosporin A-Analogon keine immunsuppressiven Eigenschaften mehr auf¹²⁸. Viele dieser Vertreter fungieren aber oftmals an multiplen Membran-Transportern als Modulatoren, was aufgrund der bewiesenen physiologischen Eigenschaften dieser Strukturen den Efflux anderer Xenobiotika negativ beeinflussen kann und somit indirekt die Gesamtbelastung des Organismus durch Toxine steigert³. Eine kontrollierte bilaterale oder gar multiple Hemmung von Membrantransportern, ist bei einigen Krankheitsbildern mit immenser Resistenzentwicklung und bei der Substratüberschneidung einiger Chemotherapeutika mit verschiedenen Transportersystemen allerdings erstrebenswert. Valspodar[®] und Biricodar[®] sind die Vertreter dieser Gruppe, die bisher Einsatz in klinischen Studien bei der Krebstherapie erhielten. Leider bot eine Koadministration dieser Substanzen, zusammen

2. Grundlagen

mit einem durch P-gp transportierten Zytostatikum, nur einen geringen Therapievorteil¹². Möglicherweise liegt die Ursache für die eher schwache Wirkung in der eventuellen Funktionsübernahme anderer, durch diese Substanzen weniger beeinträchtigten, Transporter mit ähnlichem Substratspektrum.

Verbindungen der dritten Generation wurden entwickelt, um die Spezifität und intrinsische Aktivität zur Targetstruktur zu verbessern. Zu ihnen gehören unter anderen die Verbindungen Tariquidar[®], Laniquidar[®] und ONT-093.

Auch nach ihrer Wirkungsweise werden die P-gp Modulatoren eingeteilt. Hier existieren ebenso drei Gruppen. Zum einen hoch affine Substrate der Efflux-Pumpe außerdem effiziente Inhibitoren der P-gp eigenen ATP-Hydrolyse und letztendlich partielle Substrate. Ihre Wirkungsweise reicht von der direkten Bindung an das P-gp über die Unterdrückung der ATPase Aktivität bis hin zur Hemmung der Protein-Kinase C¹³⁴.

Einige der bekannten P-gp-Modulatoren weisen zugleich eine Cytochrom P3A4 Affinität auf¹³¹, so dass deren assoziierte Anti-Tumor-Substanzen häufig unkontrolliert in toxische Bereiche geraten und einer individuellen, patientenspezifischen Dosisreduktion bedürfen. Daher sollten potente P-gp Inhibitoren so wenig wie möglich mit dem Cytochrom P3A4 interagieren. Die Substanz, die dieses Kriterium bisher am besten erfüllt ist scheinbar das Zosuquidar[®] mit einem P-gp/CYP3A4 Verhältnis von ca. sechzig¹⁷. Es bindet damit also viel stärker an P-gp als an CYP3A4. Es besteht Hoffnung, dass unter Verwendung dieser Substanzen ein entscheidender Schritt in Richtung der Überwindung der MDR im Bereich der Chemotherapie getan wird, wohingegen die Forschung auf dem Gebiet der Überwindung der MDR bei HIV-Therapeutika immer noch stagniert. Gerade bei der Infektion mit dem HI-Virus können aufgrund des P-gps an der Blut-Hirn-Schranke antivirale Wirkstoffe wie Proteaseinhibitoren nicht in das ZNS gelangen, weil sie gute P-gp Substrate sind. So kann im Gehirn eine Art Virenpool entstehen, in dem sich die Viren ungehindert vermehren können. In Lymphozyten und Caco-2 Zellen konnten die Proteaseinhibitoren Ritonavir, Indinavir und Nelfinavir die Funktion des P-gps kompetitiv modulieren⁹⁰. Dabei war Ritonavir der potenteste P-gp Modulator der drei Proteasehemmer. Es zeigte sogar an der Blut-Hirn-Schranke eine sechsfach bessere Aktivität als das PSC833²³. Auf diesem Weg soll es gelingen über eine Koadministration von Saquinavir mit Ritonavir als P-gp Inhibitor, Saquinavir in Endothelzellen des Gehirns anzureichern⁵⁶. In verschiedenen Ländern der Welt, ist mittlerweile die Kombination von Saquinavir und Ritonavir in einem Präparat für HIV-Patienten zugelassen⁹. Wie erwähnt, kann allerdings die komplette Ausschaltung des P-gps an der Blut-Hirn-Schranke, bisher

2. Grundlagen

noch nicht abschätzbare Risiken bergen. Außerdem besitzt gerade das Ritonavir ebenso Affinitäten zum CYP3A4⁵⁶. Hilfreich könnte hierbei die Anwendung monoklonaler Antikörper in Erscheinung treten, da sie wahrscheinlich in der Lage sind, spezifisch an Transportproteine zu binden¹⁵. Auch die Nukleosidischen Transkriptase Inhibitoren unterliegen einer hohen Affinität zu Transportproteinen. Sie sollen zu einem hohen Maße

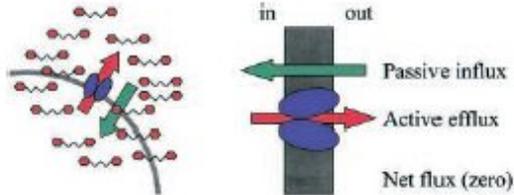


Abbildung 10

Darstellung nach *Litman*: Verapamil gelangt nach dem Efflux in den Extrazellularraum über die Plasmamembran durch „fast-diffusion“ umgehend zurück in die Zelle und besetzt dort abermals die P-gp Bindungsstellen⁷².

über das MRP4 transportiert werden¹⁰¹. Demzufolge unterliegen die HIV-Therapeutika in ausschlaggebendem Umfang der MDR. Eine Effektive Modulation solcher Strukturen würde für die Therapie dieser Infektion einen bahnbrechenden Fortschritt bedeuten. Der erste bekannte P-gp Inhibitor war das Verapamil. Verapamil besitzt die Fähigkeit die Akkumulation verschiedener Chemotherapeutika, wie Anthracycline und Vinca Alkaloide intrazellulär zu erhöhen¹⁰. Die Besonderheit des Verapamils liegt in seiner Eigenschaft, die P-gp eigene ATPase zu aktivieren. Es wirkt also auf katalytischer Ebene als Agonist, wohingegen es den Transport kompetitiv hemmt. Deswegen werden solche Verbindungen auch als partielle Agonisten des P-gps bezeichnet⁷². Neben der kompetitiven Hemmung des Transports kann das Verapamil aufgrund seiner Lipophilie auch die Transportaktivität des P-gps entkoppeln und damit einen sysiphusalen Kreislauf der ATP-Hydrolyse erzeugen, weil die durch die ATP-Hydrolyse erzeugte Energie nicht mehr für eine Substrattranslokation genutzt werden kann, sondern ständig an dem Transport des Verapamils verbraucht wird. Die Wirkungsweise dieses Prozesses ergründet sich aus den Eigenschaften des Verapamils. Durch seine hohe Lipophilie ist es in der Lage, besonders gut durch Plasmamembranen zu diffundieren. Es wird deswegen auch als „fast diffuser“ bezeichnet²⁵. Sobald das Verapamil über das P-gp aus der Zelle geschleust wurde, diffundiert es unverzüglich über die Plasmamembran zurück in den Intrazellularraum. Dort bindet es wieder an P-gp (Abbildung 10). Aus diesem Grund wird Verapamil als eine Standard-Substanz zum Vergleich mit anderen Inhibitoren mit potenziellem klinischem Einsatz genutzt, um deren Effektivität zu normieren.

Ein echter Antagonist hingegen hemmt sowohl die ATPase des Transporters als auch den Transport selber. Ein gutes Beispiel für eine solche Substanz sind die Vanadate, die das Spurenelement Vanadium enthalten. Sie binden an der katalytischen Seite der ATPase und

2. Grundlagen

hemmen diese somit. Vanadate operieren auf diese Weise als nichtkompetitiver Inhibitoren des P-gp-Transports⁷³.

Zu den partiellen Antagonisten zählt beispielsweise die Gruppe der Cyclosporine⁷². Auch sie besitzen die Fähigkeit, die ATPase des P-gps effektiv zu hemmen. Sie verlangsamen durch ihre Molekülstruktur und vor allem ihrer Molekülgröße die Funktionsweise dieser Membran-Efflux-Pumpe und agieren sozusagen als „obstruktiv“ wirkendes Substrat (Abbildung 11). Der bisher am besten charakterisierte Vertreter der Cyclosporine ist das

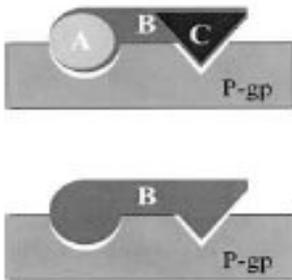


Abbildung 11

Große Moleküle (B) können mehr als eine Bindungsstelle besetzen. z. Bsp. die von Molekül A und C. Aus der Tatsache, dass Molekül B sowohl mit Molekül A als auch mit C um deren Bindungsstelle konkurriert, bedeutet nicht zwangsläufig, dass sich auch A und C in ihrer Bindungsspezifität überlappen, sondern durchaus unabhängig voneinander an ihren jeweiligen Bindungsstellen koppeln⁷².

PSC833 ein nichtimmunosuppressives Analogon des Cyclosporin A. Es inhibiert die ATPase des P-gps. Das Screening nach neuen Modulatoren, als auch nach kompetitivem oder nichtkompetitivem Verhalten von P-gp Modulatoren untereinander erweist sich wegen der multiplen Bindungsstellen des P-gps als schwierig, ist aber von entscheidender Wichtigkeit, um Rückschlüsse auf deren Bindungsverhalten ziehen zu können. Es könnte durchaus möglich sein, dass ein so großes Molekül, wie es das PSC833 vorweist, über mehrere Bindungsstellen hinweg bindet und somit mit anderen Modulatoren oder auch Substraten, die beispielsweise nur an einer Bindungsstelle koppeln in Konkurrenz tritt. Abbildung 11 veranschaulicht dieses Prinzip⁸⁴.

Trotz der Vielzahl an existierenden, potenten und weniger potenten Modulatoren dieser Membran-Efflux-Pumpe lassen sich doch einige strukturelle Voraussetzungen charakterisieren, die für eine gute Inhibierung des Transporters notwendig sind.

Das Molekül sollte von höchst lipophiler Natur sein und aus mindestens 18 Atomen bestehen, um eine starke Bindungsaffinität zu haben und um mehrere P-gp Bindungsstellen besetzen zu können^{103,134}. Auch ein planares Ringsystem soll von Vorteil sein¹⁰³. Doch konnten Studien unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass auch Moleküle mit nichtplanaren Ringsystemen bemerkenswert gute Modulationseigenschaften zeigen⁹². Außerdem sollte ein für den klinischen Einsatz kompetenter Inhibitor mindestens ein tertiäres Stickstoffatom im Molekül aufweisen, um gegebenenfalls bei physiologischem pH-Wert ein Kation formen zu können. Hierüber wird die Bindungsaffinität zum P-gp stark erhöht, da neben Wasserstoffbrückenbindungen auch Ionenbeziehungen zur Membran-Efflux-Pumpe möglich sind¹³⁴. Zwar existieren auch Substanzen mit P-gp Affinität, die kein

2. Grundlagen

tertiäres Stickstoffatom im Molekül vorweisen. Jedoch können diese in ihrer Effektivität der Hemmung nicht an das Potenzial von Substanzen heranreichen, welche dieses Kriterium erfüllen¹³⁴.

2.3.2. Modulatoren des MRP

Erkenntnisse über Modulatoren des MRPs sind bisher bei weitem nicht so transparent, wie es bei den MDR1 affinen Chemosensitizern der Fall ist. Einige Pyridin-Carboxylate sind in der Lage, sowohl das P-gp als auch MRP in *in vitro* Modellen zu inhibieren¹¹. Reine MRP-Modulatoren sind bisher unbekannt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass weiterführende Studien an einigen P-gp Modulatoren sowie an organischen Anionen vielversprechendere Ergebnisse liefern. Der Leukotrien-Rezeptor 4-Antagonist MK571 ist in der Lage den Substanztransport über das MRP zu verlangsamen und wird daher als einer der Ausgangsstoffe zur Erkundung der Möglichkeit einer effektiven MRP-Inhibition genutzt³³. Da zahlreiche Tumoren neben P-gp ebenfalls MRP exprimieren, bieten sich Screenings auch auf MRP-Modulatoren an. Eine spezifische Hemmung beider Transporter in Tumorzellen könnte einen bedeutenden Fortschritt nicht nur in der zytostatischen Therapie bedeuten.

2.4. Die Rolle von Membrantransportern im Intestinalepithel

Es existieren zwei Haupttrouten zur Überwindung des intestinalen Epithels. Einige Substanzen nutzen den parazellulären Weg. Andere ziehen aufgrund ihrer Beschaffenheit den transzellulären Weg vor. Zum parazellulären Transport zählt man die passive Diffusion und den konvektiven Flüssigkeitsstrom. Er erfolgt zwischen aneinandergrenzenden Enterozyten. Der transzelluläre Transport hingegen beinhaltet den Rezeptor-vermittelten Transport, die Rezeptor-vermittelte Transzytose, die passive Diffusion von Molekülen durch Epithelzellen und die erleichterte Diffusion, die einfachste Form des Carrier-vermittelten Transports, welcher nicht entgegen eines Konzentrationsgefälles verläuft und daher auch keine Energiequelle wie ATP benötigt.

Allgemein hängt die Absorption von Arzneistoffen im intestinalen Epithel von deren chemischen Eigenschaften ab. Absorptionsprozessen im Darm liegt im Normalfall die passive Diffusion zugrunde. Die intestinale Membran wird in der Regel von lipophilen Stoffen erheblich leichter passiert als von hydrophilen, da sie besser in die Lipid-Bilayer der Membran permeieren. Sie werden so über die Epithelzellen absorbiert. Hydrophile Stoffe, insofern sie ein sehr kleines Molekulargewicht (< 200) aufweisen, finden ihren

2. Grundlagen

Weg eher durch den Interzellularraum oder die tight junctions. Die tight junctions sind Proteinkomplexe, die über die angrenzende Epithelzellen miteinander verbunden sind. Sie bestehen aus fünf verschiedenen Einheiten, die beim Menschen eine 4-8 Å große Pore bilden⁶⁹ und stellen in Verbindung mit Aktin eine Größen- und Ladungsbarriere dar.

Unabhängig davon existieren an den Membranen der Enterozyten im Darm spezifische Transportsysteme, die dem Gewebe die Aufnahme wichtiger Nährstoffe aus Nahrungsbestandteilen und anderem erleichtern¹⁰⁹. Auch diese Transporter besitzen ein breites Substratspektrum. Infolge dessen erkennen sie Substanzen als Substrate, die keine essentiellen Nahrungsbestandteile sind. Im Kontrast hierzu befinden sich im intestinalen Epithel Strukturen, die gezielt für die „Abschwächung“ von Xenobiotika und deren Rücktransport in den Extrazellularraum sorgen. Beispielsweise befindet sich das CYP3A Protein nicht nur an der Leber, sondern auch im Intestinum. Die CYP3A Sequenz der intestinalen cDNA gleicht hierbei sogar der hepatischen cDNA dieses Proteins⁷⁹. Es katalysiert den Metabolismus vieler klinisch relevanter Arzneistoffe unter anderem von Chemotherapeutika, Antiarrhythmika und Kalzium-Kanal-Blockern. Allerdings nimmt seine katalytische Aktivität entlang des intestinalen Gewebes in Richtung Kolon ab¹³⁰. Ganz anders verhält es sich beim MDR1-Protein. Seine Expressionsrate nimmt in gleicher Richtung zu, um im Kolon letztendlich den höchsten Level zu erreichen³⁰. Dass das P-gp im Intestinum eine entscheidende Resorptionsbarriere darstellt, konnte *Kim* am Beispiel der HIV-Proteasehemmer Indinavir, Nelfinavir und Saquinavir beweisen. P-gp knockout Mäuse *mdr1a* (-/-) zeigten verglichen mit der Kontrollgruppe *mdr1a* (+/+) schon vier Stunden nach oraler Administration eine höhere Plasmakonzentration dieser Arzneistoffe⁵⁸. Wie die unzureichende Substratspezifität vermuten lässt, überschneidet sich das CYP3A diesbezüglich mit dem P-gp. In Tabelle 4 sind einige Arzneistoffgruppen mit Beispielen zusammengetragen, die entweder P-gp und CYP3A Inhibitor, Substrat oder beides sind.

2. Grundlagen

Tabelle 4

Einige Arzneistoffgruppen mit Beispielen, die sowohl entweder CYP3A- und P-gp-Substrat, -Inhibitor oder beides sind

Arzneistoffgruppe	Substrat	Inhibitor
HIV Proteaseinhibitoren		
Saquinavir	x	x
Ritonavir	x	x
Nelfinavir	x	x
Indinavir	x	x
Hormone		
Progesteron		x
Testosteron		x
Hydrocortison	x	x
Immunsuppressiva		
Cyclosporin	x	x
Sirolimus	x	
Chemotherapeutika		
Vinblastin	x	
Doxorubicin	x	
Antiarrhythmika		
Amiodaron		x
Lidocain		x
Kalziumantagonisten		
Verapamil	x	x
Nifedipin		x
Nicardipin	x	x
Diltiazem	x	x
Antimykotika		
Ketoconazol		x
Itraconazol		x

Inzwischen gilt es als begründet, dass im Intestinum eine ganze Reihe von Proteinen exprimiert werden, die die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen herabsetzen. Das Vorkommen des MRPs im gesamten Intestinum mit höchsten Expressionsraten im Jejunum gilt als gesichert¹. Allerdings existieren kaum aussagekräftige Studien mit entsprechenden Substraten und Inhibitoren, wie das beim P-gp und dem CYP3A der Fall ist. Im Laufe dieser Arbeit, wurde diese Problematik aufgegriffen, um neben Aussagen über neuartige Inhibitoren des P-gps, auch erste Ergebnisse über Inhibitoren des intestinalen MRPs zu präsentieren. Aufgrund des breiten, sich überschneidenden

2. Grundlagen

Substratspektrums der erwähnten Proteine, bleibt die Suche nach potenten, transporterselektiven Inhibitoren auch im Intestinum schwierig aber absolut erstrebenswert, um eine therapeutisch gut kontrollierbare und gezielte Inhibierung von bioverfügbarkeitsmindernden körpereigenen Strukturen zu erreichen^{119,145}.

2.5. HIV-Proteaseinhibitoren

Die HIV-Protease ist ein Enzym, das vor allem in der Spätphase der viralen Replikation seine Aktivität entfaltet. Dieses Enzym spaltet ein großes Vorläuferprotein in verschiedene kleinere für das Virus wichtige Proteine. Die Proteaseinhibitoren (PI) verhindern diese Spaltung. Das Ergebnis sind inaktive, defekte Viruspartikel. Die PI besitzen ein außerordentlich hohes antiretrovirales Potential und sind auch in der Spätphase der Infektion ebenso bei unvorbehandelten Patienten noch gut wirksam.

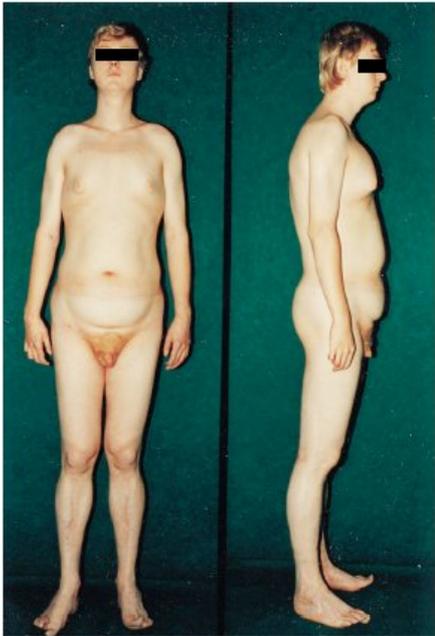


Abbildung 12

Lipodystrophie- und Lipogynäkomastie-Syndrom (Quelle: Der Hautarzt, Springer-Verlag Heidelberg)

PI werden in einer Kombinationstherapie angewandt, um Resistenzausbildungen längstmöglich hinauszuzögern. Resistenzen treten bei den PI nur innerhalb ihrer Gruppe auf. Kreuzresistenzen zu anderen Hemmstoffgruppen sind nicht bekannt.

Das Hauptproblem der gegenwärtig verwendeten peptidischen HIV-Proteaseinhibitoren, ist deren äußerst schlechte orale Bioverfügbarkeit. Saquinavir zeigt eine orale Bioverfügbarkeit von nur 4%. Außerdem stellen die selten unter 98% liegenden Plasma-Eiweiß-Bindungen, die mit ca. 10000 Dollar pro Jahr und Patient immensen Kosten, das breite Nebenwirkungsspektrum, welches unter Umständen zum Abbruch oder Wechsel der Therapie führt (Bsp.: Lipodystrophie-Syndrom, Abbildung 12), und die bei Dauertherapie häufig auftretenden Resistenzen die

gravierenden Nachteile dieser Substanzgruppe dar.

Die Kombination mehrerer PI kann zur Steigerung der Bioverfügbarkeit einzelner Vertreter führen. Beispielsweise ermöglicht eine Kombination von Ritonavir mit Saquinavir, für die es in Deutschland noch keine Zulassung gibt, die Erhöhung der Bioverfügbarkeit und der Halbwertszeit von Saquinavir. Beide Substanzen wurden daher in unseren Studien zum Vergleich ihrer Membran-Pumpen-Affinität mit neuartigen HIV-

2. Grundlagen

Proteaseinhibitoren eingesetzt. Die Klasse der HIV-PI gliedert sich in peptidische und nichtpeptidische PI auf. Zu den peptidischen gehören die bisher klinisch angewandten Stoffe wie Saquinavir, Nelfinavir, Indinavir, Ritonavir und ähnliche. Für die Resistenzausbildungen gegen sie zeichnet sich vor allem das P-Glykoprotein als Membran-Efflux-Pumpe verantwortlich.

Die nichtpeptidischen PI teilen sich untereinander nochmals in drei Klassen auf. Zu ihnen gehören die zyklischen Harnstoffe (DMP323, DMP450) und die 4-Hydroxycumarine (Warfarin und die sich daraus ableitenden, mit verbesserter inhibitorischer Aktivität ausgestatteten Derivate Tipranavir und PNU96988). Doch auch diese zeichneten sich zumeist durch unzureichende Bioverfügbarkeiten und zu hohe Plasma-Eiweiß-Bindungen aus. Hinzu kamen enttäuschende Ergebnisse in Zellkulturen und eine starke oxidative Metabolisierung. Die unbefriedigenden nichtpeptidischen Alternativen zu den peptidischen PI führten zu Überlegungen völlig neuartiger Strukturen, um das vielversprechende Prinzip dieser Stoffgruppe aufrecht zu erhalten. Nachdem durch röntgenstrukturanalyse die C_2 -Symmetrie des aktiven Zentrums der HIV-Protease beschrieben wurde^{41,81,140}, entwickelte man analog symmetrische Inhibitoren, wie die zyklischen Harnstoffe, die allerdings in klinischen Studien durch unzureichende Bioverfügbarkeiten, zu starker Metabolisierung und zu hohe Plasmaproteinbindung scheiterten. Eine Weiterentwicklung symmetrischer Strukturen führte über die Dimerisierung von 4-Aryl-1,4-Dihydropyridinen zu einer neuen Klasse nichtpeptidischer PI. Die dimeren 4-Aryl-1,4-Dihydropyridine stellen die dritte Klasse nichtpeptidischer HIV-1 Proteaseinhibitoren dar. Im Vergleich zu den peptidischen PI zeichnen sich die dimeren 1,4-Dihydropyridine durch eine extrem ökonomische Herstellung aus. Die Eigenschaften der Dihydropyridine beinhalten die Nachteile ihrer Vorgänger nicht und geben Hoffnung, dass diese Substanzklasse neben ihrem HIV proteaseinhibitorischen Potenzial äußerst potent in die Modellierung von Membran-Transportern eingreift.

2.5.1. Dimere 4-Aryl-1,4-Dihydropyridine

Die 4-Aryl-1,4-Dihydropyridine stellen die dritte Klasse nichtpeptidischer, symmetrischer HIV-1 Proteaseinhibitoren dar. Sie wirken in submikromolekularen Konzentrationen und besitzen daher bislang ein moderates proteaseinhibitorisches Potenzial. Änderungen im Substitutionsmuster konnten Inhibitionsraten der HIV-Protease von bis zu 70% der Aktivität des Saquinavirs erreichen. Die Hemmung der HIV-Protease erfolgt kompetitiv⁴⁰.

2. Grundlagen

Studien dieser Arbeit belegen für einige dieser Dihydropyridine eine effiziente P-gp und MRP modulatorische Aktivität. Erste strukturell variierte Vertreter dieser Stoffgruppe wiesen keinerlei pharmakologische Eigenwirksamkeit auf, zeigten eine äußerst geringe Zytotoxizität, keine messbare Plasma-Eiweißbindung und eine nur sehr geringe

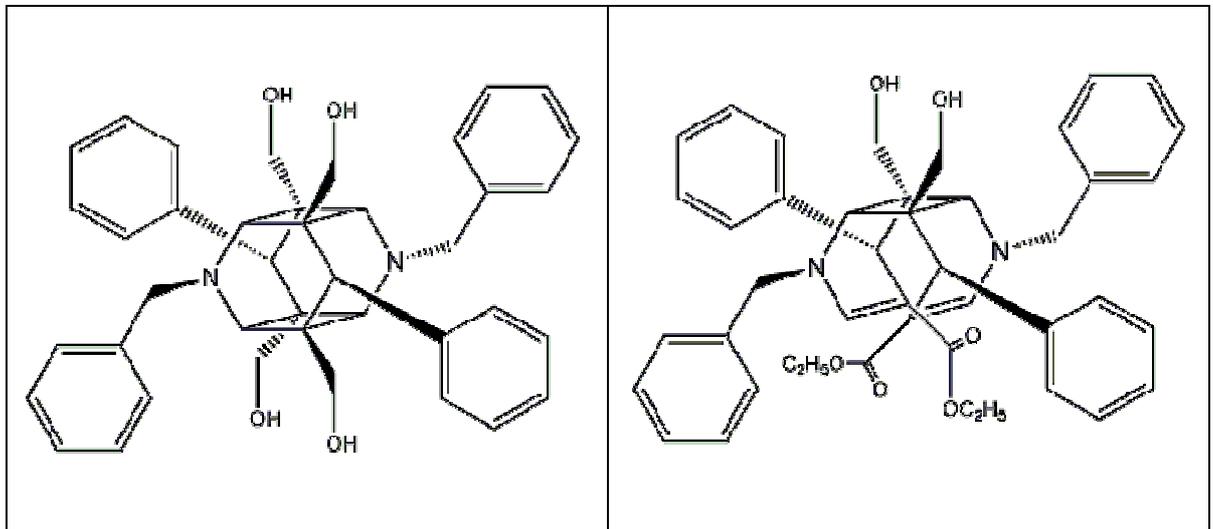


Abbildung 13

Das dimere 1,4-Dihydropyridin H17 (3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan) links und H19 (Diethyl-1,5-dibenzyl-1, 5, 8, 8b β -tetra-hydro-4a β , 8a β -dihydroxymethyl-4,8-diphenylcyclobuta[1,2-b:3,4-b']dipyridin-3,7(4H,4b β H)dicarboxylat) rechts.

Metabolisierung⁴⁴. Für das in den Studien dieser Arbeit hauptsächlich eingesetzte dimere Dihydropyridin H17 zeigten Metabolisierungsuntersuchungen an HepG2-Zellen, die die metabolischen Aktivitäten in Hepatozyten simulieren⁴⁴, keine Phase-I Metaboliten und eine sehr geringe Phase-II Metabolisierung⁴⁰. Solche Eigenschaften können eine effektive MDR-Therapie mit hohen Dosierungen bei Krebs und antiretroviralen Erkrankungen ermöglichen⁴⁴. Gerade bei der antiretroviralen Therapie zeigten jüngste Untersuchungen, dass für das Entstehen zunehmender Resistenzen, die Expression von MRP4 verantwortlich ist¹⁰¹. Da auch die Aussichten, die in die Fusionsinhibitoren (z.B. T720–Imatinib[®]) als effektive HIV-Therapeutika gelegt wurden, aufgrund von schnellen Resistenzentwicklungen in klinischen Studien, enttäuschten und eine Anwendung nur in Kombinationstherapien möglich ist, bringen die dimeren 1,4 Dihydropyridine neue Hoffnung den genannten Membran-Efflux-Pumpen und somit der Ausbildung körpereigener Resistenzen effektiv entgegenzuwirken. Strukturbeispiele für ein solches dimeres 1,4-Dihydropyridin sind in Abbildung 13 dargestellt.

3. Zielstellung

Zahlreiche Arzneistoffe zur Behandlung von Krebs und viralen Erkrankungen unterliegen einem körpereigenen Resistenzmechanismus, der als Multidrug-Resistance bezeichnet wird. Hiermit werden vor allem exsorptive Membrantransporter in Verbindung gebracht, die dazu befähigt sind eine Vielzahl von Substanzen aus den betroffenen Zellen zu entfernen und sie somit unwirksam zu machen. Ein Beispiel dafür ist die so genannte Membran-Efflux-Pumpe P-gp, die in der Lage ist, ein breites Spektrum an Arzneistoffen durch den beschriebenen Efflux zu inaktivieren. Darunter befinden sich neben HIV-Proteaseinhibitoren ebenso viele Zytostatika^{13,27,54,58,70,114}. Auch die Gruppe der Multidrug-Resistance associated Proteins (MRPs) ist ein weiteres Beispiel für das Entstehen körpereigener Resistenzausbildungen⁷². Neben einigen erst in jüngerer Vergangenheit beschriebenen Membranstrukturen, wie das MXR und das LRP, sind diese beiden Transportersysteme bisher am meisten erforscht. Die Überwindung der MDR und die damit verbundene effektivere Behandlung von vor allem HIV und Krebs ist Ziel zahlreicher Forschungsvorhaben und stand auch im Mittelpunkt dieser Arbeit. Ziel dieser Arbeit war es deswegen die bestehende Stoffklasse der dimeren 1,4-Dihydropyridine, die ursprünglich als neue Klasse nichtpeptidischer HIV-PI entwickelt wurden, auf eine Affinität vor allem zu den zwei beschriebenen Membranstrukturen, an verschiedenen etablierten Modellen zu testen und bei aufgezeigter Wirksamkeit über Struktur-Wirkungsbeziehungen eine ideale Molekülstruktur zu beschreiben. Gleichzeitig sollten über die Testung der Symmetrieeigenschaften der Substanzen Aussagen zur möglichen Struktur bzw. potenziellen Bindungsregionen des P-gps abgeleitet werden, um somit einen möglichen Beitrag zur Aufklärung der kontrovers diskutierten Symmetriemodelle des P-gps leisten zu können¹⁴¹. Des Weiteren sollten Untersuchungen zur Zytotoxizität der eingesetzten Stoffe vorgenommen werden, um deren klinische Einsatzfähigkeit zu unterstützen. Durch einen Radioliganden-Bindungsassay wurden erste Erkenntnisse zur P-gp Affinität gewonnen. Anschließend sollten mit Hilfe von P-gp und MRP-exprimierenden Zellen diese Affinitäten auf ein mögliches inhibitorisches Potenzial untersucht und in einem weiteren etablierten *in situ* Modell, dem perfundierten Rattendarm, erste Einblicke zur Wirksamkeit der Substanzen im Organismus erhalten werden. Abschließend sollten die wirksamsten Verbindungen dahingehend getestet werden, ob sie nun reine Modulatoren

3. Zielstellung

der targetierten Strukturen darstellen, oder ob sie auch Substrateigenschaften besitzen, und wenn ja zu welchem Ausmaß.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. P-gp Affinitätsstudien verschiedener HIV-Proteaseinhibitoren als potenzielle MDR-Modulatoren *in vitro*

4.1.1. Radioliganden-Bindungsassay

Der vom *Döppenschmidt* (1998) entwickelte und von *Dressler* (2002) modifizierte Radioligandenbindungsassay beruht auf der Erfassung der Verdrängung der radioaktiv markierten Substanz, in diesem Fall ^3H -Verapamil, durch die jeweilig nicht markierten Substanzen und deren sich daraus errechenbaren P-gp Affinität^{20,22}. Untersuchungen von *Yamashita* (2000) und *Dressler* (2002) bewiesen eine mögliche Abhängigkeit der Bindung des Radioliganden durch Lösungsmittelzusätze (Ethanol, Acetonitril, DMSO ab >2% u.a.) und pH-Wert Veränderungen^{22,142}. Lösungsvermittler und pH-Wert Änderungen dienen mitunter zur Verbesserung des Lösungsverhaltens mancher schwerlöslicher Arzneistoffe. Die hier beim Radioligand-Bindungsassay eingesetzten Substanzen wiesen größtenteils bei pH 7,0 eine ausreichende Löslichkeit auf, so dass sie ohne Zusatz von Kosolventien der

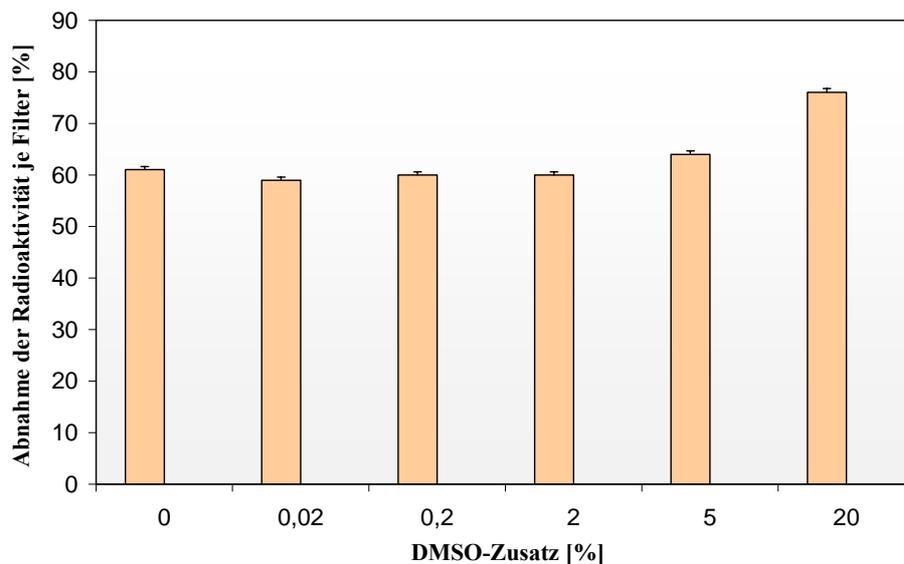


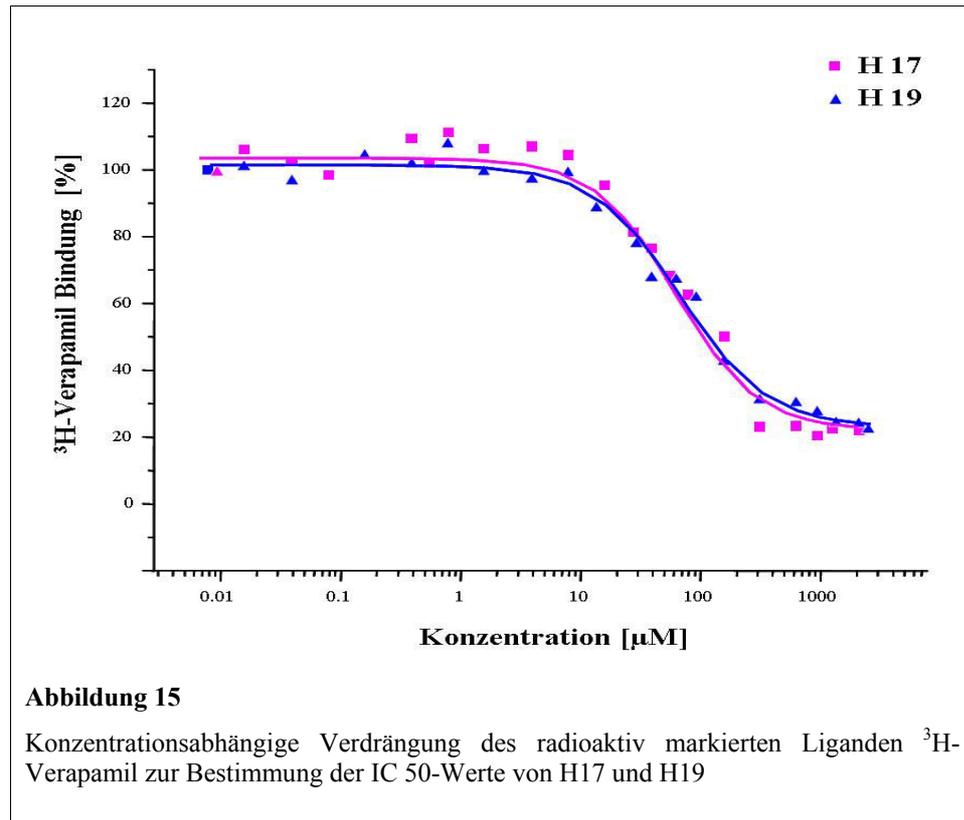
Abbildung 14

Änderung der ^3H -Verapamil-Bindung an P-gp durch Zusatz von DMSO in verschiedenen Konzentrationen (Mittelwert \pm SEM für n=2 Versuche p<0,05)

4. Ergebnisse und Diskussion

Messung zugeführt werden konnten. Aufgrund ihrer äußerst lipophilen Struktur zeigten lediglich die dimeren 1,4-Dihydropyridine ein schlechtes Lösungsverhalten beim angegebenen pH-Wert auf. Dieses Problem konnte durch einen Zusatz von 1% DMSO behoben werden. Um die Unbedenklichkeit des Lösungsvermittlereinsatzes zu versichern, wurde in weiterführenden Untersuchungen zu *Dressler* eine separate Testreihe durchgeführt, in der sämtliche beim Assay eingesetzte Substanzen unabhängig ihrer Löslichkeit den Zusatz von 1%iger DMSO-Lösung erhielten. Hierdurch konnte im direkten Vergleich bestätigt werden, dass der Zusatz von DMSO in der angegebenen Konzentration keinen Einfluss auf die Messergebnisse hatte, weil zwischen beiden Versuchsreihen bis zu einer DMSO Konzentration von 2% keine signifikanten Unterschiede bei der Bindung des Radioliganden zu verzeichnen waren und ein Einsatz des Lösungsvermittlers in diesen Konzentrationsbereichen daher als unbedenklich einzustufen ist. Eine Menge von bis zu 5% DMSO war sogar tolerierbar (Abbildung 14).

Zur Bestimmung der P-gp-Affinität wurden die dimeren 1,4-Dihydropyridine und die Vergleichssubstanzen in 20 verschiedenen Konzentrationen bei einer beständigen Konzentration des markierten Radioliganden ^3H -Verapamil bei pH 7,0 im Inkubationspuffer gelöst. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 37°C^{43} . Die Verdrängungsexperimente ergaben die erwarteten verschiedenen Affinitäten der getesteten Substanzen zum Membrantransporter P-gp. Das beste Bindungsverhalten zeigte Verapamil mit einem IC_{50} -Wert von $2\ \mu\text{M}$. Vinblastin, ein starker P-gp-Inhibitor, wies einen IC_{50} -Wert von $34\ \mu\text{M}$ auf und die dimeren 1,4-Dihydropyridine zeigten mit $78\ \mu\text{M}$ für H17 und $65\ \mu\text{M}$ für H19 (Abbildung 15) eine bemerkenswerte Affinität. In früheren Versuchen von *Döppenschmidt* konnte für den β -Blocker Talinolol, ein reines P-gp-Substrat, ein IC_{50} -Wert von $830\ \mu\text{M}$ gemessen werden²⁰, was das Ausmaß der Affinitäten der hier getesteten Substanzen zum P-gp verdeutlicht.



Bezugnehmend auf die Affinitätsintensität zur P-gp Bindungsstelle, ergab sich folgende Reihenfolge: Verapamil > Vinblastin > H19 > H17 >> Talinolol⁴³.

Auch hier erwies sich die in Arbeiten von *Dressler* und *Leisen* behandelte Abhängigkeit der Affinitäten zur makromolekularen Bindungsstelle des P-gps von der Lipophilie der Testsubstanzen als zutreffend^{22,68}. Der Radioligand-Bindungsassay gab erste Hinweise auf das Potenzial der dimeren 1,4-Dihydropyridine als aussichtsreiche P-gp Modulatoren, da ihre IC₅₀-Werte der P-gp Affinität durchaus mit denen bekannter P-gp Inhibitoren vergleichbar waren. In spezifischeren Versuchen auf P-gp-Hemmung *in vitro* und *in situ* sollten weitere strukturell differenziertere dimere 1,4-Dihydropyridine auf Affinität zu diesem Membrantransporter getestet werden.

4.1.2. *In-vitro* Zellversuche zur Überwindung der MDR am P-gp Transporter

Die im Radioliganden-Bindungsassay erhaltenen Affinitäten gaben Hinweise auf eine P-gp modulatorische Komponente der dimeren 1,4-Dihydropyridine. In spezifischeren Versuchen auf P-gp-Hemmung *in vitro* sollten nun weitere strukturell differenziertere 1,4-Dihydropyridine auf Affinität zu diesem Membrantransporter getestet und in Versuchsreihen an P-gp exprimierenden Zelllinien sollte das MDR-modulatorische Potenzial der genannten Substanzen und weiterer Derivate im Vergleich zu bekannten HIV-Proteasehemmern untersucht werden.

4.1.2.1. Untersuchungen zur P-gp Transporteraffinität an Mouse-T-Lymphoma Zellen

Die Untersuchungen wurden an der MDR-Gen transfizierten Zelllinie (L5178v), die durch die Transfektion der Stammzelllinie L5178Y mit dem pHa MDR/A Retrovirus und anschließender Selektion mit 60 ng/ml Colchicin erhalten wurde, durchgeführt. Diese Konzentration an Colchicin verhinderte ein Überleben von Stammzellen, da nur die Zellen, mit dem transfizierten MDR-Gen resistent waren und sich auch unter diesen Bedingungen teilen konnten. Hierdurch bildete sich eine Zelllinie mit gleichmäßigen P-gp Expressionsraten aus. Dies wurde durch Markieren der transfizierten Zellen mit dem monoklonalen Antikörper MRK-16-FITC und anschließender FACS-Analyse bewiesen¹⁴¹. Beim Fluorescence-Uptake-Assay und den Epirubicin-Synergismus-Tests in der Checkerboard-Studie wurden Untersuchungen aufgrund der direkten Vergleichbarkeit ebenso an der Stammzelllinie (L5178Y) vorgenommen. Im Zusammenhang der Identifizierung der Affinitäten zu P-gp stellt dieses Verfahren einen entscheidenden Vorteil dar, lassen sich doch so, wie erwähnt, direkte Vergleiche und über die erfolgte Gen-Transfektion selektive Testungen auf eine P-gp Hemmung mit spezifischem Substrat durchführen.

4.1.2.2. MTT (Methyltetrazolium)-Test

Im MTT-Test wurden die Zytotoxizitäten der neuartigen MDR-Modulatoren mit denen des Ritonavirs bei einer Konzentration von 30 μ M verglichen, da sie auch in dieser Konzentration in späteren *in situ* Versuchen am Tier verwendet wurden (Tabelle 5). Hohe Absorptionen zeugen von einer geringen Zytotoxizität, weil nur lebende Zellen zur Umwandlung des MTTs zum intensiv gefärbten Formazan (lila) befähigt sind, dessen UV-Absorption bei Wellenlängen von 540-630 nm vermessen wurde (Abbildung 16). Lediglich die eingesetzten Modulatoren **15** und **17** besaßen eine höhere Toxizität als das zugelassene Ritonavir, weswegen man von einer Unbedenklichkeit in Bezug auf die Toxizität bei nahezu allen eingesetzten Substanzen sprechen kann, bedenkt man, dass Einzeldosen von Ritonavir bis zu 100mg enthalten (Kaletra[®] 33 mg, Norvir[®] 100 mg) und HIV-Patienten um die zehn Kapseln am Tag einnehmen. Allgemein zeigten sämtliche getesteten dimeren Dihydropyridine wenige Unterschiede in ihrer Toxizität auf. Lediglich die Substanzen **20-22** wiesen mit Absorptionen von bis zu 0,369 die geringste Zytotoxizität in Bezug zum Ritonavir auf und unterschieden sich damit nochmals deutlich von allen

4. Ergebnisse und Diskussion

anderen untersuchten Substanzen. Sie sind demzufolge im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen, einschließlich des Ritonavirs, als komplett untoxisch in einem weiten Konzentrationsbereich anzusehen, vor allem, weil bei den JW-Typen (**20-22**) auch noch in hohen Konzentrationen keine Zytotoxizität zu verzeichnen war. Deswegen qualifizierten sich diese Substanzen besonders für zusätzliche Untersuchungen auf P-gp-Affinität im Fluorescence-Uptake-Assay.

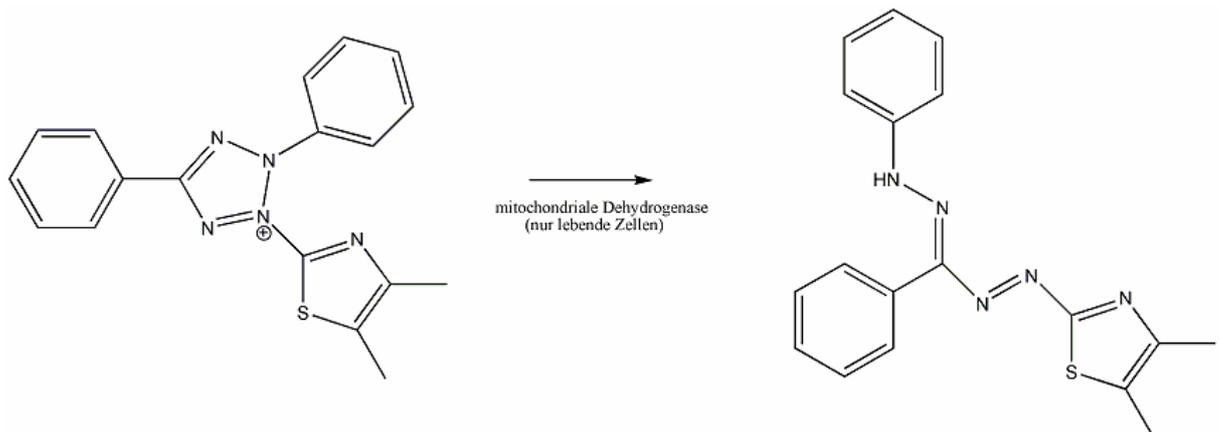


Abbildung 16

Durch die mitochondriale Dehydrogenase lebender Zellen wird das MTT zum Formazan metabolisiert

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5

MTT Absorptionen bei einer Modulatorkonzentration von 30µM und der DMSO-Kontrolle (1xdeutertiert).
 [Mittelwert ± SEM, n=3] Höhere Absorptionsraten zeugen von einer geringeren Zytotoxizität

Verbindung	MTT-Absorption
(17)	0,034 ± 0,001
(15)	0,048 ± 0,001
Ritonavir* (7)	0,052 ± 0,001
(16)	0,06 ± 0,002
(5)	0,074 ± 0,001
(8)	0,074 ± 0,001
(3)	0,080 ± 0,002
(5a)	0,082 ± 0,002
(6)	0,094 ± 0,004
19a	0,099 ± 0,002
HX (1)	0,099 ± 0,004
(9)	0,107 ± 0,005
(4)	0,110 ± 0,004
(4a)	0,111 ± 0,005
(19)	0,112 ± 0,003
H17 (2)	0,113 ± 0,004
JW41 (10)	0,137 ± 0,006
(13)	0,149 ± 0,005
JW46b (20)	0,214 ± 0,008
JW53 (21)	0,281 ± 0,009
JW46a (22)	0,369 ± 0,009
DMSO 1%	0,401 ± 0,012
DMSO ^{D6} 1%	0,444 ± 0,015

* = Vergleichssubstanz

4.1.2.3. Fluorescence-Uptake-Assay zur Überwindung der MDR in P-gp exprimierenden Tumor-Zellen

Nach Aussage des MTT-Assays konnten aufgrund der geringen Toxizität der Testsubstanzen alle im Fluorescence-Uptake-Assay auf P-gp Affinität getestet werden. Bei diesem *in vitro* Assay auf Hemmung der Molekulpumpenaktivität wird über eine FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)-Analyse unbehandelter und mit P-gp Modulator behandelter Zellen die Aufnahme eines spezifisch bindenden, fluoreszierenden P-gp Substrates, in diesem Fall Rhodamine123, gemessen (siehe Kapitel 5.2.4.4.). Hierbei wird das Verhältnis von Stammzelllinie zu MDR-Gen transfizierter Zelllinie als P-gp inhibitorisches Aktivitätsverhältnis (R) berechnet. Dieser direkte Vergleich versichert, dass die errechneten Aktivitäten auf die P-gp inhibitorischen Eigenschaften der MDR-Modulatoren zurückzuführen sind. Über einen Screen der einzusetzenden Substanzen bei zwei Konzentrationen (1µM und 10µM) sollte das jeweilig vorhandene P-gp inhibitorische Potenzial bestimmt werden. Als Kontrollsubstanz diente der bekannte P-gp Inhibitor und Calcium-Antagonist Verapamil. Diese Methode stellte ein zusätzliches Auswahlverfahren dar, da nur Substanzen mit entsprechend hohen inhibitorischen Werten die nächste Stufe des Tests erreichten und dann im folgenden in fünf verschiedenen Konzentrationen genauer bestimmt wurden. Den Screen überstanden die Substanzen **1, 2, 3, 5a, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 19, 19a, 20, 21** und **22**. Die weiterführende Testung erfolgte in den Konzentrationen 0,2; 1; 5; 10 und 20 µM oder 1; 5; 10; 20 und 25 µM je nach Verhalten im Screen. Über die erhaltenen Fluoreszenz-Aktivitäts-Verhältnisse (FAR) konnte das Ausmaß der P-gp-Hemmung im FACS gemessen werden. Diese Verhältnisse wurden direkt miteinander verglichen und höhere Werte wiesen entsprechend auf größere Inhibitionsraten hin. Bemerkenswert gut schlossen bei diesem Assay die Dimeren 1,4-Dihydropyridine vom Typ HX (**1**), H17 (**2**) und JW (**20, 21, 22**) ab. H17 (**2**) zeigte bereits bei einer Konzentration von nur 0,2 µM mit einer Fluoreszenz-Aktivitäts-Verhältniss von 35,12 eine so gute P-gp Inhibition, dass ein zusätzlicher Assay in submikromolaren Bereichen notwendig wurde. Für H17 (**2**) erfolgte die Wiederholung des Assays mit den Konzentrationen 0,02; 0,05; 0,1; 0,15 und 0,2 µM, wodurch dann eine Konzentrationsabhängigkeit auch für diese Substanz bestimmt werden konnte. Ab einer Konzentration von 5 µM H17 (**2**) konnte mit einem R-Wert von 57,81 eine nahezu vollständige P-gp-Inhibierung erreicht werden. Im Vergleich zur Kontrollsubstanz, dem Verapamil, eingesetzt in einer Konzentration von 10 µM (R = 16,48) inhibierte das H17

4. Ergebnisse und Diskussion

das P-gp 3,5 mal besser, obwohl es mit 5 μM nur halb so hoch konzentriert war wie das Verapamil. Ähnlich verhielt sich HX (**1**). Es zeigte bei einer Konzentration von 5 μM eine 2,8-mal bessere inhibitorische Aktivität und bei 10 μM sogar eine 4,1-mal bessere. Als hervorragende P-gp Inhibitoren in den *in vitro* Versuchen erwiesen sich die Substanzen JW46b (**20**), JW53 (**21**) und JW46a (**22**). Sie zeigten bei einer Konzentration von nur 5 μM eine bis zu siebenmal bessere inhibitorische Aktivität als das doppelt so hoch konzentrierte Verapamil. Im Gegensatz hierzu zeigte der bekannte PI und P-gp Modulator Ritonavir bei einer Konzentration von 5 μM eine geringere Hemmaktivität ($R = 1,91$) und bei 10 μM ($R = 24,27$) mit einem Faktor 1 keinerlei Vorteile gegenüber Verapamil (Tabellen 6.1, 6.2). Basierend auf diesen Ergebnissen sind die Verbindungen **1**, **2**, **20**, **21** und **22** derzeit einige der stärksten P-gp-inhibitorischen Substanzen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6.1

Die größten Konzentrationen pro untersuchter Substanz stellen jeweils die Sättigungskonzentrationen dar. Eine weitere Konzentrationserhöhung zog keine wesentliche Steigerung der P-gp Hemmaktivität nach sich [Mittelwert \pm SEM, n=2, p<0,05].

P-gp Modulator	Konzentration in μM	x-fache Steigerung des inhibitorischen Potenzials im Vergleich zur Kontrollsubstanz Verapamil eingesetzt in 10 Mikromolarer Konzentration
HX (1)	1	1,0 \pm 0,03
	5	2,8 \pm 0,12
	10	4,1 \pm 0,18
H17 (2)	0,2	2,1 \pm 0,10
	1	2,1 \pm 0,10
	5	3,5 \pm 0,15
(3)	10	1,1 \pm 0,05
	20	2,1 \pm 0,09
	25	3,1 \pm 0,14
(5)	5	0,9 \pm 0,02
	10	2,0 \pm 0,08
	20	2,1 \pm 0,09
(6)	10	0,1 \pm 0,01
	20	1,4 \pm 0,05
	25	1,7 \pm 0,07
Ritonavir* (7)	5	0,1 \pm 0,01
	10	1,0 \pm 0,04
	20	1,8 \pm 0,07
(8)	5	0,4 \pm 0,02
	10	0,5 \pm 0,02
	20	0,6 \pm 0,02
(9)	10	0,1 \pm 0,01
	20	0,8 \pm 0,02
	25	1,0 \pm 0,04
(19)	10	0,1 \pm 0,01
	20	0,8 \pm 0,03
	25	1,1 \pm 0,05
JW46b (20)	1	1,9 \pm 0,10
	5	5,0 \pm 0,21
	10	5,2 \pm 0,25

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6.2

Die größten Konzentrationen pro untersuchter Substanz stellen jeweils die Sättigungskonzentrationen dar. Eine weitere Konzentrationserhöhung zog keine wesentliche Steigerung der P-gp Hemmaktivität nach sich (Dick umrandet=Bistypen-nur zwei Hydroxymethylen im Molekül) [Mittelwert \pm SEM, n=2, p<0,05].

P-gp Modulator	Konzentration in μM	x-fache Steigerung des inhibitorischen Potenzials im Vergleich zur Kontrollsubstanz Verapamil eingesetzt in 10 Mikromolarer Konzentration
JW53 (21)	1	2,5 \pm 0,11
	5	7,1 \pm 0,29
	10	5,9 \pm 0,24
JW46a (22)	1	2,1 \pm 0,13
	5	5,4 \pm 0,19
	10	6,2 \pm 0,22
(15)	5	3,4 \pm 0,15
	10	3,4 \pm 0,17
	20	2,8 \pm 0,13
(16)	10	1,3 \pm 0,05
	20	1,5 \pm 0,07
	25	1,4 \pm 0,06
(17)	10	0,7 \pm 0,03
	20	2,1 \pm 0,10
	25	2,3 \pm 0,10

*= Vergleichssubstanz

Abbildung 17 zeigt die Spektren der FACS-Analyse des neuartigen P-gp Modulators HX (1) beispielhaft für alle getesteten Substanzen mit P-gp modulierenden Eigenschaften. Gut zu erkennen ist, dass bei HX, wie auch bei den meisten anderen Modulatoren, die Hemmung des P-gps konzentrationsabhängig verläuft. Bei kleineren Konzentrationen (0,2 μM , 1 μM und 5 μM) wird das P-gp noch nicht vollständig inhibiert, da die Stoffmenge hierfür offensichtlich nicht hinreichend ist. Trotzdem ist ein stetiger Anstieg der inhibitorischen Aktivität proportional zur Konzentrationssteigerung zu verzeichnen, bis bei 10 μM HX eine nahezu vollständige P-gp-Hemmung auftritt. Zu erkennen an dem FL1-Shift der Zellen bzw. der messbaren Fluoreszenz des Markers Rhodamine123, der gleichzeitig ein P-gp Substrat ist, und den die Zellen aufgrund der nun nahezu vollständigen P-gp Hemmung durch ihre Membran aufnehmen. Optisch wahrnehmbar ist der Shift durch die Verschiebung des Graphen in den M1-Bereich des Diagrammes. Hier tritt gleichzeitig eine Sättigung der Membran-Pumpe ein, da der inhibitorische Effekt bei Konzentrationen über 10 μM konstant bleibt oder sich nur noch geringfügig ändert.

4. Ergebnisse und Diskussion

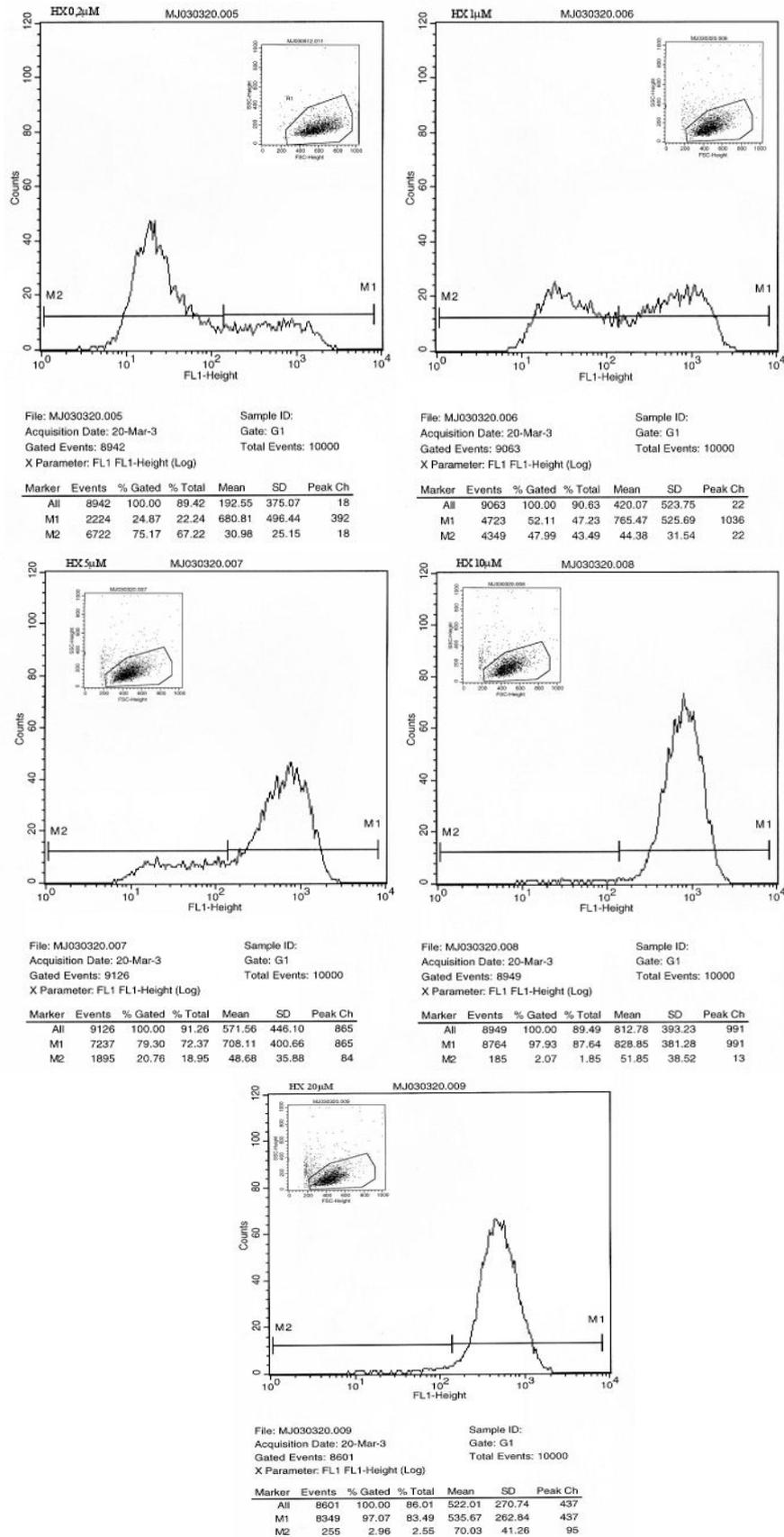


Abbildung 17

FACS-Analyse von HX (1) bei 0,2; 1; 5; 10 und 20 µM

4. Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 18 hingegen zeigt am Beispiel der Substanz **13** einen auf P-gp nicht modulierend wirkenden Stoff. Substanz **13** ist kein dimeres 1,4-Dihydropyridin sondern ein 1-Aza-9-oxafluoren. Es wurde als neuartiger CDK-Inhibitor synthetisiert, die u.a. zur therapeutischen Bekämpfung der Alzheimerkrankheit entwickelt wurden¹²⁹. Substanz **13** wurde trotzdem auf P-gp-Affinität getestet, um ein Beispiel für einen nicht affinen Stoff präsentieren zu können. Erkennbar daran, dass die P-gp exprimierenden Zellen, trotz steigender Konzentration an Testsubstanz in ihrer Resistenz unbeeinflusst bleiben und das wiederum als Marker eingesetzte fluoreszierende P-gp Substrat Rhodamine123 auch weiterhin aus der Zelle heraus transportieren. Es ist also im Gegensatz zu einer modulierenden Substanz bei steigender Konzentration kein FL1-Shift in den intrazellulären M1 Bereich zu verzeichnen und die Fluoreszenz ist weiterhin nur im Bereich M2, das heißt außerhalb der Zelle, messbar:

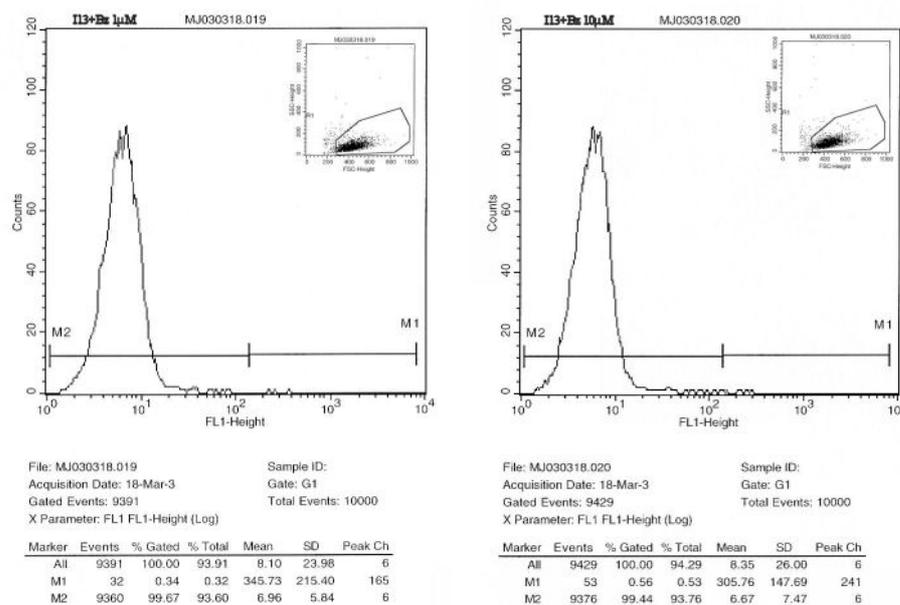


Abbildung 18

FACS-Analyse von Substanz **13** bei 1 und 10 μM

4.1.3. Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Momentan werden zwei Symmetriemodelle für das P-gp diskutiert. Es existiert sowohl ein Modell für eine C_2 -Pseudosymmetrie als auch eines für eine Spiegelsymmetrie (Abbildung 19). Wie über die genaue Funktionsweise dieser Membran-Efflux-Pumpe ist auch über die Struktur eines Substratbindungszentrums wenig bekannt, so dass es sich bei den Aussagen zur Symmetrie bisher nur um Annahmen handelt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Da die dimeren 1,4-Dihydropyridine als HIV-Proteaseinhibitoren an das C_2 -symmetrische Zentrum dieses Enzyms binden⁴², sollten in dieser Studie sowohl symmetrische als auch unsymmetrische Dimeren eingesetzt werden, um über deren Affinitäten zu P-gp eine Aussage über potenzielle Symmetrieeigenschaften ableiten zu können. Strukturell wurden sowohl die Verbindungen mit vier Hydroxymethylen-Gruppen, im Folgenden als Tetratypen bezeichnet, als auch die mit zwei Hydroxymethylen-Gruppen, hier Bistypen genannt, auf biologische Aktivität getestet.

Allgemein ließ sich für die Tetratypen feststellen, dass eine Phenoxycarbonyl-Substitution, wie bei den Substanzen **4** und **4a**, nicht von Vorteil für Affinitäten zur Bindungsstelle war. Dahingegen bessere Eigenschaften zeigte eine N-Butoxycarbonyl- (**3** und **5a**) und noch bessere eine N-Benzyl-Substitution (**1** und **2**). Ebenso wurde in jüngeren Studien für ein effektives Bindungsverhalten von Strukturen zur P-gp-Bindungsstelle sowohl das Vorhandensein von funktionellen Wasserstoffbrücken-Donatorgruppen als auch Wasserstoffbrücken-Akzeptorgruppen postuliert¹⁰⁴. Solche Gruppen wurden zusätzlich bei den Substanzen **1-3**, **5a**, **20-22** betrachtet. Die geringere Bindungsaktivität von Substanz **5a** gegenüber **3** korreliert mit vorangegangener Aussage und könnte mit einer Abnahme solch funktioneller Gruppen, in diesem Fall der Methoxygruppen, in Zusammenhang gebracht werden. Die Einführung einer Methoxygruppe bei Verbindung **1** gegenüber **2** erbrachte hingegen eine Steigerung der Affinität zur Bindungsstelle. Offensichtlich scheint also weniger die Art als vielmehr die Anzahl von Wasserstoffbrücken-Donatoren und – Akzeptoren, von ausschlaggebender Bedeutung für die biologische Aktivität zu sein (Tabelle 7).

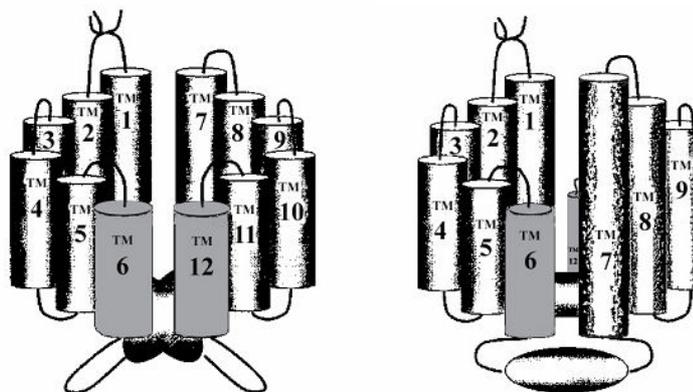


Abbildung 19

Mögliche Symmetriemodelle des P-gps; links Spiegelsymmetrie, rechts C_2 -Pseudosymmetrie.

4. Ergebnisse und Diskussion

Um also eine Korrelation der Anzahl der Wasserstoffbrücken-Funktionen mit der Bindungsaffinität zu erlangen, wurden zusätzlich die Bindungseigenschaften der Dimeren mit variierender Anzahl solcher Gruppen verglichen. Es konnte daraufhin festgestellt werden, dass eine Anzahl von sechs Wasserstoffbrücken-Funktionen ideal für diese Verbindungen ist. Die Aktivitätsverhältnisse der Substanzen **1**, **3**, **20**, **21** und **22** verdeutlichen dies (Tabelle 7), wobei die Position der substituierten funktionellen Gruppen ebenfalls von Bedeutung zu sein scheint. So wurden in Verbindung **21** Wasserstoffbrücken-Funktionen in *Meta*-Stellung und in **20** in *Para*-Stellung an verschiedenen Positionen im Molekül eingeführt. Bei geringeren Konzentrationen ergibt sich ein bedeutender Vorteil für die Verbindung **21**. Weniger Wasserstoffbrücken-Funktionen, bei der Substanz **2** ergaben eine geringere Affinität verglichen mit den Verbindungen, die sechs solcher funktioneller Gruppen enthielten. Trotzdem ist die biologische Aktivität der Substanz **2** immer noch bemerkenswert und übertrifft die der anderen Testsubstanzen deutlich. Darüber hinaus erwiesen sich mehr als sechs Wasserstoffbrücken-Funktionen ebenfalls als unvorteilhaft. Verbindung **5a** besitzt acht und zeigte eine bedeutend geringere biologische Aktivität.

Die neue Erkenntnis einer optimalen Anzahl von Wasserstoffbrücken-Funktionen widerspricht früheren Befunden, dass die Bindungsaktivität von bekannten P-gp-Modulatoren mit steigender Anzahl solcher Funktionen zunimmt¹⁴¹. Alle Substanzen, die diesem früheren Befunden unterliegen, sind im Gegensatz zu den hier getesteten unsymmetrisch^{45,104}. Die in dieser Arbeit näher untersuchten Substanzen, außer **5** und **6**, weisen eine völlige C_2 -Symmetrie auf und erreichten damit enorme P-gp inhibitorische Aktivitäten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das P-gp selber eine C_2 -symmetrische Bindungsregion besitzen könnte. Hinweise auf eine symmetrische Bindungsregion lieferten erste P-gp-Modulatoren, wie Verapamil und Dactinomycin, mit einer symmetrieartigen Grundstruktur und unsymmetrisch substituierten Elementen (Abbildung 19)⁹⁵. Leider konnte eine effektive Überwindung der MDR bei diesen Substanzen nur in toxischen Konzentrationsbereichen festgestellt werden. Die hier eingesetzten MDR-Modulatoren waren alle symmetrisch und zeigten zusätzlich sehr effektive Inhibitionsraten in nichttoxischen Bereichen, die im MTT-Assay evaluiert worden sind (Tabelle 5). Über einen systematischen Verlust symmetrischer Elemente aus den Strukturen der eingesetzten Substanzen, konnte zusätzlich eine Abhängigkeit der Affinität zur P-gp-Bindungsregion von der Molekülsymmetrie aufgezeigt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Bei Verbindung **5** wurde gegenüber **3** auf ein Symmetrieelement verzichtet, wobei eine Butoxycarbonylgruppe durch einen Benzylrest ersetzt wurde.

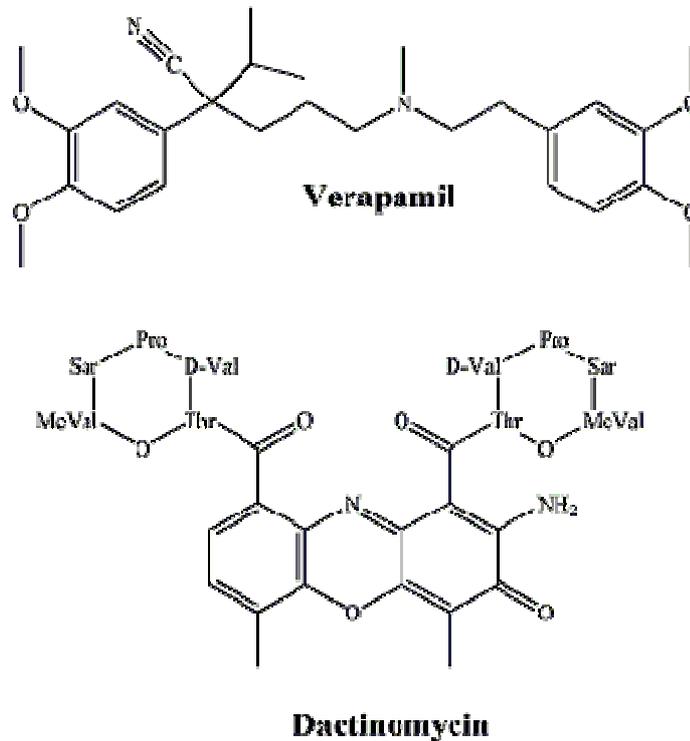


Abbildung 20

Bemerkenswert ist, dass die unsymmetrische Verbindung **5** trotz des für P-gp-Affinitäten vorteilhaften N-Benzylsubstituenten, schlechter wirksam ist als die symmetrische Verbindung **3** ohne N-Benzylrest. Bei einer Konzentration von 1 μ M sind die Aktivitäten im Vergleich zur doppelt benzylierten Variante **2** signifikant und zur bisbutoxycarbonylierten **3** etwas reduziert (Tabelle 7). Diese Erkenntnis lässt sich nicht mit bisherigen Erkenntnissen über vorteilhafte Struktureigenschaften für eine gute biologische Aktivität dieser potenziellen Modulatoren vereinbaren, außer wenn die Bindungsregion des P-gps tatsächlich eine C_2 -Symmetrie aufweisen würde. Hierdurch könnten Abweichungen von der Symmetriestruktur ohne eine einhergehende Verminderung der biologischen Aktivität kaum toleriert werden.

In Verbindung **6** wurde auf ein weiteres Symmetrieelement verzichtet, aber gleichzeitig darauf geachtet, dass alle für eine gute biologische Aktivität nötigen Strukturen (Benzyl, Butoxycarbonyl-, 4'-Methoxyphenylgruppen) und Wasserstoffbrücken-Funktionen im Molekül erhalten blieben. Das Ergebnis war eine im Gegensatz zur symmetrischeren Verbindung **5** verringerte Aktivität, woraus geschlossen werden konnte, dass ein Verlust symmetrischer Elemente von der P-gp Bindungsstelle nicht toleriert wird.

4. Ergebnisse und Diskussion

Eine C_2 -Symmetrie des aktiven Zentrums dieser Region mit zahlreichen Bindungsstellen für die diskutierten aromatischen Substituenten ist somit wahrscheinlich. Zusätzliche Bestätigung fand diese Schlussfolgerung durch den Vergleich der symmetrischen Substanz **10** mit den Substanzen **19** und **19a**. Auch bei Substanz **19a** wurde die Anzahl der Symmetrieelemente gegenüber **10** verringert, wohingegen die Wasserstoffbrücken-Funktionen aus Substanz **10** beibehalten wurden. Verbindung **10** hat mit zwei 4'-Methoxybenzylgruppen zwar eine verringerte Aktivität vergleicht man sie mit der Verbindungen **2**, die lediglich Benzylreste aufweist. Gegenüber Verbindung **3** mit Butoxycarbonylresten ist **10** mit 4'-Methoxybenzylresten jedoch bei kleinerer Konzentration besser wirksam. Durch den Austausch eines für die Wirksamkeit günstigen 4'-Methoxybenzylrestes gegen einen Butoxycarbonylrest in Verbindung **19a** resultiert jedoch eine verringerte Aktivität gegenüber **10**. Auch eindrucksvoll am Beispiel der Substanz **19** zu sehen, die mit einem kompletten Verlust an Symmetrie eine noch geringere Aktivität als **19a** aufwies. Abermals sprechen diese Resultate für einen C_2 -symmetrischen Charakter der Bindungsstelle des P-gps.

Für die ebenfalls wenig toxischen Bistypen konnten ähnliche strukturelle Verhaltensmuster wie für die Tetratypen untersucht werden. Für die N-Methoxycarbonyl-substituierte Verbindung **16** konnte eine dem Verapamil ähnliche Aktivität gefunden werden. Auch hier ließ sich ein linearer Zusammenhang zwischen inhibitorischer Aktivität und Konzentration feststellen (Tabelle 7). Bei den Verbindungen **15** und **17** wurden am N-Substituenten lipophilere Gruppen eingeführt, was mit einer Erhöhung der Aktivität verbunden war. Dadurch war das Konzept einer ausreichenden Lipophilie für eine gute MDR-Modulation unterstützt. Die Bedeutung voluminöser lipophiler Substituenten für die inhibitorische Aktivität wird hierdurch nochmals deutlich. Eine Erhöhung von vier dieser Wasserstoffbrücken-Funktionen bei Substanz **15** auf insgesamt sechs in der Tetratyp-Verbindung **4a** zieht einen fast vollständigen Wirkungsverlust bei geringen Konzentrationen nach sich. Auch dabei deutet sich das Prinzip einer optimalen Anzahl an Wasserstoffbrücken-Funktionen pro Substanzklasse an, zumal eine Abnahme der Anzahl dieser Gruppen im Molekül wieder eine Verringerung der Aktivität zur Folge hatte⁴⁵.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7

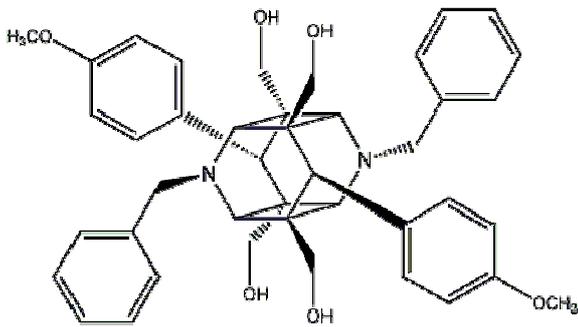
P-gp inhibitorische Aktivitätsverhältnisse ausgewählter Tetra- und Bistypen (dick umrandet) im Vergleich zu Verapamil unter Beachtung ihrer Wasserstoffbrücken-Funktionen ([Mittelwert \pm SEM, n=2]).

Verbindung	P-gp inhibitorische Aktivitätsverhältnisse		Wasserstoffbrücken-Funktionen
	1 μ M	10 μ M	
HX (1)	34,40 \pm 1,10	87,01 \pm 2,99	6
H17 (2)	34,28 \pm 1,08	50,20 \pm 2,00	4
(3)	2,84 \pm 0,13	33,00 \pm 1,40	6
(4)	0,38 \pm 0,02	1,44 \pm 0,05	8
(4a)	0,97 \pm 0,03	5,40 \pm 0,23	6
(5)	2,00 \pm 0,08	33,00 \pm 1,30	5
(5a)	1,13 \pm 0,04	14,64 \pm 0,65	8
(6)	1,20 \pm 0,04	12,00 \pm 0,50	6
(10)	17,50 \pm 0,74	26,50 \pm 1,10	6
(19)	1,20 \pm 0,04	12,00 \pm 0,45	6
(19a)	3,70 \pm 0,12	25,60 \pm 1,10	6
(20)	39,69 \pm 1,54	106,20 \pm 4,80	6
(21)	126,58 \pm 5,12	120,68 \pm 5,82	6
(22)	25,53 \pm 1,07	71,30 \pm 2,30	6
(15)	28,10 \pm 1,20	30,87 \pm 1,34	4
(16)	1,11 \pm 0,04	18,62 \pm 0,81	4
17)	6,81 \pm 0,31	7,42 \pm 0,26	4
Verapamil**	0,66 \pm 0,03	7,27 \pm 0,33	-
Ritonavir*	1,87 \pm 0,07	19,12 \pm 0,86	-

*= Vergleichssubstanz

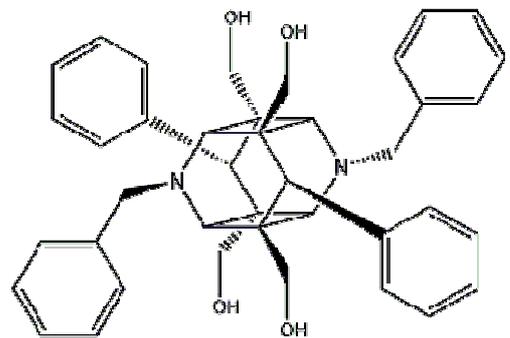
**= Bezugssubstanz

Diskutierte Strukturen



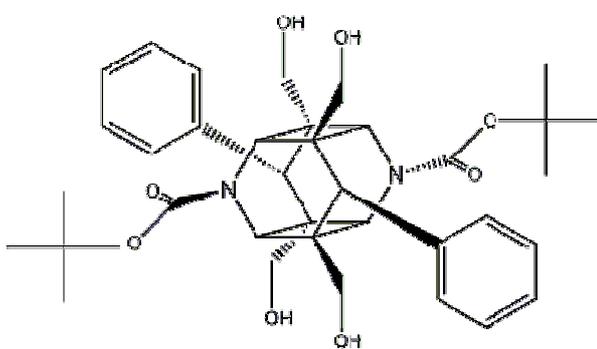
1 (HX)

3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan



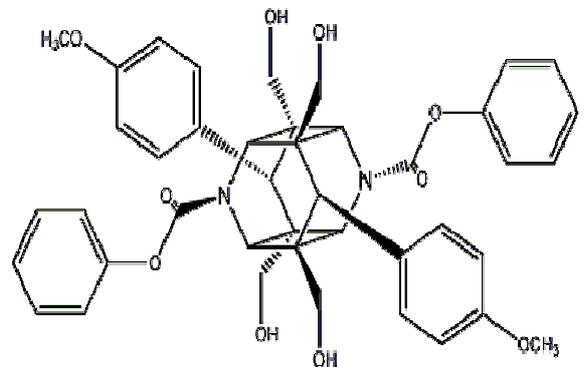
2 (H17)

3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan



3

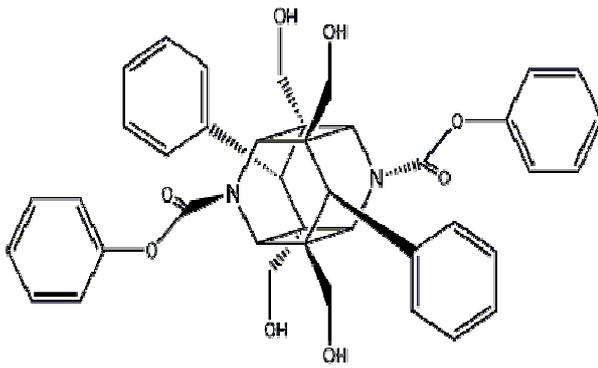
3,9-Ditert.butyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan



4

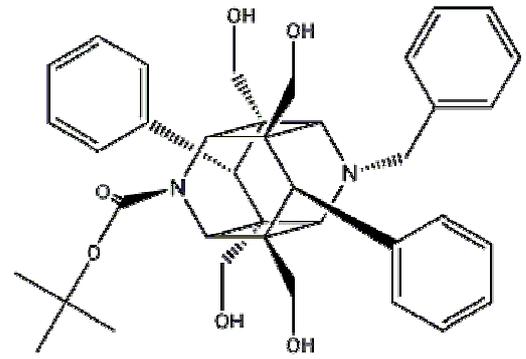
3,9-Dibenzoyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan

4. Ergebnisse und Diskussion



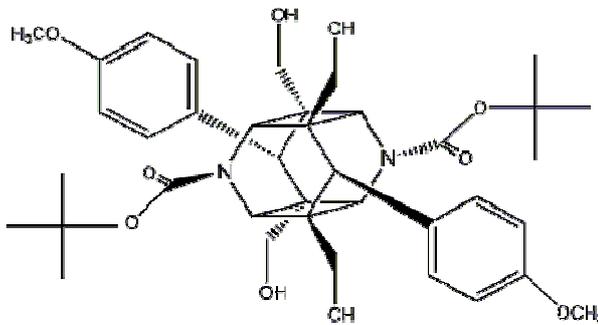
4a

3,9-Dibenzoyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan



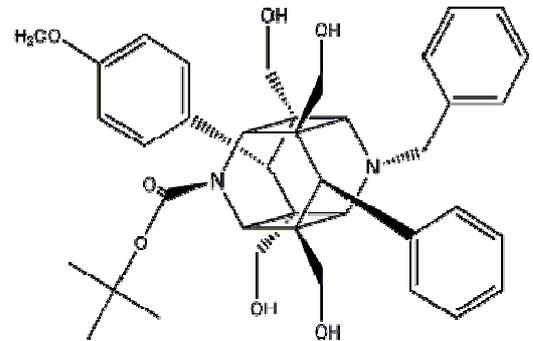
5

3-Tertbutyloxycarbonyl-9-benzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan



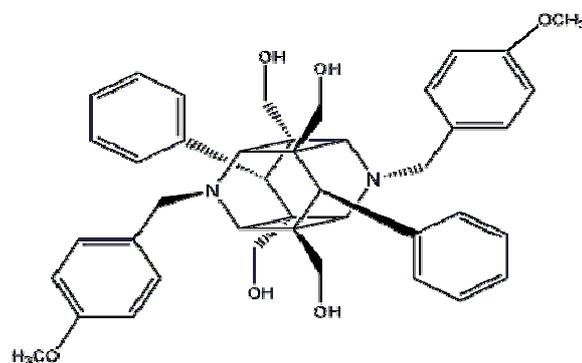
5a

3,9-Ditert.butyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan



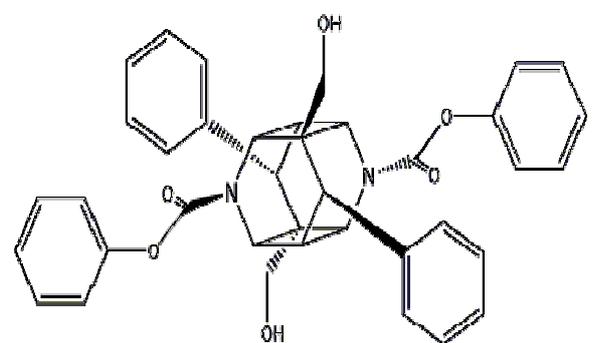
6

3-Tert.butyloxycarbonyl-9-benzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6-phenyl-12-(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan



10 (JW41)

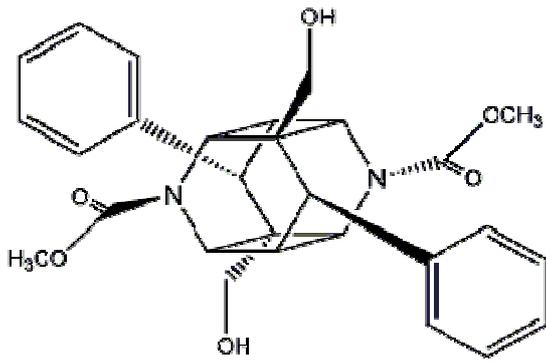
1,5,7,11-Tetrahydroxymethyl-3,9-bis(4-methoxybenzyl)-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan



15

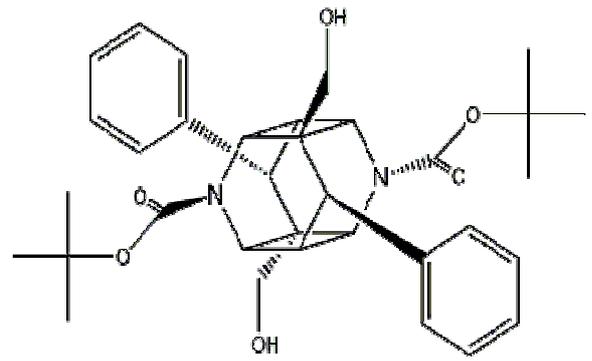
1,7-Dihydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diphenyloxycarbonyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan

4. Ergebnisse und Diskussion



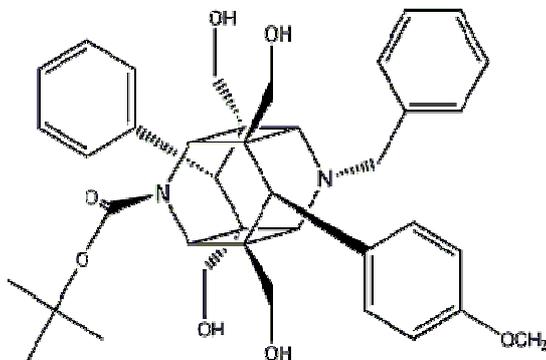
16

1,7-Dihydroxymethyl-3,9-dimethoxycarbonyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan



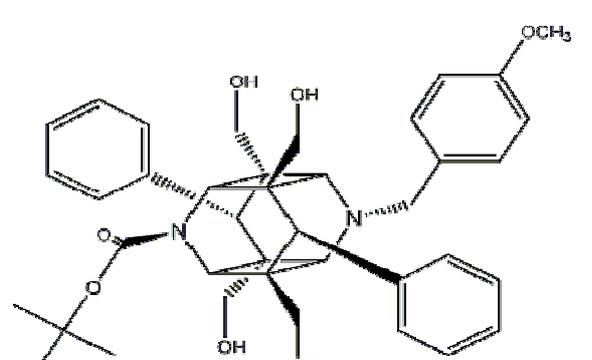
17

1,7-Dihydroxymethyl-3,9-di-tert.butylloxycarbonyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan



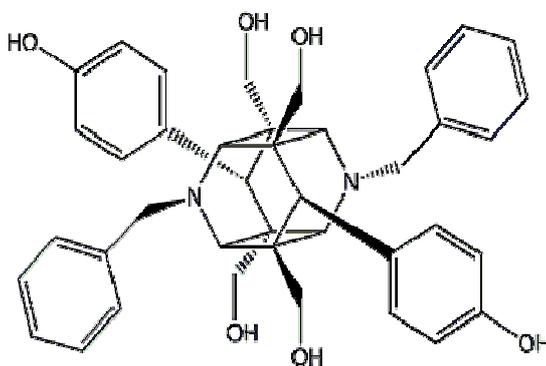
19

3-Tetrabutylloxycarbonyl-9-benzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6-(4-methoxyphenyl)-12-phenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan



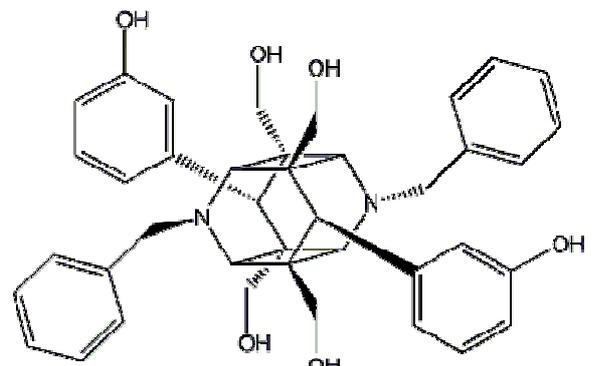
19a

3-Tetrabutylloxycarbonyl-9-(4-methoxyphenyl)-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan



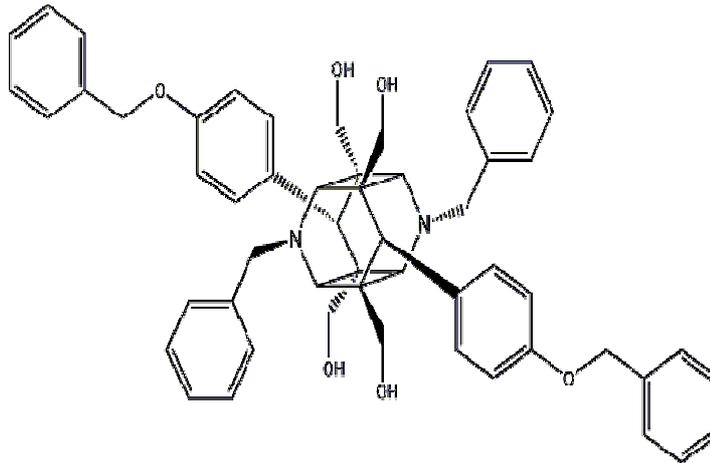
20 (JW 46b)

3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-hydroxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan



21 (JW 53)

3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(3-hydroxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan



22 (JW 46a)

3,9-Dibenzyl-6,12-bis(4-benzyloxyphenyl)-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan

4.1.4. Checkerboard-Studien (Epirubicin-Synergismus-Test)

In Checkerboard-Studien sollten die aus dem Fluorescence-Uptake-Assay als weniger P-gp modulatorisch hervorgegangenen Substanzen auf einen eventuellen Synergismus ihrer Eigenschaften in Hinblick auf die Zelltoxizität mit denen des Zytostatikums Epirubicin in verschiedenen Konzentrationen an Stamm- und P-gp exprimierender Zelllinie überkreuz getestet werden. Insgesamt fanden neun Epirubicinkonzentrationen und jeweils sieben Modulatorkonzentrationen in zweifacher Wiederholung Verwendung. Die Substanzen **8**, **9**, **15** und **17** wurden für die Studie ausgewählt und aus den resultierenden FIC A (fractional inhibitory concentration Epirubicin) und FIC B (fractional inhibitory concentration Testsubstanz)-Werten der FIX (fractional inhibitory concentration)-Wert des Synergismuspotenzials und der IC₅₀ Wert der Zelltoxizität pro Kombinationspaar bestimmt. Sie besaßen im MTT-Assay eine dem Ritonavir ähnliche Absorption, waren also im Vergleich zu den anderen dimeren 1,4-Dihydropyridinen in ihrem Zytotoxizitätspotenzial am ehesten als bedenklich einzustufen und fanden auch daher Zugang zu dieser Studie. Es wurde bei jeder Substanz von der unter Zusatz von 1% DMSO höchst möglichen Konzentration ausgegangen. Aufgrund der zahlreich getesteten Verdünnungen, war ein direkter Vergleich dennoch möglich. Keine der getesteten Substanzen zeigten in einem bestimmten Konzentrationsbereich einen synergistischen Effekt. Sie unterschieden sich lediglich je nach Löslichkeit in ihrer Konzentration, nicht aber in dem Ausmaß eines Synergismuspotenzials. Additive Effekte konnten aber durchaus verzeichnet werden. Substanz **15** wies in keiner Konzentration einen Synergismus oder

4. Ergebnisse und Diskussion

additiven Effekt zu Epirubicin auf. In der Stammzelllinie verhielt sich Substanz **9** ähnlich zu Verbindung **15**. Jedoch konnten in der MDR-Gen transfizierten Zelllinie bei einem Epirubicin Gehalt von 10 µg/ml einige Konzentrationen gefunden werden, die auf einen additiven Effekt hinwiesen. Es handelte sich um die Modulatorkonzentrationen 5,6; 2,8; 1,4; 0,7 und 0,35 µM. Alle anderen zeigten einen indifferenten Effekt. Verbindung **8** hatte in der Stammzelllinie weitestgehend einen indifferenten Effekt, also kein zu Epirubicin synergistisches Potenzial. Bei 35 und 17,5 µM konnte sogar ein Antagonismus nachgewiesen werden. In der transfizierten Zelllinie existierte eine additiv wirkende Kombination bei 2,5 µg/ml Epirubicin und 4,4 µM von Verbindung **8**. Sämtliche anderen Konzentrationen hatten keinen verbessernden Effekt. Bei Verbindung **17** hingegen gab es schon in der Stammzelllinie mehrere Kombinationen, die zumindest einen additiven Effekt hervorbrachten. Das war der Fall bei einem Epirubicin Gehalt von 5 µg/ml und den Konzentrationen 0,5 µM und 0,25 µM der Substanz **17** sowie bei einem Epirubicin Gehalt von 2,5 µg/ml und den Modulatorkonzentrationen 4; 2; 1; 0,5 und 0,25 µM, außerdem bei einem Epirubicin Gehalt von 1,25 µg/ml und den Modulatorverdünnungen auf 4 und 2 µM. In der transfizierten Zelllinie zeigte sich zumeist ein indifferenten Effekt. Nur bei einem Epirubicin Gehalt von 10 µg/ml und 2 µM der Substanz **17** konnte ein additiver Effekt festgestellt werden.

Anders verhielt es sich bei der Bestimmung des IC₅₀-Wertes der Zelltoxizität der jeweiligen Kombinationen mit Epirubicin. Wenn die Epirubicinkonzentrationen konstant gehalten wurden, so gab das Ergebnis einen Hinweis auf die ideale Modulatorkonzentration wohingegen bei konstanter Modulatorkonzentration die effektivste Epirubicinkonzentration über die Bestimmung der einzelnen IC₅₀-Werte erhalten wurde. Der Idealfall war eine Annäherung bis zur Deckungsgleichheit der IC₅₀-Werte aus MDR-transfizierter Zelllinie an die Stammzelllinie, die keinerlei Transporter exprimieren. Kleine IC₅₀-Werte bedeuteten gleichzeitig auch einen höheren zytotoxischen Effekt des Epirubicins in Kombination mit der jeweilig effektivsten Modulatorkonzentration. Im Vergleich zwischen MDR- und PAR-Zelllinie bedeutet die größte Annäherung der Werte einen optimalen Effekt in Bezug auf die Überwindung der MDR. In Abbildung 21 ist dies stellvertretend an der Verbindung **8** dargestellt und in Tabelle 8 sind die daraus resultierenden besten Kombinationen für alle getesteten Substanzen aufgezeigt. Für die Verbindung **8** lässt sich feststellen, dass ab einer Epirubicinkonzentration von 1,25 µM (oberes Diagramm Abbildung 20) und einer Konzentration von 6,2 µM für Substanz **8** (unteres Diagramm Abbildung 20), aufgrund der

4. Ergebnisse und Diskussion

starken Annäherung zwischen Stamm- und MDR-Gen-transfizierter Zelllinie, eine ideale Kombination für die Überwindung der MDR besteht. In den Diagrammen aus Abbildung 21 ist dies an den Schnittpunkten des Graphen der MDR transfizierten Zelllinie mit dem Graphen der Stamm-Zelllinie zu erkennen.

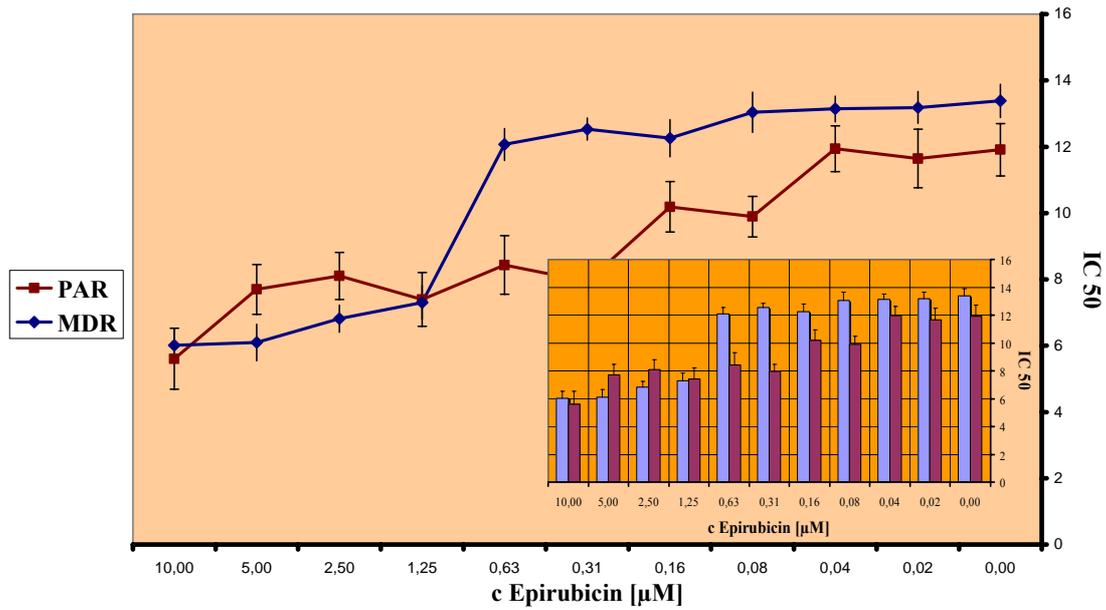
Tabelle 8

Für die Überwindung der MDR als ideal ermittelte Konzentrationskonzentrationen zwischen den jeweiligen Testsubstanzen und Epirubicin. Sie sind gleichbedeutend mit den Schnittpunkten der Graphen, die in Abbildung 21 für die Verbindung **8** repräsentativ dargestellt sind (Mittelwert \pm SEM, n=2, p<0,05).

Substanz	Epirubicinkonzentration [μ M]	Substanzkonzentration [μ M]
8 (PhPhBz)	1,25	6,20 \pm 0,08 (Stamm)
	8,13	6,20 \pm 0,09 (MDR)
9 (PyPhCH ₃)	10,00	> 22
15 (I1 hr CaBH ₄)	4,76	7,90 \pm 0,15 (Stamm)
	6,25	7,90 \pm 0,12 (MDR)
17 (I5+Boc CaBH ₄)	0,39	7,05 \pm 0,07 (Stamm)
	1,56	7,05 \pm 0,09 (MDR)

4. Ergebnisse und Diskussion

Verbindung 8: Konz. Verbindung 8=konst.



Verbindung 8 checkerboard MDR und PAR: Konz. Epirubicin=konst.

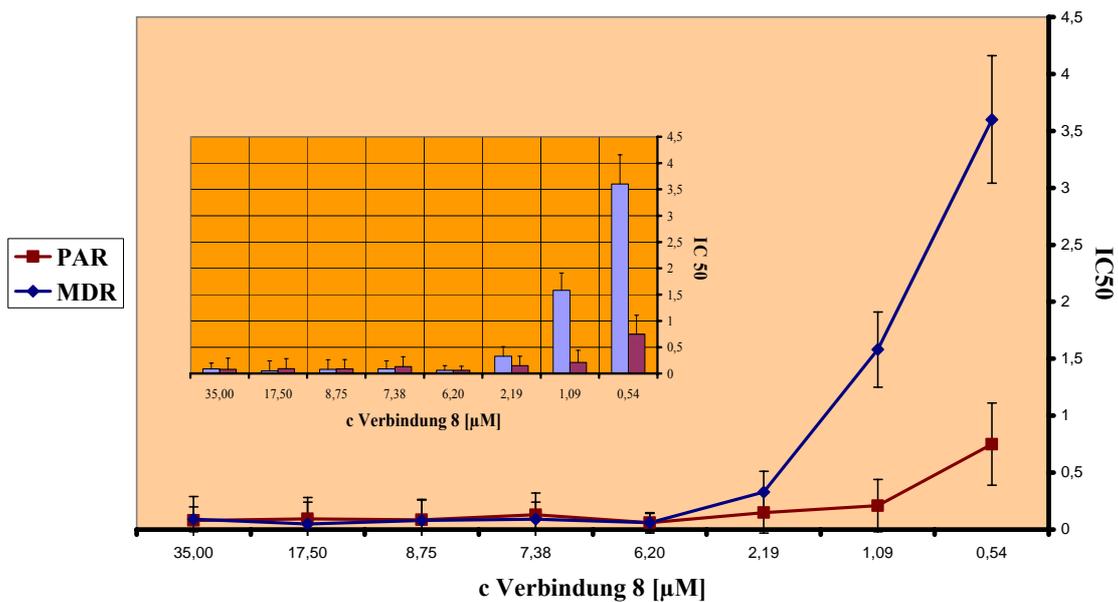


Abbildung 21

Für jede Epirubicinkonzentration ergab sich aus den verschiedenen Testsubstanzkonzentrationen ein IC₅₀-Wert der Zytotoxizität (oberes Diagramm). Genauso ließen sich IC₅₀-Werte der Zytotoxizität für jede Testsubstanzkonzentration bei verschiedenen Epirubicinkonzentrationen ermitteln. Die Schnittpunkte der Graphen zwischen Stamm- und transfizierter Zelllinie geben jeweils einen Hinweis auf eine ideale Kombination zur Überwindung der MDR.

4.1.5. *In-vitro* Zellversuche an MDA-MB-231 (HTB-26) Zellen zur Überwindung der MDR an MRP-Transportern

Durch die überraschenden Ergebnisse mit verschiedenen IC₅₀-Werten der P-gp Hemmung in unterschiedlichen Darmsegmenten aus den Perfusionsstudien mit Substanz **2** (H17) (siehe Kapitel 4.2.1.2.), lag die Vermutung nahe, dass möglicherweise mehrere Typen von Membran-Transportern beeinflusst werden könnten. Aus diesem Grund wurden Affinitätsstudien zu MRP-Transportern an der MRP exprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 analog zur MDR exprimierenden Zelllinie mit Hilfe eines Fluorescence-Uptake-Assays durchgeführt. Als MRP-Substrat diente der 5-Carboxyfluorescein-diacetat-acetoxymethylester (5CFDA, AM), der den Vorteil besitzt erst nach der Esterspaltung, die nur innerhalb der Zellen stattfindet, Fluoreszenz-Aktivität zu zeigen. Da sich lediglich das H17 (Substanz **2**) für diese Studie qualifizierte, wurde es nötig eine zusätzliche Substanz für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse in diesen Test einzubeziehen. Probenecid besitzt außerordentlich effektive Affinitäten zu MRP^{57,111} und wurde daher zum Vergleich der Aktivitätsverhältnisse mit denen von H17 ausgewählt⁶⁰. Als Positivkontrolle auf MRP-Hemmung wurde Indometacin aufgrund seiner MRP-Affinität verwendet^{60,121}. Es zeigte bei einer Konzentration von 28 µM ein inhibitorisches Aktivitätsverhältnis von 0,9. Dieses Verhältnis konnte von H17 schon bei einer Konzentration von nur 2 µM erreicht werden.

Probenecid, einer der bisher effektivsten MRP Inhibitoren überhaupt, zeigte mit einem FAR-Wert von 1,3 bei einer Konzentration von 2 µM, die damit der des H17s entsprach, ein nur etwas besseres inhibitorisches Aktivitätsverhältnis als selbiges. Der Versuch zeigte ein zusätzliches MRP-inhibitorisches Potenzial für H17, da die Unterschiede der beiden Aktivitätsverhältnisse zwischen H17 und Probenecid nur gering waren und beide Substanzen weitaus bessere Affinitäten zu MRP zeigten als Indometacin. Es ist also davon auszugehen, dass die dimeren 1,4-Dihydropyridine in der Lage sind, bedeutende Affinitäten zu Membrantransportern zu zeigen, die für die Entstehung der Multidrug-Resistance mit verantwortlich gemacht werden. Sie tragen daher ein viel versprechendes Potenzial zu einer Überwindung dieser Art von Resistenzentwicklungen.

4.2. P-gp Affinitätsstudien verschiedener HIV-Protease-Inhibitoren als potenzielle MDR Modulatoren *in situ*

4.2.1. *In situ* Perfusionstudien

Aufgrund eines hohen Vorkommens an P-gp im Intestinum⁷² sollten die Ergebnisse aus dem Fluorescence-Uptake-Assay durch *in situ* Studien am perfundierten Rattendarm bestätigt werden. Das Perfusionsmodell ist eine seit langem bekannte und etablierte Methode zur Bestimmung von resorptiven Einflüssen von Substanzen auf das Absorptionsgewebe im Rattendarm. Es wurde bereits von *Doluisio* [1969] entwickelt und von *Hanafy* [2001] dahingehend modifiziert, dass auch bei einer kleinen Anzahl von Versuchstieren (2-4) aufgrund der geringen intraindividuellen Schwankungen, zuverlässige und sichere Ergebnisse erzielt werden³⁵.

4.2.2. Targeting der Membran-Efflux-Pumpe P-gp

Dem Einsatz des Perfusionsmodells lag die Überlegung zugrunde, dass bei Konkurrenz zweier Substrate um gleiche Transport- oder Bindungsstellen, jenes mit der höheren Affinität das andere von der Bindungsstelle verdrängt, so dass dieses nicht mehr aus der Zelle transportiert wird, sondern in vermehrtem Ausmaß in die Zelle gelangt bzw. dort verbleibt. Es müsste somit nach Koadministration mit dem entsprechenden P-gp Inhibitor in geringeren Konzentrationen im Perfusat wieder zu finden sein, als wenn es allein perfundiert worden wäre.

Wegen der leichten Zugänglichkeit, der geringen Toxizität und der guten Beständigkeit wurde die Verbindung **2** in einer Konzentration von 30 μM als Vertreter der dimeren 1,4-Dihydropyridine und Ritonavir, ebenfalls in 30 mikromolarer Konzentration, als bekannter HIV-PI und P-gp-Inhibitor gewählt. Modellsubstrat stellte zunächst wegen seiner geringen Bindungsaffinität zu P-gp, mit einem IC₅₀-Wert im Radioliganden-Bindungsassay von über 800 μM , der Betablocker Talinolol dar. Weitere Vorteile dieser Substanz sind eine schnelle Absorption und eine geringe metabolische Clearance, weswegen es auch schon in früheren Studien als Modellsubstrat eingesetzt wurde¹¹³. Hiervon wurden 10 μM Lösungen verwendet. Die Positivkontrolle erfolgte in jedem Fall mit dem starken P-gp Inhibitor Vinblastin⁷², der bisher klinisch als Mitosegift in der Zytostatikatherapie eingesetzt wird, in einer Konzentration von 100 μM . Es wurden drei Darmabschnitte perfundiert, das

4. Ergebnisse und Diskussion

Jejunum, das Ileum und das Kolon, für welches die höchsten Expressionsraten an P-gp im Intestinum beschrieben wurden^{72,88}.

Die größten Absorptionsraten ergaben sich für die Modellsubstanz Talinolol im Jejunum wenn sie allein perfundiert wurde. Dies lässt sich damit erklären, dass in diesem Darmabschnitt vergleichsweise weniger P-gp exprimiert wird¹⁴⁴. Die Ergebnisse dieser ersten Perfusionsstudie ergaben für die Koperfusion mit beiden Inhibitoren eine gleichmäßige Steigerung der Absorption im jeweiligen Segment. Dennoch ist die Absorptionzunahme im Ileum und Colon etwas größer, wenn die Verbindung **2** (H17) koadministriert wurde. Für diese Verbindung ist vom Jejunum bis zum Kolon eine stetige Steigerung der Absorptionsraten zu verzeichnen gewesen. Verbindung **2** zeigt daher sogar bessere Permeabilitätssteigerungen für Talinolol als für dessen Koperfusion mit Ritonavir, für den schon gute P-gp Inhibitionsraten beschrieben wurden⁸⁸ (Tabelle 9, Abbildung 22). Während durch die Koperfusion mit Ritonavir eine Permeabilitätssteigerung für Talinolol um das 1,3 – 1,7-fache erreicht werden konnte betrug sie für die Koperfusion mit Verbindung **2** das 1,4 – 1,9-fache. Da die Verbindung **2** gegenüber Ritonavir bedeutend weniger toxisch ist, liegt hier ein entscheidender Vorteil für potenzielle klinische Studien⁹² (Tabelle 5). Die Bestimmungen wurden jeweils für das R- und S-Enantiomer des Talinolols vorgenommen. Im ilealen Segment ergaben sich bei der Studie einige Unterschiede. Das R-Enantiomer zeigte eine etwas höhere Absorption gegenüber dem S-Enantiomer. Diese geringen stereoselektiven Differenzen wurden bereits für geringe Konzentrationen an R/S-Talinolol beschrieben³⁶. Sie gleichen sich aber bei steigenden Talinolol-Konzentrationen wieder an und sind daher vernachlässigbar³⁶. Somit ist davon auszugehen, dass beide Enantiomerenpaare gleichberechtigt über P-gp transportiert werden. In diesem Zusammenhang wurden zusätzliche Inhibitionsstudien bis zur Sättigung des P-gp inhibitorischen Effekts durchgeführt. Diese ergaben für Ritonavir eine Sättigung bei 90 µM und für H17 bei 40 µM. Die resultierenden effektiven Permeabilitäten lagen zwischen 6,3 bis 6,4 • 10⁻⁴ cm/s und übertrafen damit die der Positivkontrolle Vinblastin, die mit 4,5 bis 5,5 • 10⁻⁴ cm/s ermittelt wurden. Hiermit konnte bewiesen werden, dass die dimeren 1,4-Dihydropyridine in der Tat gute Affinitäten zum Membrantransporter P-gp haben, denn die höchsten Absorptionsraten konnten von H17 schon bei der Hälfte der Konzentration, die für Ritonavir nötig war erreicht werden, welches außerdem bei Konzentrationen über 50 µM toxische Effekte zeigte, wohingegen H17 im eingesetzten Konzentrationsbereich untoxisch war^{40,51}.

4. Ergebnisse und Diskussion

In einer folgenden Kompetitionsstudie sollte an Stelle des Talinolols der HIV-PI Saquinavir treten, da sowohl dessen orale Absorption als auch dessen Penetration in das ZNS stark durch P-gp beeinflusst wird^{114,135,136} und es in verschiedenen *in vitro* Modellen als P-gp Substrat mit zusätzlichen Hinweisen auf eine eventuelle Affinität zu MRP1 oder MRP2 beschrieben ist^{34,51,58,90}. Außerdem sind die verwendeten Modulatoren in Kombinationspräparaten mit Saquinavir einsetzbar, oder könnten im Falle von H17 (Substanz 2) einsetzbar werden.

Tabelle 9

Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für Talinolol allein und die Koperfusion von Talinolol mit Ritonavir und Verbindung 2 (H17) (Mittelwerte \pm SEM, n=4; p<0,05)

Perfusat	Talinolol		Talinolol+Ritonavir		Talinolol+2 (H17)	
	R	S	R	S	R	S
Jejunum	2,01 \pm 0,71	2,41 \pm 0,40	3,76 \pm 1,47	4,05 \pm 1,65		
	3,23 \pm 0,70	2,83 \pm 0,69			3,75 \pm 0,51	3,65 \pm 0,33
Ileum	2,26 \pm 0,90	1,72 \pm 0,56	3,21 \pm 1,09	3,14 \pm 0,96		
	2,29 \pm 0,68	1,88 \pm 0,27			3,56 \pm 0,93	3,29 \pm 0,50
Kolon	2,40 \pm 0,54	2,34 \pm 0,21	4,01 \pm 0,57	3,52 \pm 0,37		
	2,49 \pm 0,42	2,38 \pm 0,52			4,51 \pm 0,61	4,07 \pm 0,37

4. Ergebnisse und Diskussion

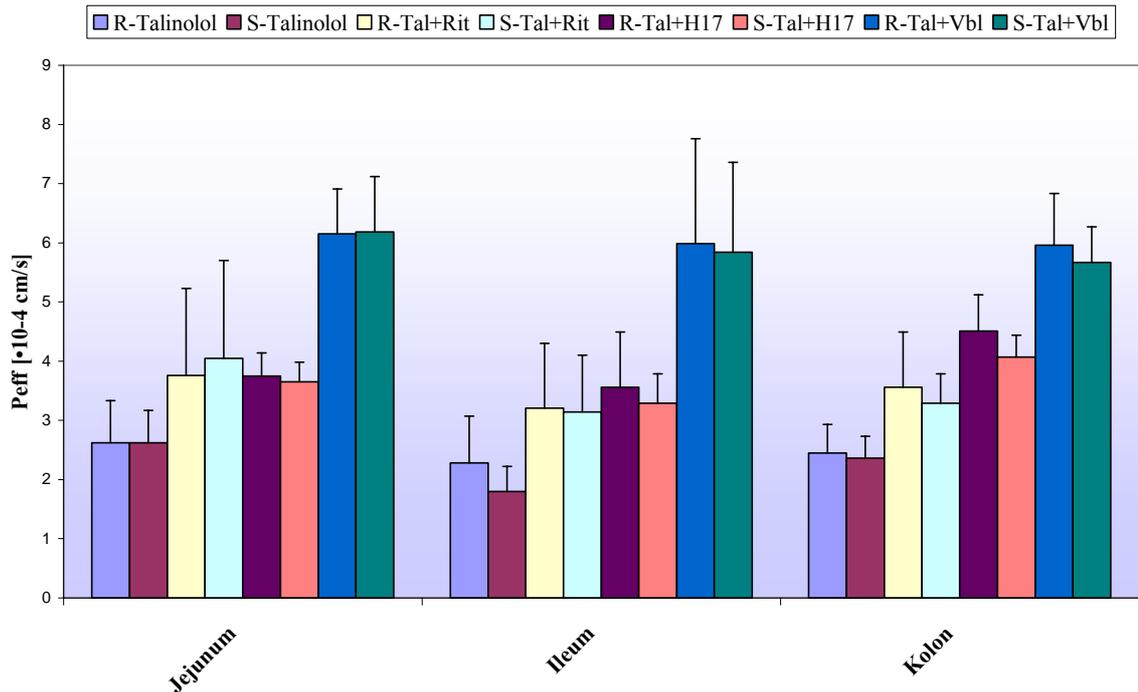


Abbildung 22

Grafische Darstellung der effektiven Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für Talinolol allein und die Koperfusion von Talinolol mit Ritonavir und Verbindung **2** (H17) (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$; $p<0,05$)

Es wurde also analog zum vorangegangenen Versuch verfahren und an Stelle des Talinolols Saquinavir als Modell-Substanz genutzt. In dieser Kompetitionsstudie konnten mit Permeabilitätssteigerungen um das bis zu 2,4-fache bei der Koperfusion mit H17 und um das bis zu 2-fache bei der Koperfusion mit Ritonavir ähnlich gute Ergebnisse gefunden werden, was das Potenzial der eingesetzten Modulatoren abermals bekräftigte (Tabelle 10, Abbildung 23).

4. Ergebnisse und Diskussion

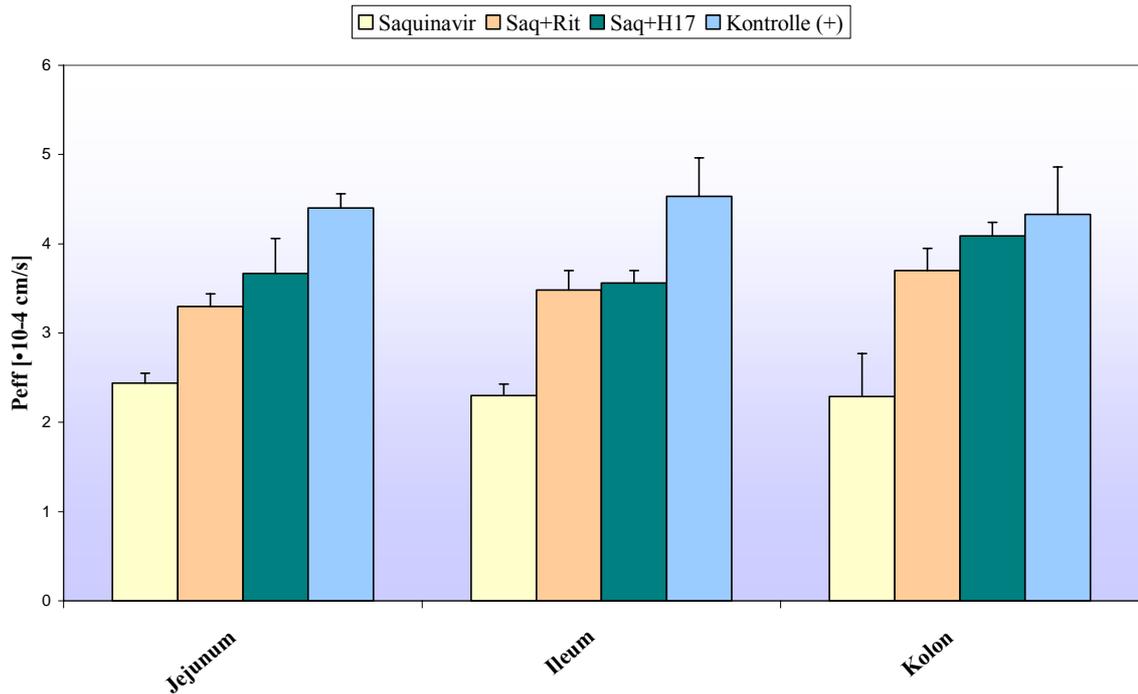


Abbildung 23

Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für Saquinavir allein und die Koperfusion von Saquinavir mit Ritonavir und Verbindung 2 (H17) (Mittelwerte \pm SEM, n=4; p<0,05)

Tabelle 10

Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für Saquinavir allein und die Koperfusion von Saquinavir mit Ritonavir und Verbindung 2 (H17) (Mittelwerte \pm SEM, n=4; p<0,05)

Perfusat	Saquinavir	Saquinavir+Ritonavir	Saquinavir+H17
Jejunum	2,37 \pm 0,08	3,30 \pm 0,14	
			3,67 \pm 0,39
Ileum	2,15 \pm 0,16	3,48 \pm 0,22	
			3,56 \pm 0,14
Kolon	2,13 \pm 0,48	3,70 \pm 0,25	
			4,09 \pm 0,15

4.2.3. IC50-Werte der P-gp Hemmung

Die IC50-Werte der P-gp Hemmung wurden für Ritonavir und H17 gegen die Modellsubstanzen Talinolol (jeweils als R- und S-Enantiomer) und Saquinavir gemessen. Die errechneten IC50-Werte der P-gp Hemmung mit Saquinavir als Modellsubstanz, für

4. Ergebnisse und Diskussion

die auch Affinitäten zu den MRP-Transportern postuliert werden, erwiesen H17 vor allem im Jejunum als besseren P-gp Inhibitor gegenüber Ritonavir. Die IC₅₀-Werte des Ritonavirs waren in beiden untersuchten Darmabschnitten mit ca. 50 µM nahezu gleich; unterschieden sich im Fall des H17s jedoch erwähnenswert (Tabelle 11). Das könnte auf die Fähigkeit des H17s zusätzlich Affinitäten zu MRP-Transportern zu zeigen zurückzuführen sein. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestätigt, dass die IC₅₀ Werte für H17 bei Verwendung des fast reinen P-gp Substrates Talinolol in beiden Darmabschnitten annähernd konstant blieben und auch hier deutlich unter den IC₅₀-Werten des Ritonavirs lagen. Unterschiede der P-gp Hemmung unter Verwendung von R- oder S-Talinolol konnten nicht festgestellt werden (Tabelle 11). H17 war also auch in seinen IC₅₀ Werten der P-gp Hemmung dem Ritonavir in allen getesteten Darmabschnitten und gegenüber jeglichen eingesetzten Modellsstoffen überlegen.

Tabelle 11

IC₅₀-Werte der P-gp Hemmung in µM mit Talinolol und Saquinavir als Modellsstoffen. Werte ± SEM, n=2, *p<0,05

Modellsstoff	IC ₅₀ Ritonavir	IC ₅₀ H17	IC ₅₀ Ritonavir	IC ₅₀ H17
	Jejunum	Jejunum	Ileum	Ileum
R-Talinolol	35,11* ± 0,93	23,84* ± 0,09	37,05* ± 0,97	23,66* ± 0,09
S-Talinolol	37,32* ± 1,26	23,16* ± 0,19	39,69* ± 1,19	23,66* ± 0,25
Saquinavir	51,99* ± 1,04	26,60 ± 0,18	50,17* ± 0,92	35,86 ± 0,96

4.2.4. Targeting der MRP-Transporter

Um eine Bestätigung der Vermutung, dass H17 möglicherweise zusätzlich MRP-Typen hemmen könnte zu erreichen, wurden weitere *in situ* Studien am perfundierten Rattendarm durchgeführt, denn im Intestinum werden diese Transporter ebenso exprimiert⁷². Wegen seiner erwiesenen MRP-Affinität und keinerlei P-gp Affinitäten diente als Modellsstoff das Indometacin²¹ und die Positivkontrolle wurde aus gleichem Grund mit Probenecid durchgeführt. Indometacin findet seit langem in der Schmerztherapie als unspezifischer Cyclooxygenasehemmer Anwendung, wohingegen Probenecid als Urikosurikum und in Kombination mit Penicillin genutzt wird, um dessen Wirkdauer zu verlängern.

Das Ergebnis dieser Studie erbrachte deutlich verbesserte effektive Permeabilitäten für die Modellsstoff Indometacin wenn sie mit H17 koperfundiert wurde (Tabelle 12). Die Steigerungsrate der Absorption betrug in den Darmabschnitten Jejunum und Ileum jeweils

4. Ergebnisse und Diskussion

den Faktor 1,5 verglichen zu der alleinigen Perfusion von Indometacin. Im Kolon war dieser Faktor mit 1,3 etwas kleiner, was aber mit der geringeren Expression von MRP-Transportern in diesem Gewebe erklärbar war⁶. Abermals konnte daher durch eine Koadministration eines Arzneistoffs mit H17, dessen Aufnahme in den Organismus gesteigert werden. H17 besitzt demzufolge ein zusätzliches Potenzial neben P-gp auch noch MRP-Typen zu hemmen.

Tabelle 12

Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für Indometacin allein und die Koperfusion von Indometacin mit Verbindung **2** (H17) und Probenecid als Positivkontrolle (Mittelwerte \pm SEM, n=4; p<0,05)

Intestinales Segment	Indometacin	Indometacin + H17	Indometacin+Probenecid
Jejunum	1,31 \pm 0,04	2,02 \pm 0,07	2,22 \pm 0,09
Ileum	1,84 \pm 0,06	2,76 \pm 0,04	2,92 \pm 0,06
Kolon	1,78 \pm 0,03	2,43 \pm 0,04	2,73 \pm 0,04

4.3. Testung auf Substrateigenschaften des dimeren 1,4-Dihydropyridins H17 (2)

Vor dem Hintergrund der guten P-gp- und auch MRP-Affinitäten des H17s (Substanz **2**) wurden nun Untersuchungen durchgeführt, die Aussagen darüber zuließen ob und zu welchem Ausmaß H17 selbst Substrat des P-gps bzw. MRPs ist. Frühere Studien zeigten beispielsweise für die meisten bisher klinisch verwendeten peptidischen Proteaseinhibitoren zwar Hemmaktivitäten gegenüber P-gp und teilweise auch zu MRP, doch sind sie dabei selber Substrate dieser Strukturen^{23,34,114}. Diese Eigenschaft erwies sich als unvorteilhaft, da für den genannten inhibitorischen Effekt sehr hohe Konzentrationen nötig sind um die Membran-Efflux-Pumpe zu sättigen, so dass sie ihre Energie nur für den Transport des als Inhibitor vorgesehenen Substrates nutzt. Trotzdem war selbst mit hohen Ritonavirdosen bei einer Koadministration mit Saquinavir, dessen Aufnahme in die Zellen auf vorher beschriebene Weise durch Ritonavir gesteigert werden sollte, keine vollständige P-gp-Inhibierung zu verzeichnen⁵¹. P-gp war immer noch in der Lage die Aufnahme von Saquinavir in die Zellen vor allem über die Blut-Hirn-Schranke und Blut-Plazenta-Schranke sowie dessen orale Bioverfügbarkeit stark abzuschwächen⁵¹. Diese Tatsachen belegen einen weiteren Nachteil einer als Inhibitor eingesetzten Substanz, die selbst hohe Substrateigenschaften erfüllt, denn es muss immer davon ausgegangen werden, dass selbst

4. Ergebnisse und Diskussion

an das toxische Niveau heranreichende Dosen nicht in der Lage sein könnten, diese Art der körpereigenen Resistenz entscheidend zu modulieren. Aus diesem Grund kann auch das sehr gut inhibitorisch wirkende Zytostatikum Vinblastin nicht klinisch zur P-gp-Modulation eingesetzt werden. Ein reiner P-gp Inhibitor der entweder keine oder zumindest nur sehr schwache Substrateigenschaften besitzt, wäre in viel geringeren Dosen wirksam, so dass erfolgreiche Inhibitionsraten viel schneller und eher erreicht würden.

Da H17, wie beschrieben, kaum metabolisiert wird, kann mit guten Bioverfügbarkeitsraten gerechnet werden⁴⁴. Ob es nun aber starkes, schwaches oder überhaupt kein Substrat des P-gps oder MRPs ist, wurde durch eine weitere *in situ* Studie in Koadministration mit jeweils einem P-gp-Inhibitor (Vinblastin) oder MRP-Inhibitor (Indometacin) getestet. Hierfür wurde es notwendig einen HPLC-Assay zur Bestimmung von H17 zu entwerfen, was im Rahmen eines Diplomvorhabens von *Eisenschmidt* [2005] realisiert werden konnte²⁴.

4.3.1. Testung auf Substrateigenschaft am P-gp

Mit der Möglichkeit H17 (Substanz **2**) direkt über eine HPLC Methode bestimmen zu können, wurden Perfusionsstudien mit H17 als Modellsubstanz durchgeführt.

H17 wurde allein und in Koperfusion mit einer vergleichsweise hohen Konzentration des starken Pgp-Inhibitors Vinblastin (100 μM) auf seine Substrateigenschaften überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die effektiven Permeabilitäten bei der Koperfusion, verglichen zur alleinigen Perfusion mit H17, zu einem viel geringeren Maß anstiegen, als die vorher untersuchten Koperfusionen des Vinblastins mit Saquinavir und Talinolol (Kapitel 4.2.1.1. und 4.2.1.3.). Beide Substanzen sind ausgesprochene Substrate des P-gps^{34,113}. In Abbildung 24 sind die Steigerungsdaten der Permeabilitäten von Saquinavir, Talinolol (R, S) und H17 bei der Koperfusion mit dem starken P-gp Inhibitor Vinblastin im Vergleich zur alleinigen Perfusion der jeweiligen Substanz graphisch dargestellt. Diese Daten belegen eindrucksvoll die schwachen Substrateigenschaften des H17s, weil die prozentualen Steigerungsraten der effektiven Permeabilitäten pro Darmsegment im Vergleich zu den beiden anderen bekannten Substraten des P-gps deutlich geringer ausfallen. Hieraus ließ sich also direkt nachweisen, dass H17 nur ein schwaches Substrat des P-gps bei hoher nachgewiesener modulatorischer Aktivität ist. H17 besitzt damit ideale Voraussetzungen als ausgezeichnete P-gp-Modulator wirksam zu sein (Abbildung 24 und Tabelle 13).

4. Ergebnisse und Diskussion

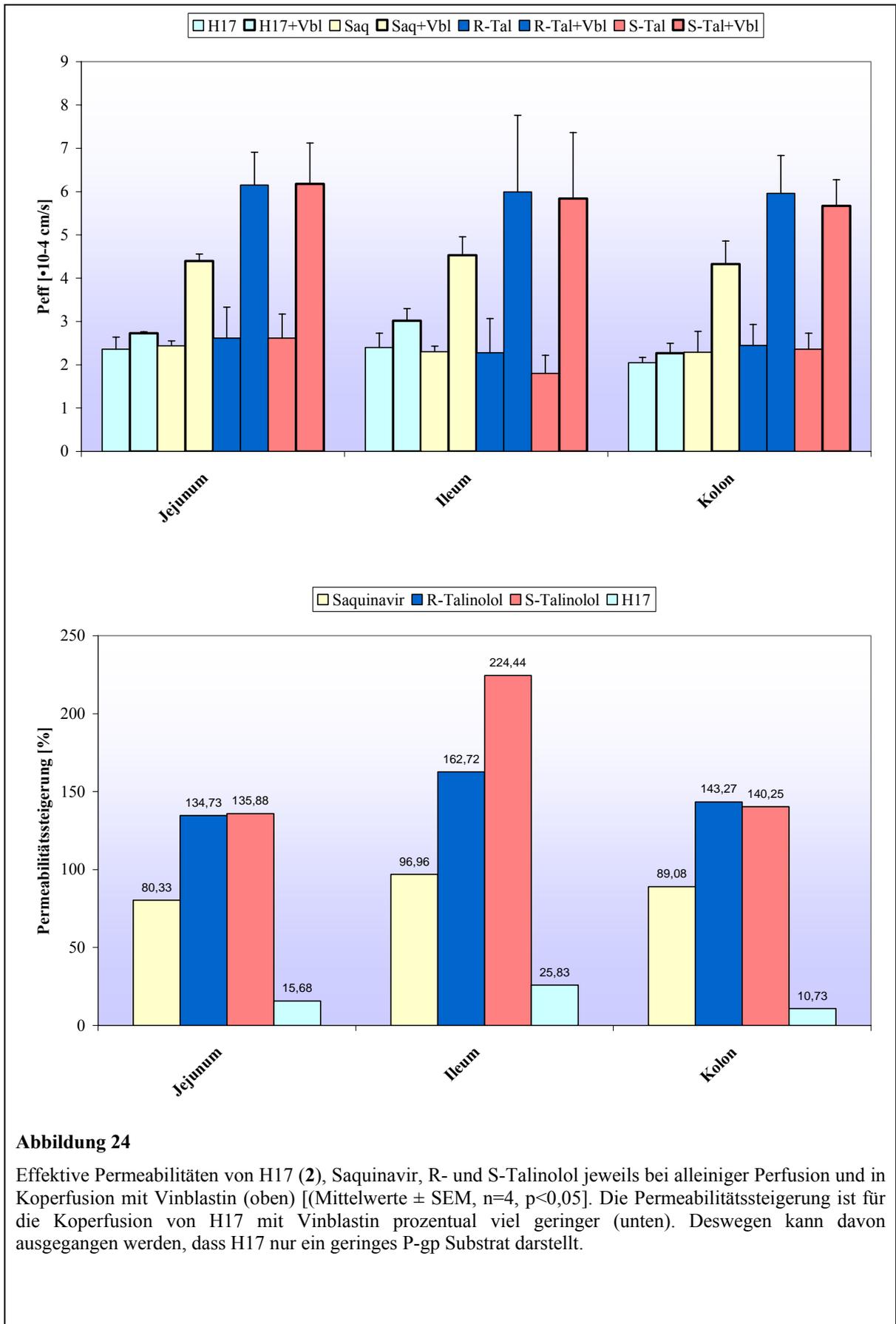


Abbildung 24

Effektive Permeabilitäten von H17 (2), Saquinavir, R- und S-Talinolol jeweils bei alleiniger Perfusion und in Koperfusion mit Vinblastin (oben) [(Mittelwerte \pm SEM, n=4, p<0,05)]. Die Permeabilitätssteigerung ist für die Koperfusion von H17 mit Vinblastin prozentual viel geringer (unten). Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass H17 nur ein geringes P-gp Substrat darstellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 13

Effektive Permeabilitäten P_{eff} [$\cdot 10^{-4}$ cm/s] für H17 (**2**) bei alleiniger und in Koperfusion mit Vinblastin (100 μ M) bzw. Indometacin (1mM). (Mittelwerte \pm SEM, Vinblastin n=2; Indometacin n=3; p<0,05)

intestinales Segment	H17	H17+Vinblastin	H17+Indometacin
Jejunum	2,36 \pm 0,28	2,73 \pm 0,00	2,69 \pm 0,16
Ileum	2,40 \pm 0,33	3,02 \pm 0,28	2,72 \pm 0,35
Kolon	2,05 \pm 0,12	2,27 \pm 0,23	2,54 \pm 0,21

4.3.2. Testung auf Substrateigenschaft am MRP

Wie die vorangegangene Testung der Substrateigenschaften des H17s (Substanz **2**) am P-gp sollte der gleiche Versuch auch in Verbindung mit dem bekannten MRP-Inhibitor Indometacin¹²¹, der ebenso im Vergleich zum H17 in hohen Dosen eingesetzt wurde (1 mM), durchgeführt werden. Hierzu wurde analog zur P-gp-Substrattestung vorgegangen. Die Perfusion und Bestimmung des H17s erfolgte demnach allein und später in Koperfusion mit Indometacin direkt.

Der Unterschied der Permeabilitätssteigerung bei der Koperfusion mit einem Inhibitor ist zwischen H17 und Indometacin weniger stark ausgeprägt, als bei der Testung des H17s auf P-gp-Substrateigenschaften im Vergleich zu Talinolol und Saquinavir. Trotzdem zeigte diese Studie ebenso deutlich geringere Steigerungen der effektiven Permeabilität des H17s im Vergleich zu Indometacin (Tabelle 13, Abbildung 25), was letztendlich auch hier belegt, dass H17 nicht nur ein schwaches P-gp-Substrat, sondern auch ein schwaches MRP-Substrat darstellt, wohingegen es ebenfalls am MRP-Transportsystem bemerkenswerte Modulationseigenschaften besitzt (Kapitel 4.2.1.3.). Das H17 steht daher stellvertretend für eine der bisher stärksten bekannten Klassen an P-gp-Inhibitoren mit zusätzlichem MRP modulatorischem Potenzial. Sie verhalten sich gegenüber diesen Transportsystemen als ausgesprochen schwache Substrate und bergen daher ein bedeutendes Potenzial für deren Einsatz als MDR-Modulatoren.

4. Ergebnisse und Diskussion

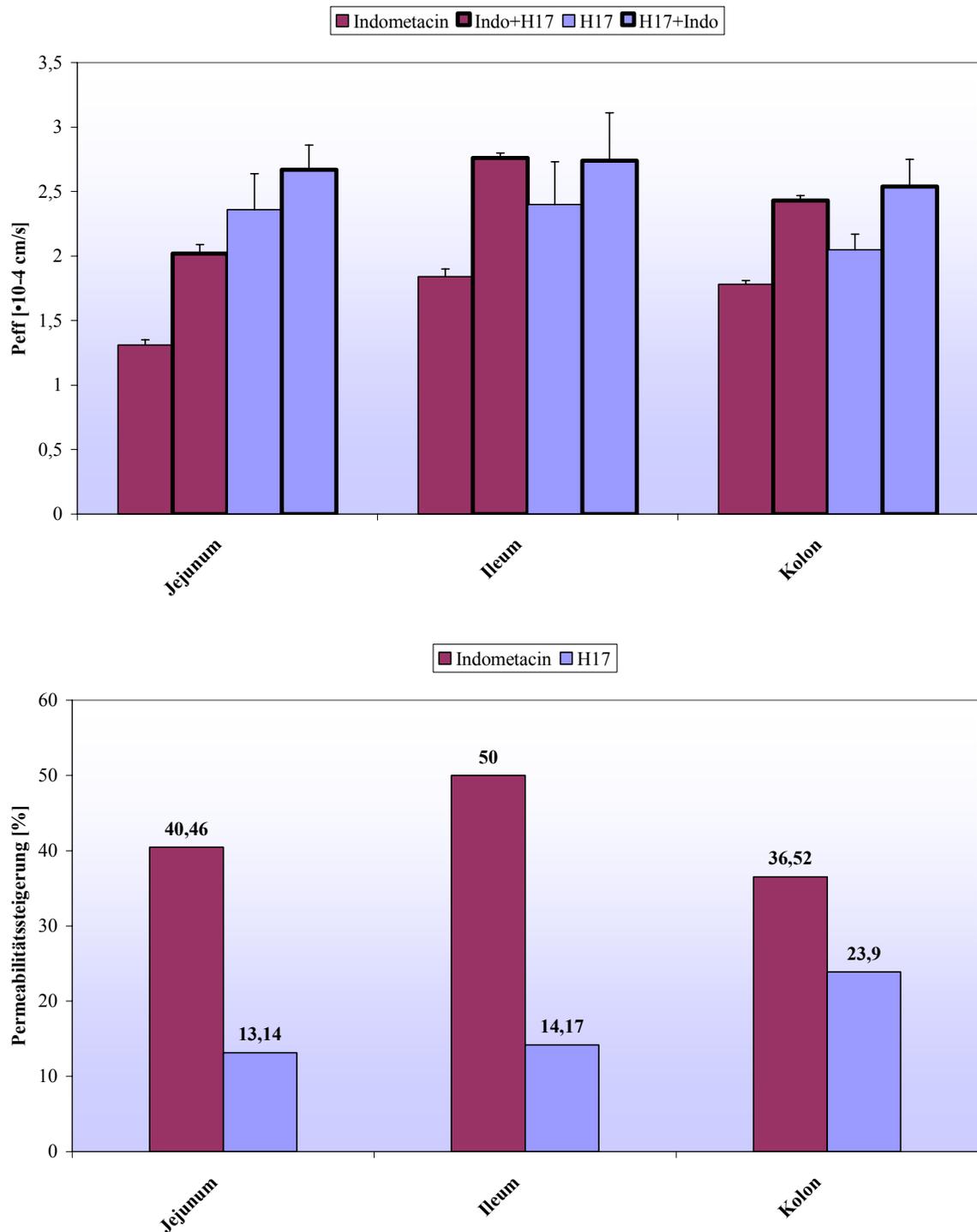


Abbildung 25

Effektive Permeabilitäten von H17 (2) allein und in Koperfusion mit Indometacin sowie die umgekehrte Konstellation der direkten Bestimmung von Indometacin allein und in Koperfusion mit H17 (oben) [(Mittelwerte \pm SEM, n=3; p<0,05]. Auch hier steigt die Permeabilität bei der Koperfusion von Indometacin und der direkten Bestimmung von H17 im Vergleich zur direkten Indometacinbestimmung prozentual nur wenig an (unten).

4.4. Aussagefähigkeit von *in vitro* und *in situ*-Studien

Unterschiedliche *in vitro* Modelle wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um Aussagefähigkeiten zum Affinitätsverhalten einiger MDR-modulatorischer Verbindungen zu den Membrantransportern P-gp und MRP treffen zu können. In zahlreichen früheren Studien wurde bereits darauf verwiesen, dass für das Permeationsverhalten durch Membranen und die Absorption von Arzneistoffen durch verschiedene Gewebestrukturen mehr als ein Transporter verantwortlich ist und dass vor allem ein Zusammenspiel von MRP und P-gp für die Entstehung der Multidrug-Resistance von entscheidender Bedeutung ist^{19,29,54,87,88}.

Davon ausgehend, dass wenn zwei Substrate um eine Bindungsstelle konkurrieren, jenes mit der höheren Affinität bevorzugt transportiert wird und dadurch weniger affine Substrate keiner oder einer verminderten Sekretion unterliegen, sind entsprechende Affinitätsstudien an P-gp exprimierenden Mouse-T-Lymphoma Zellen und MRP-exprimierenden MDA-MB-231 (HTB-26) Zellen durchgeführt worden. Diese Ergebnisse direkt auf *in vivo* Verhältnisse zu übertragen ist nur schwer möglich, da die Inhibitionsraten in den Perfusionsstudien viel geringer ausfielen, als es durch die Zellversuche zu erwarten gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung ist, dass Substanzen mit hohen effektiven Permeabilitäten und gleichzeitigen guten passiven Permeabilitäten sehr schnell absorbiert werden und daher deren Interaktion mit Transportern eine untergeordnete Rolle spielen könnte (siehe Effekt von Verapamil als fast Diffuser, Kapitel 2.3.1). Trotz allem lassen Permeabilitätsstudien am perfundierten Rattendarm gute Prädikationsmöglichkeiten zum *in vivo* Affinitätsverhalten zu.

Aus diesen Gründen wurden verschiedene Methoden zur Begutachtung der Transporteraffinitäten in diese Arbeit aufgenommen, um zur Aufklärung von Bindungsverhalten und –mechanismen beizutragen. Der RLB-Assay diente dazu, erste Aussagen über etwaige Affinitäten zu den untersuchten Transportern festzustellen. Die Zellversuche an P-gp und MRP-exprimierenden Zelllinien dienten dazu, die eingesetzten Substanzen in ihrer Stärke der Affinität zu differenzieren und die *in situ* Perfusionsstudien, welche ursprünglich genutzt wurden um Absorbierbarkeiten von Substanzen bestimmen zu können, wurden eingesetzt, um Ausmaße von Interaktionen zweier koperfundierter Arzneistoffe, die in Konkurrenz zueinander um eine potenzielle Transporterbindungsstelle stehen, zu detektieren; also Aussagen zu Arzneistoff-Arzneistoff-Wechselwirkungen

4. Ergebnisse und Diskussion

treffen zu können. Betrachtet man einen möglichen Therapieansatz *in vivo* werden durch die letztere Methode die aussagefähigsten und prädikativsten Ergebnisse erhalten.

5. Materialien und Methoden

5.1. Radioliganden-Bindungsassay

5.1.1. Chemikalien und Geräte

5.1.1.1. Chemikalien

Acetonitril	(RS)-1-(2-Allylphenoxy)-3-isopropylamino-2-propanol
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin (1000 U/ml, 10000 µg/ml), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) mit stabilem Glutamin, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FBS	Fötales bovines Serum (Fetal bovine serum (FBS)), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
H17 (Substanz 2)	3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12- diphenyl-3,9- diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
H19	Diethyl-1,5-dibenzyl-1, 5, 8, 8bβ-tetra-hydro-4aβ, 8aβ- dihydroxymethyl-4,8-diphenylcyclobuta[1,2-b:3,4- b']dipyridin-3,7(4H,4bβH)dicarboxylat
HBSS	Hank's Salzlösung (Hank's balanced salt solution (HBSS)) ohne Phenolrot, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
L-α-Lysophosphatidylcholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MES	2-Morpholinethansulfonsäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland

5. Materialien und Methoden

NEA	Nichtessentielle Aminosäuren (Non essential amino acids (NEA)), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
PBS-Puffer	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline (PBS)) ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} , Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Rotiszint 22	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA (0,25%; 0,02%), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
^3H -Verapamil	Kix, Volxheim (www.isotopes.de), Deutschland, 55 mCi/mmol
Verapamil	(RS)-2-Isopropyl-2,8-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaocantitril, Verapamil-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Vinblastin	[3aR-[3a α ,4 β ,5 β ,5a β ,9(3R * ,5S * ,7R * ,9S *),10bR * ,13a α]]-Methyl-4-(acetyloxy)-3a-ethyl-9-[5-ethyl-1,4,5,6,7,8,9,10-octahydro-5-hydroxy-9-(methoxycarbonyl)2H-3,7-methanoazacyclo-undecino[5,4-b]indol-9-yl]-3a,4,5,5a,6,11,12,13a-octahydro-5-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-1H-indolizino[8,1-cd]carbazol-5-carboxylat Vinblastinsulfat, Velbe TM , Lilly, Bad Homburg, Deutschland

5.1.1.2. Geräte

Counter	Flüssigszintillationszähler, Beckman Coulter, Unterschleissheim, Deutschland
Datenanalyse	Windows 2000, Microsoft Excel 2000, Microsoft Corporation, USA Microcal Origin TM , Version 6.0, Microcal Software, Northampton, USA
Destillation	Destamat, Bi 18, Heraeus, Hanau, Deutschland

5. Materialien und Methoden

Filter	GF/C Filter, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland
Hämocytometer	Thoma-Zählkammer, Roth, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Harvester	Brandel Harvester M-24R, Biomedical Research & Development Laboratories, Gaithersburg, USA
Inkubator	CO ₂ -Inkubator MCO 17 AL, Sanyo, Vertrieb durch MS-Laborgeräte Wiesloch, Deutschland
pH-Meter	pH 538 MultiCal, WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Platten	MicroWell™ Plate, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Schüttler	IKA™-Schüttler MTS 2, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Zellkulturflaschen	Zellkulturflaschen mit Filterverschluss, 75 cm ² , Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturröhrchen	PP-Röhrchen, steril. 15 und 50 ml, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5804R, Hamburg, Deutschland

5.1.2. Bindungsassay und Caco-2-Zellpräparation

Die Durchführung des Radioliganden-Bindungsassays und der Präparation der Caco-2-Zellen wurden von *Dressler* [2002] beschrieben und durchgeführt²². Der Assay wurde von *Döppenschmidt* [1999] entwickelt und von *Dressler* [2002] modifiziert.

Dem verwendeten Bindungsassay lag die Theorie zugrunde, dass Liganden einander kompetitiv von der Bindungsstelle am Membrantransporter P-gp verdrängen können. Er basiert auf, durch Zugabe des Zytostatikums Vinblastin, stabil P-gp überexprimierenden Caco-2-Zellen. Die Testsubstanzen wurden in einem Inkubationspuffer, der aus Hank's Salzlösung bestand gelöst. Der Puffer enthielt mit Morpholinoethanolsulfonsäure (10 mM) einen zusätzlichen Puffer. Wegen der schlechten Löslichkeit der dimeren 1,4-Dihydropyridine H17 und H19 wurde noch 1% DMSO als Lösungsvermittler zugegeben. Mit Salzsäure erfolgte dann die Einstellung des Puffers und der Testlösungen auf pH 7,0. Die ³H-Verapamil-Radioligandenkonzentration, die zur Bestimmung der Testsubstanzen eingesetzt wurde betrug 1 µM (20% ³H-Verapamil). Jeder Inkubationsansatz enthielt außerdem 100 µl der Testsubstanzlösung in definierter Konzentration, 25 µl ³H-Verapamil

5. Materialien und Methoden

und 125 µl Zellsuspension²². Die Proben wurden bei Raumtemperatur 30 Minuten geschüttelt (1200 Upm). Die Abtrennung des nichtgebundenen Radioliganden vom Anteil, der an P-gp gebunden vorlag, erfolgte durch eine Vakuumfiltration mit einem Glasfilter in einem Brandell-Zell-Harvester. Hierzu wurde jeder Filter mit eisgekühlter isotonischer Natriumchlorid-Lösung (0,9% NaCl) gewaschen und danach in 4ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen. Die Radioaktivität, die sich noch auf dem Filter befand, wurde in einem Flüssigszintillationszähler bestimmt.

Durch den Einsatz dieses Assays konnten Affinitäten der Testsubstanzen zum P-gp durch Verdrängung des ³H-Verapamils gemessen werden.

5.1.3. Berechnung der IC50-Werte

Die Affinität zum Membrantransporter P-gp der ungelabelten Substanzen wurde durch die Verdrängung des Radioliganden ³H-Verapamil mit zunehmenden Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz ermittelt.

Die Anpassung der sigmoiden Kurven aus den Verdrängungsexperimenten wurde mit Microcal OriginTM, Version 6.0 nach untenstehender Gleichung durchgeführt:

$$y = y_0 + \frac{a \cdot x^b}{c^b + x^b}$$

y_0	Verdrängung bei minimaler Substanzkonzentration
a	Verdrängung bei maximaler Substanzkonzentration
b	Hill-Koeffizient
c	IC50-Wert (µM)

Der IC50-Wert gibt die Konzentration an, bei der die Bindung des Radioliganden um 50% inhibiert wird. Er ist damit ein Maß für die Affinität zum jeweils getesteten Membrantransporter.

Spezifische Bindung [%] = Gesamtbindung – Nicht-spezifische Bindung

5.2. Untersuchungen zur P-gp Transporteraffinität an Mouse-T-Lymphoma-Zellen

5.2.1. Mouse-T-Lymphoma-Zellpräparation

Die NCI-L5178Y Stammzelllinie wurde aus murinen T-Lymphomen gezüchtet. Sie wird in modifiziertem McCoy's 5A Medium, das aus 10-prozentigem hitzeinaktiviertem

5. Materialien und Methoden

Pferdeserum, zahlreichen Aminosäuren wie L-Glutamin (200 mM) und Antibiotika wie 10-prozentigem Streptomycin und dem in 1%iger Konzentration zugesetzten Antimykotikum Nystatin besteht und in einer CO₂-Atmosphäre von 5% bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Die MDR-resistente Zelllinie ging aus einer Modifizierung der Stammzelllinie hervor. Hierzu wurde diese mit einem pHa MDR/A Retrovirus infiziert und um uniforme P-gp Expressionsraten zu erzeugen, wurde dem Nährmedium 60 ng/ml des Herbstzeitlosenalkaloids Colchicin zugegeben. Diese Konzentration verhindert durch ihre zytostatische Wirkung eine Vermehrung der nichtinfizierten Zellen im Medium. Die

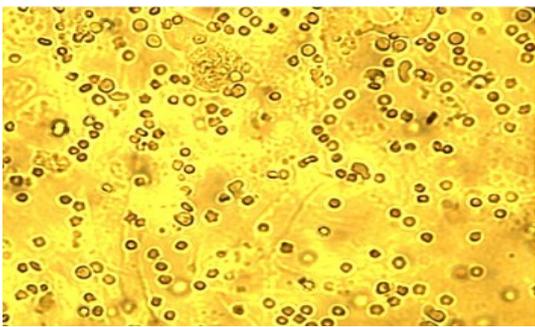


Abbildung 26

Mikroskopische Aufnahme der Mouse-T-Lymphoma Stamm-Zelllinie L5718v Zelllinie 250fach vergrößert.

infizierten, P-gp exprimierenden Zellen transportieren mit Hilfe des beschriebenen Resistenzmechanismus das Colchicin über P-gp aus der Zelle heraus und bleiben unbeschädigt. Die Uniformität wurde zusätzlich durch Markierung der infizierten Zelllinie (L5718YvMDR) mit einem monoklonalen Antikörper (MRK-16-FITC) und anschließender FACS-Analyse detektiert und gesichert. Durch diese

Methode gelang es eine direkte Vergleichbarkeit zwischen der MDR1-infizierten und der Stammzelllinie zu erreichen. Effekte, die in einer Mehraufnahme von P-gp Substraten in die Zelle resultieren, konnten somit geradlinig mit einer Transporteraffinität der Testsubstanzen in Verbindung gebracht werden.

5.2.2. Zytotoxizitätstests

5.2.2.1. Chemikalien und Geräte

5.2.2.1.1. Chemikalien

Dimere 1,4-Dihydropyridine außer 13 (Testsubstanzen auf Zytotoxizität)

HX (1)

3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-

6,12-bis(4-methoxyphenyl)-

3,9diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan

H17 (2)	3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
(3)	3,9-Ditert.butyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
(4)	3,9-Dibenzoyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
(4a)	3,9-Dibenzoyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
(5)	3-Tetrabutylloxycarbonyl-9-benzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
(5a)	3,9-Ditert.butyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
(6)	3-tertbutyloxycarbonyl-9-benzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6-phenyl-12-(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
(8)	3,9-Dibenzyl-1,7-dihydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
(9)	3,9-Dimethyl-1,7-dihydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
JW41 (10)	1,5,7,11-Tetrahydroxymethyl-3,9-bis(4-methoxybenzyl)-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan

- (13) 3-Chloro-4-phenyl-
benzo[4,5]furo[2,3]pyridin-6-ol
- (15) 1,7-Dihydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-
diphenyloxycarbonyl-3,9-
diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan
- (16) 1,7-Dihydroxymethyl-3,9-
dimethyloxycarbonyl-6,12-diphenyl-3,9-
diazahexacyclo-[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan
- (17) 1,7-Dihydroxymethyl-3,9-di-
tert.butyloxycarbonyl-6,12-diphenyl-3,9-
diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan
- (19) 3-Tetrabutylloxycarbonyl-9-benzyl-1,5,7,11-
tetrahydroxymethyl-6-(4-methoxyphenyl)-12-
phenyl-3,9diaz-
hexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan
- (19a) 3-Tetrabutylloxycarbonyl-9-(4-
methoxyphenyl)-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-
6,12-diphenyl-3,9diaz-
hexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan
- JW46b (20) 3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-
6,12-bis(4-hydroxyphenyl)-3,9-
diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan
- JW53 (21) 3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-
6,12-bis(3-hydroxyphenyl)-3,9-
diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan
- JW46a (22) 3,9-Dibenzyl-6,12-bis(4-benzyloxyphenyl)-
1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-3,9-
diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan

5. Materialien und Methoden

Datenanalyse	Windows XP, Microsoft Excel XP, Microsoft Corporation, USA Microcal Origin™ Version 7.0 Microcal Software, Northampton, USA und Prism 4 for Windows™ Version 4.00, GraphPad Software Inc., Software MacKiev™, Kiev, Ukraine
DMSO 1%	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMSO ^{D6} 1%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Epirubicin (nur in checkerboard-Studie)	4-(4-Amino-3-hydroxy-2-methyl-tetrahydropyran-6-yl)oxy-2,5,12-trihydroxy-2-(2-hydroxyazetyl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydrotetrazen-6,11-dion
modifiziertes McCoy's 5A Medium	McCoy's 5A Medium [Modified] mit L-Glutamine, ohne Natriumcarbonat, für die transfizierte Zelllinie zusätzlich zur Selektion mit Colchicin-Lösung 60 ng/ml Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MTT-Reagens	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid] 5mg/ml in Phosphatpuffer ((Phosphate buffered saline) PBS), unsteril, gebrauchsfertig, Boehringer Mannheim Biochemica
PBS	Phosphatpuffer ((Phosphate buffered saline) PBS), unsteril, gebrauchsfertig, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim Deutschland
Ritonavir(7)	[5S-(5R*,8R*,10R*,11R*)]-10-Hydroxy-2-methyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazolyl]3,6-dioxo-8,11-bis(phenylmethyl)-2,4,7,12-tetraazatriecan-13-säure-5-thiazolylmethylester, Ritonavir, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Salzsäure (0,01M)	HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland

5. Materialien und Methoden

SDS-Lösung	100 mg/ml-10% in 0,01 M HCl, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland
Zellkulturröhrchen	PP-Röhrchen, steril 15 und 50 ml, Greiner, Frickenhausen, Deutschland

5.2.2.1.2. Geräte

96-well-Platten	MicroWell™ Plate, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Brutschrank, CO ₂ -Inkubator	BC 150, CO ₂ -Inkubator, 150L, SMLT-Marktplatz für Laboreinrichtungen und Technik Vertriebszentrum Worms, Worms, Deutschland
ELISA microtiter-plate-reader	EL301 Strip Microplate Reader, Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland

5.2.2.2. Durchführung des Zytotoxizitätstests (MTT-Assay)

Tests auf die Fähigkeit von Zellen gewisse Proliferationsraten zu zeigen und somit deren Lebensfähigkeit, Überlebensrate und metabolische Aktivität zu überprüfen, sind von tragender Wichtigkeit bei der Bestimmung der Zytotoxizitäten von Testsubstanzen. Durch die Verwendung von Methyltetrazoliumsalzen wurde die Quantifizierung von metabolisch aktiven Zellen möglich, denn das gelbliche MTT wird nur durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisiert und lagert sich dabei unter oxidativer Aufspaltung des Tetrazolringes zu einem lilafarbigem Formazan um (Abbildung 16). Weil nur lebende und zur Teilung befähigte Zellen eine solche Enzymaktivität aufweisen können, ist auf diesem Weg eine schnelle Quantifizierung möglich. Bei abgestorbenen Zellen ändert sich die Farbe nicht, sondern bleibt auf der Stufe des gelblichen unoxidierten MTT-Salzes stehen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass sich ohne radioaktive Isotope Zellwachstum und Überlebensrate und somit auch Zytotoxizitäten bestimmen lassen und die Detektion der Absorption vorteilhaft, schnell und mit großen Probenmengen in einem Spektrophotometer (ELISA reader) durchgeführt werden kann. Der Test wird weiterhin für

5. Materialien und Methoden

die Quantifizierung von antiproliferativen Effekten, Chemosensitivierung bei Tumorzellen und die Visualisierung von Virus-infizierten Zellen eingesetzt¹⁰⁵.

Der MTT-Test wurde in 96-well-Platten durchgeführt. Zur Kontrolle der Eigenabsorption des Mediums wurde eine Reihe der Platte nur mit modifiziertem McCoy's 5A-Medium befüllt. Ebenfalls zu Kontrollzwecken beinhaltete eine zweite Reihe nur Nährmedium und Zellen und in eine dritte Reihe wurde lediglich mit der Testsubstanz in ihrer Ausgangskonzentration bestückt. Alle anderen Wells wurden mit 100 µl Nährmedium und den jeweiligen Testsubstanzen in der Weise befüllt, dass sich pro weiterer Reihe der well-Platte die Konzentrationen der Testsubstanzen halbierten. Auf diese Weise ließ sich eine Konzentrationsabhängigkeit eventuell vorhandener Zytotoxizitäten bestimmen. Danach wurden zu jedem Well 50000/100 µl Mouse-T-Lymphoma Zellen (L5178YvMDR) gegeben. Lediglich die Reihe für Kontrollzwecke zur Eigenabsorption des Mediums wurde ohne Zellen weiterbearbeitet. Zu Vergleichszwecken wurde der Test zusätzlich mit der Stammzelllinie L5178Y durchgeführt. Die Anzahl der Zellen wurde mikroskopisch mit der Rastermethode bestimmt. Hierzu wurde ein gerasterter Objektträger mit Zellsuspension bestückt. Anschließend wurde der Mittelwert aus der Anzahl der Zellen, die sich in 10 Quadranten befanden gebildet und die Gesamtzahl der Zellen in den Zellkulturflaschen nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gesamtzahl der Zellen in 10 ml} = \bar{x} \text{ (ausgezählte Zellen)} \cdot 25 \cdot 10^4$$

Nach Zugabe der Zellen folgte eine 48-stündige Inkubationsphase bei 37°C und einer 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre. Nach abgeschlossener Inkubation wurden zu jedem well, ausgenommen der Kontrollreihe auf Eigenabsorption, 10 µl MTT-Reagens (5 mg/ml) gegeben. Prinzipiell sollten immer auf ein Verhältnis zwischen MTT-Lösung und Nährmedium von 1:10 geachtet werden. Unter gleichen Bedingungen wird nun nochmals für vier Stunden inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die beschriebene enzymatische Reaktion. Weil eventuell Formazan-Kristalle entstehen können, die letztendlich die Absorptionsmessung beeinträchtigen, wurde nach dieser Inkubationsphase zu jedem well 100 µl SDS-Lösung (100 mg/ml) zum kompletten Auflösen etwaiger Formazan-Kristalle gegeben und über Nacht ebenfalls unter den angegebenen Bedingungen inkubiert. Darauf folgend wurde die Absorption in einem ELISA-microtiter-plate-reader gemessen, die je nach Anzahl lebender Zellen unterschiedlich stark ausfiel und somit ein direktes Maß für eine Zytotoxizitätsbestimmung darstellt. Fast alle getesteten dimeren 1,4-Dihydropyridine zeigten eine größere Absorption als der bereits klinisch eingesetzte HIV-PI Ritonavir

5. Materialien und Methoden

(Tabelle 5) und besaßen somit zumeist eine bedeutend geringere Zytotoxizität, was deren Unbedenklichkeit bei einem möglichen therapeutischen Einsatz unterstreicht.

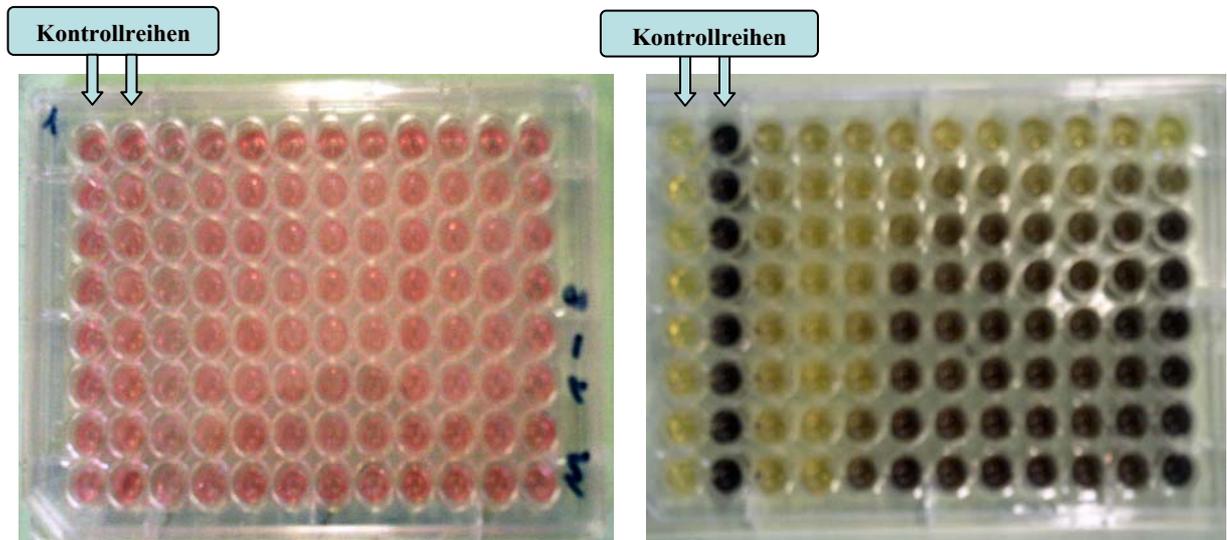


Abbildung 27

96-Well-Platten vor (links) und nach (rechts) der Inkubation mit MTT

5.2.3. Checkerboard-Studien (Epirubicin-Synergismus-Test)

Der Epirubicin-Synergismus-Test stellt eine Erweiterung des MTT-Assays dar und lässt Aussagen über den zytostatischen Effekt von Koadministrationen von verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen mit einem etablierten Zytostatikum an Zellpopulationen zu. Es kann desweiteren differenziert werden, ob es sich dabei um einen synergistischen, additiven, indifferenten oder antagonistischen Effekt handelt. Zu den Testsubstanzen **8**, **9**, **15** und **17** die in diesen Test aufgenommen wurden, wurde lediglich das Zytostatikum Epirubicin in abfallenden Konzentrationen in die Wells gegeben (Abbildung 28), ansonsten wurden die gleichen Reaktionsbedingungen, Chemikalien und Geräte wie beim MTT-Assay angewandt. Außerdem wurden zwei zusätzliche Kontrollreihen mit dem Zytostatikum und der jeweils zu testenden Verbindung befüllt.

Die Berechnung der IC₅₀-Werte der Zelltoxizität wurde über die Veränderung der Farbintensität und somit der Absorption ansteigender Konzentrationen der Testsubstanzen bestimmt (10 verschiedene Konzentrationen pro Substanz). Alle nichtlinearen Regressionsanalysen und Kurvenanpassungen wurden mit Hilfe von Microcal Origin™ Version 7.0 und Prism 4 for Windows™ Version 4.00 durchgeführt. Die IC₅₀-Werte ergaben sich wiederum aus folgender Gleichung:

5. Materialien und Methoden

$$y = y_0 + \frac{a \cdot x^b}{c^b + x^b}$$

- y_0 Absorption bei minimaler Substanzkonzentration
- a Absorption bei maximaler Substanzkonzentration
- b Hill-Koeffizient
- c IC50-Wert (μM)

Der IC50-Wert gibt die Konzentration an, bei der die Überlebensrate der Zellen 50% beträgt. Somit ließen sich Aussagen über die Zytotoxizität der Testsubstanzen in Kombination mit Epirubicin machen. Alle Testreihen wurden ebenso mit der Stammzelllinie durchgeführt, um bei einem Angleich der IC50-Werte aus beiden Zelllinien eine vollständige P-gp Inhibierung feststellen zu können. Gleichzeitig ließen sich bei umgekehrter Betrachtung die IC50-Kurven aus Sicht des Epirubicins darstellen, so dass diese Methode die Möglichkeit bietet beide getesteten Substanzen direkt miteinander zu vergleichen und so die ideale Kombinationskonzentration zu bestimmen.

Die durchschnittlichen inhibitorischen Konzentrationen wurden als FIC (Fractional inhibitory concentration) Werte über den Quotienten aus den jeweilig mittleren Inhibitionsraten MIC der alleinig eingesetzten Substanz und in Kombination nach folgender Gleichung:

$$\mathbf{FIC\ A,B} = \frac{\mathbf{MIC\ A,B}_{(\text{in Kombination})}}{\mathbf{MIC\ A,B}_{(\text{allein})}}$$

FIC	Fractional inhibitory concentration
MIC	Mean inhibitory concentration
FIX	Fractional inhibitory index

A=Epirubicin, B= jeweilige Substanz (also **8, 9, 15** oder **17**)

Der FIC B-Wert spiegelt das umgekehrte Verhältnis des FIC A-Wertes wieder. Über den FIX (Fractional inhibitory index) Wert wurde dann ermittelt, ob es sich bei der jeweiligen Kombination um einen synergistischen ($\text{FIX} < 0,5$), additiven ($\text{FIX} = 0,5 - 1$), indifferenten ($1 \leq \text{FIX} \leq 2$) oder antagonistischen Effekt ($\text{FIX} > 2$) in Bezug auf die Zytotoxizität der eingesetzten Mouse-T-Lymphome-Zellen handelte. Dem FIX Wert liegt folgende Gleichung zugrunde:

$$\mathbf{FIX = FIC\ A + FIC\ B}$$

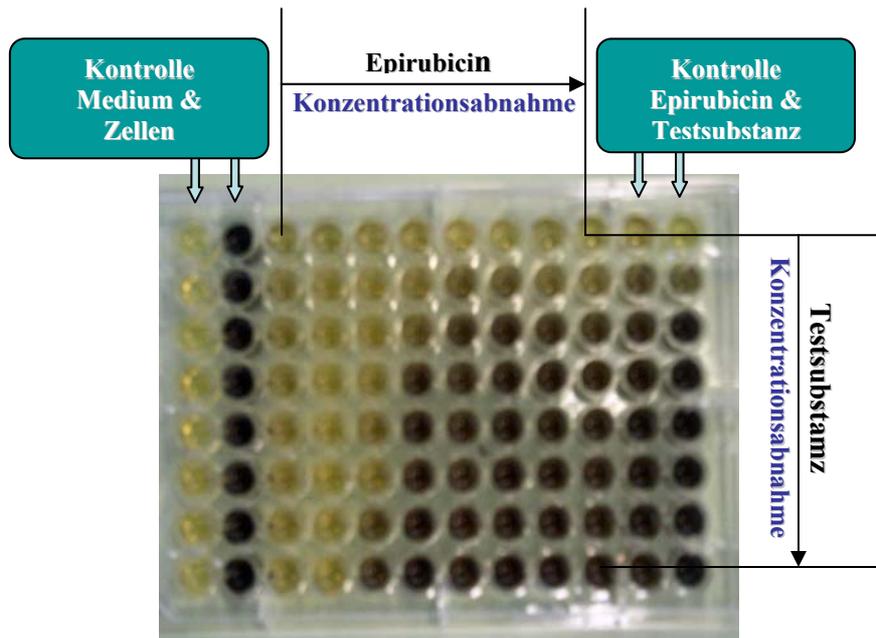


Abbildung 28

Checkerboard (Epirubicin-Synergismus)-Test; Bestückung der well-Platten und Farbänderung je nach Zytotoxizität nach allen Inkubationsphasen

5.2.4. Fluorescence-Uptake-Assay zur Überwindung der MDR in P-gp exprimierenden Tumor-Zellen

5.2.4.1. Chemikalien und Geräte

5.2.4.1.1. Chemikalien

Dimere 1,4-Dihydropyridine
(Testsubstanzen auf Zytotoxizität)

Siehe Zytotoxizitätstests Kapitel 5.2.2.1.1.
Substanzen **1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22**

DMSO

Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

modifiziertes McCoy's 5A Medium

McCoy's 5A Medium [Modified] mit L-Glutamine, ohne Natriumcarbonat, für die transfizierte Zelllinie zusätzlich zur Selektion mit Colchicin-Lösung 60ng/ml Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

PBS

Phosphatpuffer ((Phosphate buffered saline) PBS), unsteril, gebrauchsfertig, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Deutschland

5. Materialien und Methoden

Rhodamine123	Molecular Probes™, Leiden, Niederlande
Ritonavir	[5S-(5R*,8R*,10R*,11R*)]-10-Hydroxy-2-methyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazolyl]3,6-dioxo-8,11-bis(phenylmethyl)-2,4,7,12-tetraazatridecan-13-säure-5-thiazolylmethylester, Ritonavir, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Verapamil	(RS)-2-Isopropyl-2,8-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaocantinitril, Verapamil-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

5.2.4.1.2. Geräte

Absaugvorrichtung	Eigenbau der medizinischen Fakultät, Institut für Mikrobiologie, Universität Szeged, Szeged, Ungarn
Brutschrank	
Eppendorfröhrchen	Eppendorf Reaktionsgefäße RK12, 13, 14 Eppendorf Vertrieb GmbH, Köln, Deutschland
FACS-Analysenröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Vertrieb Budapest, Ungarn
Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	FACSVantage Beckton Dickinson GmbH, Vertrieb Budapest, Ungarn
Wasserbad	Lauda M3 Typ B, Lauda Dr. R. Wobster GmbH & Co KG Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellkulturröhrchen	PP-Röhrchen, steril. 15 und 50 ml, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge	Labofuge 400 R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

5.2.4.2. Durchführung des Assays

Der Fluorescence-Uptake-Assay mit Rhodamine123 als fluoreszierendes P-gp Substrat ist eine etablierte Methode um P-gp abhängige Sekretionen von Substanzen an P-gp exprimierenden Zelllinien zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf eine eventuell inhibitorische Aktivität von Testsubstanzen schließen zu können⁶⁶.

5. Materialien und Methoden

Nachdem die mit dem pHa MDR1/a Retrovirus kultivierten und unter Zugabe von Colchicin selektierten Zellen gezüchtet wurden, wurden sie auf eine Anzahl von $2 \cdot 10^6$ /ml justiert und nach Zentrifugation bei 2000 Upm und Entfernen des Überstandes in frischem, modifiziertem McCoy's 5A Medium resuspendiert. Anschließend wurden 0,5 ml dieser Zellsuspension in jedes Eppendorfröhrchen gegeben. Danach wurden die Eppendorf-Gefäße mit den gewünschten Konzentrationen an Testsubstanzen befüllt, deren Stammlösungen sich in DMSO befanden, und 10min inkubiert. Um die Autofluoreszenz der Zellen zu detektieren, wurde ein Teströhrchen mit der Stammzelllinie befüllt und unbehandelt belassen, sowie in ein anderes zu der transfizierten Zelllinie 5 µl Verapamil in 10-mikromolarer Konzentration gegeben, um die Existenz an P-gp in ausreichenden Mengen nochmals zu kontrollieren. Diese Probe stellte demnach die Positivkontrolle dar¹³⁷. Alle außer dem Röhrchen für den Test auf Eigenfluoreszenz erhielten anschließend 10 µl 5-mikromolarer Rhodamine123-Lösung und wurden erneut diesmal für 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder bei 2000 Upm zentrifugiert und zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen, um sie vom Nährmedium und nichtaufgenommenen Rhodamine123 zu befreien, da beide unentfernt das Messergebnis beeinflussen würden. Der Waschüberstand wurde nach erfolgter Zentrifugation jeweils abgesaugt gefolgt von einer erneuten Resuspension in PBS (pH 7,4). In dieser Form führte man die Zellen dann der Fluoreszenz-Messung per FACS-Analyse in einem Becton-Dickinson FACScanner (cell sorter) zu.

5.2.4.3. Berechnung der inhibitorischen-Aktivitätsverhältnisse

Für das Ausmaß der inhibitorischen Aktivität oder der Fluoreszenz-Aktivitätsverhältnisse ist der in den Zellen akkumulierte Anteil an Rhodamine123 ausschlaggebend, denn je nach Affinität und Stärke der Bindung von Testsubstanzen bzw. potentiellen P-gp Modulatoren an P-gp gelangt auch Rhodamine123 mehr oder minder stark in den Intrazellularraum. Blicke P-gp ungehemmt, dann würde kaum oder gar kein Rhodamine123 in der Zelle verbleiben, sondern über das P-gp aus ihr heraustransportiert werden.

Die inhibitorische Aktivität einer Substanz lässt sich nach folgender Gleichung errechnen:

$$R = \frac{\text{(MDR1 behandelt / MDR1 unbehandelte Kontrolle)}}{\text{Stammzelllinie behandelt / Stammzelllinie unbehandelte Kontrolle}}$$

5.2.4.4. Der Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)-Aufbau und Funktionsweise

Der Fluorescence Activated Cell Sorter wurde 1960 von *Bonner, Sweet, Hulett, Herzenberg* u.a. entwickelt um lebende Zellen von abgestorbenen sortieren zu können und Flow cytometrie durchzuführen. Das erste kommerziell erwerbbares Gerät wurde 1970 von Becton-Dickinson bereitgestellt. Die Methode wird heutzutage für zahlreiche Analysen angewendet. Sie erlaubt die gleichzeitige Markierung, Analyse und Sortierung von Zellen jeglicher Art. Beispielsweise findet sie neben der in dieser Arbeit genutzten Analyse auch Anwendung in der Immunologie zur Charakterisierung menschlicher Blutzellen von HIV-positiven Patienten und zur intrazellulären Zytokinanalyse, in der Zell- und Molekularbiologie bei Patienten, die sich einer Stammzelltransplantation unterzogen, bei der Erkennung und Analyse zahlreicher proliferativer Zellen aus Tumorgewebe und sie findet mittlerweile auch Einsatz in der klinischen Chemie³⁷. Die FACS-Geräte erreichten die Labors dieser Welt durch die Erfindung der Produktion von monoklonalen Antikörpern durch *Köhler* und *Milstein* [1975]. Diese Antikörper ließen sich ohne weiteres an Fluoreszein koppeln, was letztlich den Einsatz solcher Geräte vervielfachte³⁷. Prinzipiell funktionieren auch heute noch alle FACS-Geräte in der gleichen Weise wie das erste aus dem Jahr 1974. Mittlerweile haben sich aber die Anzahl der verwendeten Laser und Detektoren in einem Gerät deutlich erhöht (Abbildung 30).

Bei der Durchflusszytometrie erlaubt dieses Gerät eine Analyse der Zellen anhand dreier Parameter, der Größe des Partikels, der Granularität des Partikels und der Fluoreszenz. Hierfür ist das Gerät mit einem Laser, welcher Licht der Wellenlänge 488nm erzeugt, ausgestattet. Die Größe der Zellen wird demnach durch die Ablenkung des Lichts parallel (Vorwärtsstreuung FSC) oder in 90°-Richtung (Seitwärtsstreuung SSC) seines Antreffens auf den Partikel oder die Zelle bestimmt (Abbildung 29). Die an die Partikel gebundenen oder die wie in dieser Arbeit in die Zellen aufgenommenen Fluorochrome werden durch Laserlicht entsprechender Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht abgeleitet und vermessen.

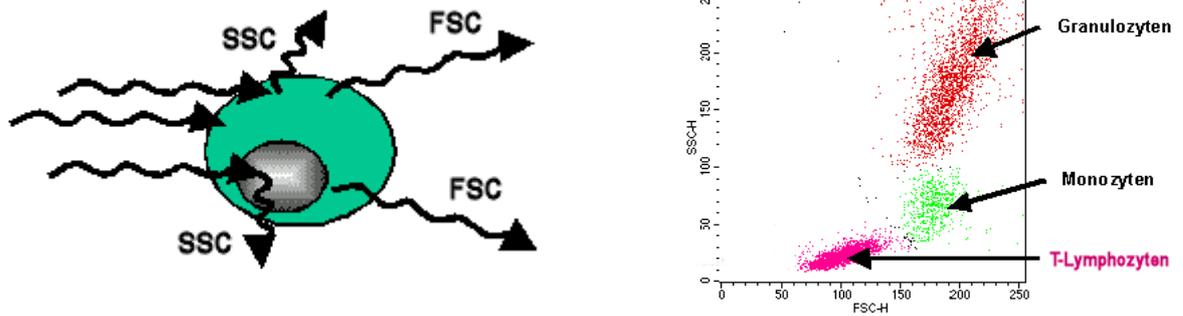


Abbildung 29

Seitwärtsstreuung (SSC) und Vorwärtsstreuung (FSC) nach Auftreffen des Lasers auf ein Partikel (links) und Cell Sorting einer Analyse nach deren Zellarten (rechts (Mouse-T-Lymphoma-Zellen-margenta))

Mit einem FACS-Gerät ist aber außerdem noch eine Zell-Trennung aus einem Zellgemisch möglich (Cell Sorting). Es lassen sich demnach verschiedene oder aber Zellen mit Stoffwechselaktivität von solchen ohne diese Aktivität oder abgestorbenen der gleichen Population trennen (Abbildung 23). Hierzu wird ein Flüssigkeitsstrahl, zumeist bestehend aus Phosphatpuffer (PBS-Phosphate-Buffered-Saline), erzeugt. Dieser verteilt sich nach dem Passieren des Laserstrahls in der Regel in einen Tropfen pro Zelle. Kurz bevor die Tropfen abreißen erhalten sie je nach ihrer Größe unterschiedliche Ladungen. Wenn sie dann das elektrische Feld der Ablenkplatten (Deflection Plates) passieren, werden sie entsprechend ihrer Ladung unterschiedlich stark abgelenkt und können so getrennt voneinander gesammelt bzw. analysiert werden (Abbildung 30).

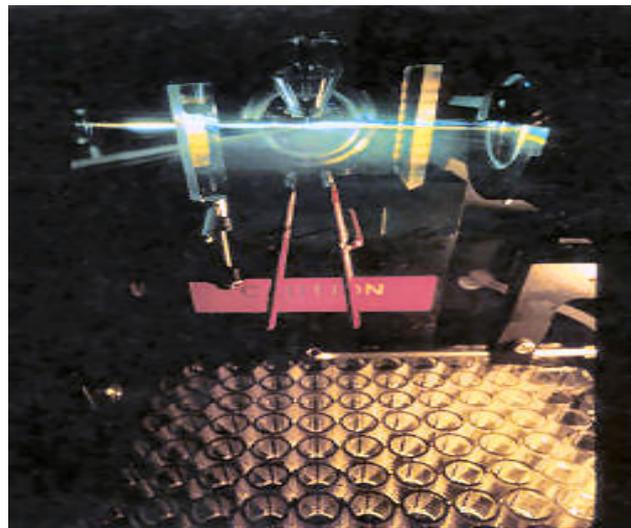
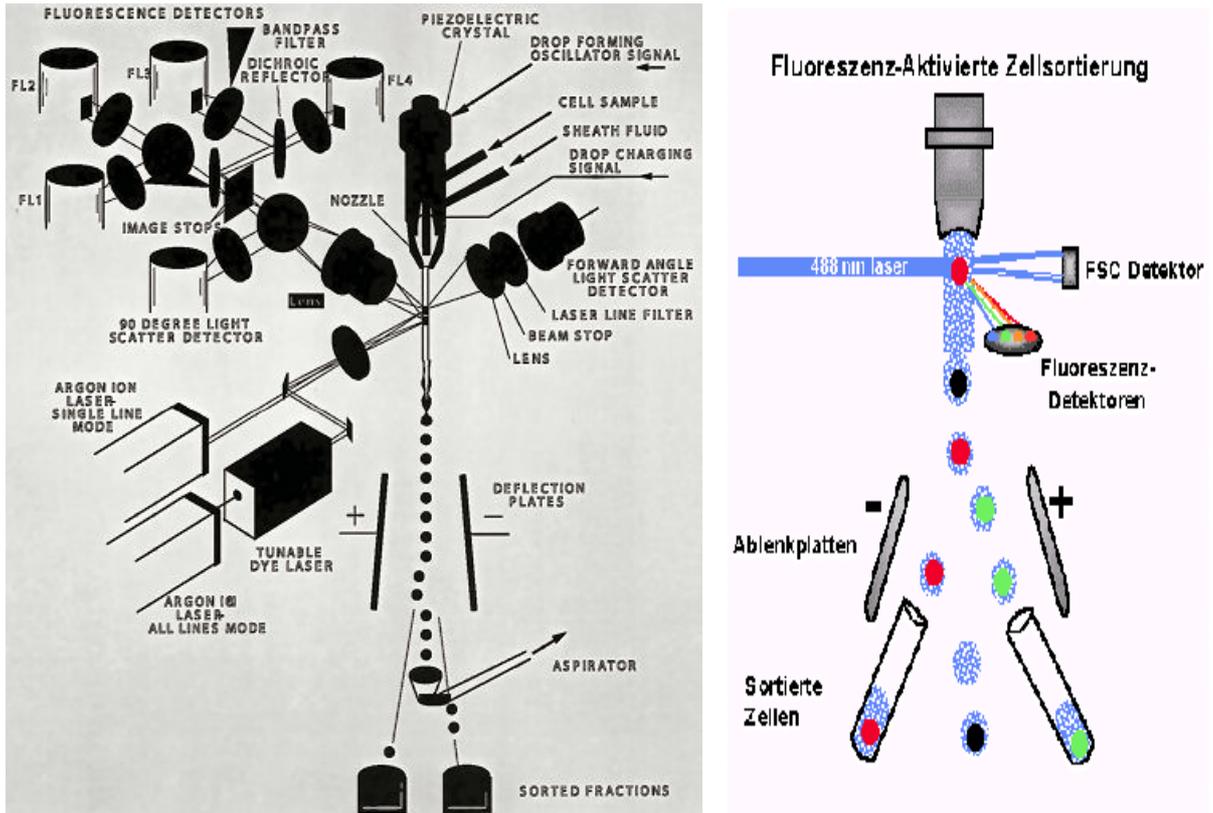


Abbildung 30

Aufbau und Funktionsweise eines modernen FACS-Gerätes: links und rechts (vereinfachte Darstellung) sowie eine Aufnahme aus dem Inneren einer solchen Maschine (unten): Zu erkennen sind die beiden Ablenkplatten (Deflection Plates), und der Laser, der mit einer Wellenlänge von 488nm ausgestattet ist, sowie eine well-Platte mit Zellen³⁷.

5.3. Untersuchungen zur MRP-Transporteraffinität an MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26) Zellen - Fluorescence-Uptake-Assay

Die Untersuchungen an HTB-26 Zellen (Abbildung 31), einer MRP, LRP und BCRP exprimierenden Brustkrebs-Zelllinie, wurden unter den gleichen Bedingungen und unter Anwendung der gleichen Chemikalien und Geräte durchgeführt, die auch beim Fluorescence-Uptake-Assay an den Mouse-T-Lymphoma-Zellen Anwendung fanden (siehe Kapitel 5.2.4.1.). Lediglich die Positivkontrolle und das fluoreszierende Transportersubstrat wurden gegen MRP-affine ausgetauscht. So wurde aus diesem Grund 10 µl Indometacin (100 µM) anstelle des Verapamils bei der P-gp exprimierenden Zelllinie, als Kontrolle auf Existenz des MRPs eingesetzt und als fluoreszierendes MRP Substrat der 5-Carboxyfluoreszein-Diazetat-azetoxymethylester (5 µl 5CFDA, AM, 2,6 µM) anstelle des P-gp-Substrates Rhodamine123. Da sich von allen vorher untersuchten Substanzen nur H17 (Substanz 2) für diesen Fluorescence-Uptake-Assay qualifizierte wurde Probenecid als weitere Vergleichssubstanz mit bekannt starker MRP-Affinität^{57,111} in den Versuch aufgenommen. L-15 Leibovitzmedium mit 10 mM L-Glutamin und 10% fötalem Kalbsserum (FBS) wurde zum Kultivieren der HTB-26 Zellen verwendet. Diese Medium musste alle 2-3 Tage gewechselt werden, um eine optimale Reproduktionsrate der Zellen zu gewährleisten.

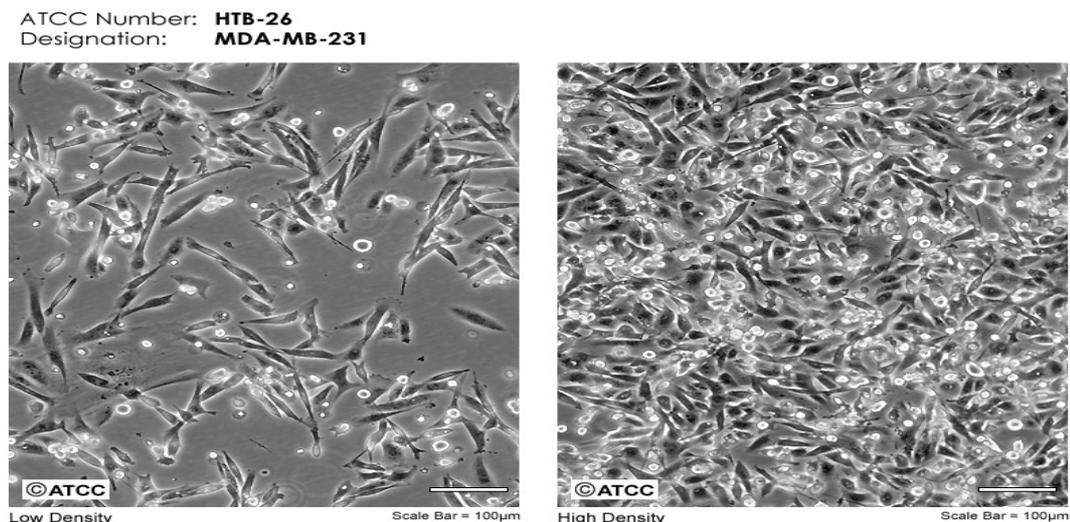


Abbildung 31

Mikroskopische Aufnahme der HTB26 Zelllinie

5.3.1. Chemikalien unterschiedlich zu Kapitel 5.2.4.1.1.

5-Carboxyfluoreszein-Diazetat-azetoxymethylester (5CFDA, AM)	5-Carboxyfluoreszein-Diazetat-azetoxymethylester, Molecular Probes TM , Leiden, Niederlande
Indometacin	1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolessigsäure, Germed Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
L-15 Medium Leibovitz	L-15 Medium Leibovitz mit L-Glutamin und 10% FBS (fetal bovine serum – fötales Kalbsserum), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Probenecid	N,N-(Dipropylsulfamoyl)-benzoesäure, Biokanol Pharma GmbH, Rastatt, Deutschland

5.3.2. Geräte unterschiedlich zu Kapitel 5.2.4.1.2.

Alle Geräte aus Kapitel 5.2.4.1.2. fanden Nutzung in gleicher Weise, da sich die Bedingungen des Assays nicht mit anderen Zelllinien oder targetierten Transportern und damit verschiedenen Vergleichs- und Kontrollsubstanzen änderten.

5.4. *In situ* Perfusionsstudien

5.4.1. Chemikalien und Geräte

5.4.1.1. Chemikalien

Calciumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs. Schweiz
Diethylether	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Fluka Chemie AG, Buchs. Schweiz
H17 (Substanz 2)	3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahehexacyclo[6.4.0.0 ^{2,7} .0 ^{4,11} .0 ^{5,10}]dodecan
Indometacin	1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolessigsäure, Germed Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	(RS)-2-(2-Chlorphenyl)-2-methylaminocyclohexanon Ketamine-Inresa., Ketamin-Hydrochlorid, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
Magnesiumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs. Schweiz
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs. Schweiz
Natriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs. Schweiz
Probenecid	N,N-(Dipropylsulfamoyl)-benzoesäure, Biokanol Pharma GmbH, Rastatt, Deutschland
Ritonavir	[5S-(5R*,8R*,10R*,11R*)]-10-Hydroxy-2-methyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazolyl]3,6-dioxo-8,11-bis(phenylmethyl)-2,4,7,12-tetraazatridecan-13-säure-5-thiazolylmethylester, Ritonavir, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Rompun	2-(2,6-Xylidino)-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazin, Rompun TM Injektionslösung 2% BayerVital, Leverkusen, Deutschland

5. Materialien und Methoden

Saquinavir	(3S, 4aS, 8aS)-2-[(2R,3S)-3-([Na-(2-chinolylylcarbonyl)asparaginy]amino)-2-hydroxypropyl]-N-tert-butylperhydroisochinolin-3-carboxamid, Novartis-Forschungsinstitut GmbH, Wien, Österreich
rac-Talinolol	(R, S)-1-(4-[3-(<i>tert</i> -Butylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl)-3-cyclohexylurea, Arzneimittelwerk Dreseden, Radebeul, Deutschland
Tyrode-Puffer	Bestandteile: NaCl 8g/l, KCl 0,2g/l, MgCl ₂ 0,1g/l, NaH ₂ PO ₄ 0,04g/l, NaHCO ₃ 1g/l, Glukose 1g/l, pH 7,0
Vinblastin	[3aR-[3a α ,4 β ,5 β ,5a β ,9(3R*,5S*,7R*,9S*),10bR*,13a α]]-Methyl-4-(acetyloxy)-3a-ethyl-9-[5-ethyl-1,4,5,6,7,8,9,10-octahydro-5-hydroxy-9-(methoxy-carbonyl)2H-3,7-methanoazacyclo-undecino[5,4-b]indol-9-yl]-3a,4,5,5a,6,11,12,13a-octahydro-5-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-1H-indolizino[8,1-cd]carbazol-5-carboxylat Vinblastinsulfat-GRY 10, GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten, Deutschland

5.4.1.2. Geräte

Einmalspritze (1ml)	Omnifix Feindosierungsspritze, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Einmalkanülen	Sterican 100 Größe 2, 0,8 • 40 mm 21G • 0,5, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Einmalskalpelle	Cutifix-Skalpelle mit Griff/Fig.23 B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Heizdecke	VEB-Elektro-Wärmegeräte Typ UW2 ULLCO, Berlin, Deutschland
Infrarot-Lampe	Beurer IL30, Beurer Ulm, Deutschland
Knopfkanüle, gebogen	2,0 • 80 mm, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
peristaltische Pumpe	4-Kanalpumpe, ISM Ismatec, Glattburgg-Zürich, Schweiz
pH-Meter	Jonway 3051, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Silikonschläuche	Innendurchmesser 2mm und Außendurchmesser 4mm, Ismatec, Glattburgg-Zürich, Schweiz

5. Materialien und Methoden

Silikonschlauchverbindungen	Innendurchmesser 0,64mm, Außendurchmesser 0,9mm, Silicon [®] , Verbindungsstücke ISM 570 Ismatec, Glattburgg-Zürich, Schweiz
Spritze (60ml)	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Unterlage	Krankenunterlage K4, 40 • 60cm, 6 Lagen, Papierfabrik Sandern GmbH & Co KG, Sandern, Deutschland
Wasserbad	Lauda M3 Typ B, Lauda Dr. R. Wobster GmbH & Co KG Lauda-Königshofen, Deutschland

5.4.2. Durchführung von Studien an Tieren – rechtliche Voraussetzungen

Jegliche Art von Studien an Tieren bedarf der Genehmigung des zuständigen Regierungspräsidiums. In diesem Fall wurde die Durchführung der *in situ* Perfusionsstudien durch das Regierungspräsidium Dessau (Sachsen-Anhalt/Dezernat 43) genehmigt. In einem Versuchsprotokoll wurden die Vorgangsweise des chirurgischen Eingriffes, die Dosierung und Applikation der verwendeten Arzneistoffe und die Anästhesie der Tiere genau festgelegt. Man ist stets bemüht mit einer geringstmöglichen Anzahl von Versuchstieren die größtmögliche Anzahl an Informationen aus den Versuchen zu erzielen. Aus diesem Grund wurden die Versuche dahingehend optimiert.

5.4.3. Durchführung des chirurgischen Eingriffes

Die *in situ* Perfusion des Rattendarmes war notwendig, um genauere Aussagen über das Ausmaß der P-gp- und MRP-Affinität innerhalb des Organismus treffen zu können und um die Ergebnisse der Zellstudien zu bestätigen, denn die Membrantransporter lassen sich über diese Methode physiologisch ideal targetieren. Gleichzeitig konnten so Aussagen über die intestinale Permeabilität der Testsubstanzen getroffen werden. Der Durchführung der Perfusion lag die von *Doluisio et al* [1969] veröffentlichte und von *Hanafy* [2001] modifizierte Methode weitestgehend zugrunde.

Die Versuche fanden an männlichen White-Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) statt, die unter kontrollierten Bedingungen (21°C, 45% Luftfeuchte, 12 h Tageszyklus) gehalten wurden. Nach Eintreffen der Tiere wurde bis zum Beginn der Studie mindestens zwei Wochen gewartet, um die Tiere in der neuen Umgebung zu akklimatisieren. Der Eingriff erfolgte bei Tieren mit einem Gewicht von 321 g ± 36 g.

5. Materialien und Methoden

Hierbei wurden die Kompetitionsstudien auf P-gp und MRP-Affinität in vierfacher und die IC50-Studien in zweifacher Ausführung durchgeführt. 18 Stunden vor dem operativen Eingriff wurde den Ratten das Futter (Altromin[®] Ratten und Mäuse Diätfutter, Lage, Deutschland) entzogen. Während dieser Zeit hatten die Ratten uneingeschränkten Zugang zu Wasser.

Vor dem eigentlichen chirurgischen Eingriff wurden die Ratten kurz durch Inhalation von Diethylether betäubt und anschließend erfolgte die Applikation des Anästhetikums Ketamin (40 mg/kg KG) und des Muskelrelaxans Rompun[™] (2 mg) als vorgefertigte Mischung per Einmalspritze intraperitoneal. Nachdosierungen falls notwendig, erfolgten mit 5 mg Ketamin bei gleicher Applikationsweise. Zur Erhaltung der physiologischen Bedingungen wurden die Ratten auf einem auf 37°C erwärmten Heizkissen platziert. Nach ca. 10 Minuten wurde sich der anästhetischen und muskelrelaxierenden Wirkung versichert. Die Eröffnung der Bauchdecke der Ratten erfolgte mit einem 2-3 cm langen Schnitt an der linea alba. Anschließend wurden die zu perfundierenden Darmabschnitte freipräpariert, durch einen kleinen Einschnitt in das Segment an zwei Stellen eröffnet und mit auf 37°C temperierten Tyrodepuffer zur Reinigung durchspült. Im Anschluss daran konnten dann die Silikonschläuche in die Einschnittstellen jeweils am proximalen und distalen Ende des Darmsegments eingeführt werden. Die Befestigung der Schläuche an den Segmenten erfolgte mit chirurgischem Nahtmaterial in der Weise, dass darauf geachtet wurde keine versorgenden Blutgefäße abzuschneiden. Im Falle der Kompetitionsstudien auf P-gp und MRP-Affinität wurden das Kolon (ca. 2 cm), das Ileum (ca. 5 cm) und das Jejunum (7-11 cm) perfundiert und bei der Bestimmung der IC50-Werte der P-gp-Hemmung nur das Ileum und das Jejunum in besagten Segmentlängen. Im Folgenden musste darauf geachtet werden, dass die eröffneten Segmente möglichst physiologischen Bedingungen ausgesetzt waren. Deswegen erfolgte alle 5 Minuten eine Umspülung des Darmgewebes mit temperiertem Tyrodepuffer, der auch gleichzeitig das Transportmedium für alle Test-, Kontroll-, und Vergleichssubstanzen, die in ihm gelöst vorlagen, darstellte. Die Substanzen wurden mit einer Geschwindigkeit von 0,2 ml/min durch die Darmabschnitte gepumpt (Abbildung 32).

5. Materialien und Methoden

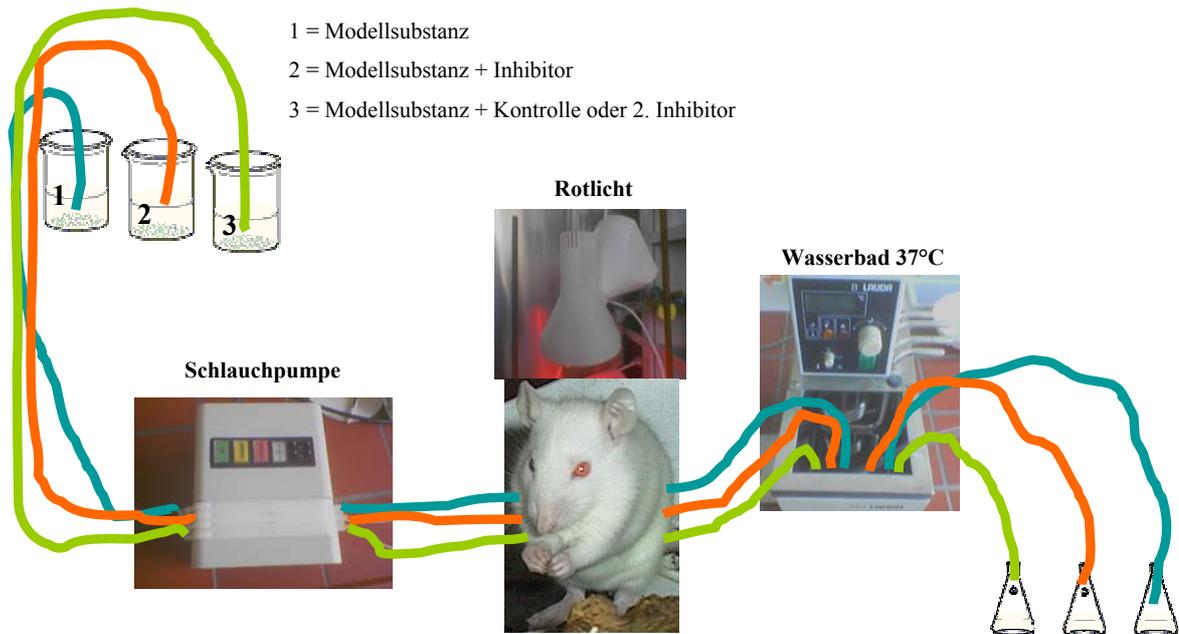


Abbildung 32

Darstellung des Perfusionsmodells. Lösung 1, 2 und 3 werden nacheinander durch alle perfundierten Darmsegmente gepumpt und alle 5 Minuten wird eine Probe entnommen

5.4.4. Mehrstufenperfusion

Die Studien fanden in jedem Fall in einer Dreistufenperfusion, die eine Gesamtzeit von 135 Minuten pro Ratte in Anspruch nahm, statt. Die Perfusion erfolgte an allen einbezogenen Darmabschnitten parallel. Sämtliche in den Studien verwendete Substanzen wurden in Tyrodepuffer unter Zusatz von 1% DMSO als Lösungsvermittler gelöst und so der jeweiligen Studie zugeführt. Am Anfang der Perfusionsstudie und vor jedem Wechsel der zu untersuchenden Substanzen erfolgte ein 15-minütiger Vorlauf mit der applizierten Substanz oder dem Substanzgemisch, um steady state Bedingungen einzustellen. Danach erfolgte dann ein 30-minütiger Durchlauf. Während dieser 30 Minuten wurde alle 5 Minuten eine Probe pro Darmabschnitt gesammelt, so dass letztlich 6 Proben pro Darmabschnitt und Substanz oder Mischung für die Auswertung zur Verfügung standen. Die Dreistufenperfusion zur Membrantransporter-Affinität wurde nach folgendem Schema gleichzeitig im Kolon, Ileum und Jejunum durchgeführt:

Perfusat 1	→	Modellsubstanz
Perfusat 2	→	Modellsubstanz + Inhibitor
Perfusat 3	→	Modellsubstanz + Positivkontrolle

5. Materialien und Methoden

Die Dreistufenperfusion zur Bestimmung der IC50-Werte der P-gp Hemmung wurde in zwei Darmabschnitten realisiert und unterlag folgender Struktur:

	Jejunum	Ileum
1.	Modellsubstanz	Modellsubstanz
2.	Modellsubstanz + Inhibitor1(Konz.1)	Modellsubstanz + Inhibitor2(Konz.1)
3.	Modellsubstanz + Inhibitor1(Konz.2)	Modellsubstanz + Inhibitor2(Konz.2)

Die Dreistufenperfusion zur Bestimmung der Substrateigenschaften wurde wieder im Kolon, Ileum und Jejunum mit nachstehendem Design durchgeführt.

Perfusat 1	→	Modellsubstanz
Perfusat 2	→	Modellsubstanz + MRP-Inhibitor
Perfusat 3	→	Modellsubstanz + P-gp-Inhibitor

Zur Berechnung der effektiven Permeabilitäten wurden ausschließlich Daten aus steady state Bedingungen herangezogen.

5.4.5. Studiendesign

Es wurden drei Arten von Perfusionsstudien durchgeführt. Zum einen Kompetitionsstudien auf P-gp-bzw. MRP-Affinität mit verschiedenen Modellsubstanzen und Inhibitoren, Studien zur Ermittlung des IC50-Wertes der P-gp Hemmung mit Saquinavir als Modellsubstanz und H17 sowie Ritonavir als P-gp Inhibitoren und Studien zur Testung auf das Ausmaß der Substrateigenschaften des H17s am P-gp und MRP.

5.4.5.1. P-gp Affinitätsstudien mit den Modellsubstanzen Talinolol und Saquinavir

Zunächst wurde mit der Modellsubstanz Talinolol gearbeitet. 10 µM wurden allein und zusammen mit den auf P-gp Affinität zu testenden Substanzen Ritonavir und H17 (jeweils 30 µM) im Tyrode-Puffer bei pH 7,0 und unter Zusatz von 1% DMSO in Lösung gebracht. Danach erfolgte vorab die Einzelperfusion in allen drei Darmabschnitten (Kolon, Ileum, Jejunum) des Talinolols um Rückschlüsse auf dessen Eigenabsorption treffen zu können.

Nach 15-minütigem Vorlauf kam dann die Mischung aus 10 μM Talinolol und 30 μM H17 oder 30 μM Ritonavir zum Einsatz. Beendet wurde das Experiment jeweils mit der Perfusion der Mischung aus Talinolol und Positivkontrolle, die im Fall der Testung auf P-gp Affinität mit Vinblastin (100 μM) durchgeführt wurde.

Im Anschluss an diese Studie schloss sich ein Perfusionsexperiment mit dem PI Saquinavir als Modellsubstanz an. Es kamen 20 mikromolare Lösungen dieser Substanz zum Einsatz. Die Perfusionsbedingungen und die Konzentrationen der zugesetzten Inhibitoren veränderten sich zur Talinolol-Studie nicht.

5.4.5.2. MRP-Affinitätsstudie mit Indometacin als Modellsubstanz

Aufgrund der sich abzeichnenden MRP-inhibitorischen Eigenschaften des eingesetzten H17s, schloss sich an die P-gp Affinitäts- oder Kompetitionsstudie eine Perfusionsstudie auf MRP-Affinität an. Auch hier wurde analog zum vorangegangenen Experiment verfahren. Lediglich die Modell- und Kontrollsubstanzen fanden gegen solche Austausch, die anstelle einer P-gp Affinität Bindungsverhältnisse zu MRP eingehen. Als Modellsubstanz wurde das Indometacin (1 mM) und als Positivkontrolle der starke MRP-Inhibitor Probenecid (0,25 mM) genutzt.

5.4.5.3. Bestimmung des IC₅₀-Wertes der P-gp Hemmung

Auch hier kam die *in situ* Perfusionsstudie in etwas modifizierter Ausführung zur Anwendung, denn es wurde nicht mehr nur eine Inhibitorkonzentration perfundiert, sondern die zu testenden Substanzen Ritonavir und H17 wurden in sechs verschiedenen Konzentrationen nach dem Schema aus Kapitel 5.4.4. angewendet. Der Versuch beschränkte sich daher nicht nur auf eine Ratte sondern auf drei verschiedene Versuchstiere pro Substanz und perfundiertes Segment. Diese Tiere wurden demnach in selben Käfigen und unter selben Bedingungen gehalten, behandelt und gefüttert. Pro Tier konnten aufgrund der limitierten Versuchsdauer und um sie nicht überzustrapazieren zwei Inhibitorkonzentrationen getestet werden.

Modellsubstanz war wiederum das Saquinavir. Nachdem also die Modellsubstanz allein perfundiert wurde, um abermals Rückschlüsse auf deren Eigenabsorption ziehen zu können, schloss sich pro Darmabschnitt dann eine Mischung aus Modellsubstanz und der Inhibitorkonzentration 1, 3 oder 5 an. Nach Sammlung dieser Proben, wurden dann in der letzten Perfusionsstufe pro Tier und Darmabschnitt jeweils die Inhibitorkonzentrationen 2, 4 oder 6 perfundiert (Tabelle 14). Alle Konzentrationen für jede Testsubstanz wurden

5. Materialien und Methoden

sowohl im Ileum als auch im Jejunum eingesetzt, um für jedes Darmsegment aussagekräftige Daten zu erhalten.

Tabelle 14

Eingesetzte Modulatorkonzentrationen zur Bestimmung des IC50-Wertes der P-gp Hemmung

Inhibitor	Testkonzentrationen					
Nr.	1	2	3	4	5	6
Ritonavir	15µM	30µM	45µM	60µM	75µM	90µM
H17	15µM	20µM	25µM	30µM	35µM	40µM

5.4.5.4. Testung des H17s auf Substrateigenschaft am P-gp und MRP

Bei der Überprüfung der Substrateigenschaften wurde analog zu den Kompetitionsstudien (Studien auf P-gp, oder MRP-Affinität) verfahren. Das dimere 1,4-Dihydropyridin H17 diente hierbei als Modellsubstanz, denn nur über dessen direkte Bestimmung ließen sich Aussagen darüber machen, ob H17 zusätzlich zu seinen inhibitorischen Fähigkeiten auch Substrat der targetierten Transporter ist.

Hierzu wurde H17 in einer Konzentration von 30µM nach Einstellung der steady-state-Bedingungen zunächst allein in allen drei Darmabschnitten gleichzeitig perfundiert, um einen Referenzwert für die sich anschließende Analytik zu erhalten. Anschließend erfolgte dann die Koperfusion von H17 mit dem MRP-Inhibitor Indometacin eingesetzt in 1 millimolarer Lösung. Der Versuch wurde dann mit der Koperfusion eines starken P-gp Inhibitors, dem Vinblastin (100 µM), beendet. Die Probensammlung erfolgte wie in Kapitel 5.4.4. beschrieben, worin sich auch eine Graphik zum Studiendesign befindet.

5.4.6. Berechnungen

5.4.6.1. Wassertransport

Die Berechnung des Wassertransportes erfolgte für jedes perfundierte Segment und jede Probe der Perfusatsammlung unter Benutzung nachstehender Gleichung.

$$\text{Wassertransport [\%]} = 100 \cdot \frac{(m_{\text{in}} - m_{\text{out}})}{m_{\text{in}}}$$

m_{in} Lösungsgewicht bei Eintritt in das Segment

m_{out} Lösungsgewicht bei Austritt aus dem Segment

5. Materialien und Methoden

Da das Perfusionsvolumen mit 0,2 ml/min bekannt war, war das Verhältnis $m_{\text{out}}/m_{\text{in}}$ die Basis für den Korrekturfaktor der Substanzkonzentration. Er floss somit in die Berechnungen der effektiven Permeabilitäten mit ein.

5.4.6.2. Intestinale Permeabilität

Unter Nutzung der von *Sinko* [1991] erstmals beschriebenen Gleichung wurden die effektiven Permeabilitäten (P_{eff} [cm/s]) berechnet. Sie beruht auf den Bedingungen und der Basis des Mixed-tank-Modells¹¹⁰:

$$P_{\text{eff}} = Q \cdot \frac{\frac{c_{\text{in}}}{c_{\text{out}}} - 1}{2 \cdot \pi \cdot r \cdot l}$$

Q	Flussrate der Schlauchpumpe [ml/min]
c_{in}	Eingangskonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
c_{out}	Ausgangskonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
r	Radius [cm] des Segments
l	Länge [cm] des Segments

Die effektiven Permeabilitäten wurden für jede Probe aus jedem perfundierten Segment berechnet. Die Radien der untersuchten Darmabschnitte betragen im Durchschnitt für das Kolon 0,23 cm und für das Ileum sowie das Jejunum jeweils 0,21 cm¹⁴³.

5.4.6.3. IC50-Werte der P-gp Hemmung

Die Berechnung der IC50-Werte der P-gp Hemmung erfolgte über die Auftragung der intestinalen Permeabilitäten der Modellsubstanz gegen die Konzentrationen der getesteten Modulatoren. Alle Kurvenanpassungen und nicht linearen Regressionsanalysen wurden mit Microcal OriginTM Version 7.0 und Prism 4 for WindowsTM Version 4.00 durchgeführt.

Der IC50-Wert gibt den Wert an, bei dem die effektive Permeabilität der verwendeten Modellsubstanz 50% beträgt und wurde abermals nach folgender Gleichung berechnet.

$$y = y_0 + \frac{a \cdot x^b}{c^b + x^b}$$

y_0	P_{eff} bei minimaler Modulatorkonzentration
a	P_{eff} bei maximaler Modulatorkonzentration
b	Hill-Koeffizient
c	IC50-Wert (μM)

5.4.7. Statistische Auswertung

Für jede *in situ* Perfusionsstudie wurden die effektiven Permeabilitäten pro Sammelintervall und Ratte während der *steady-state*-Phase ermittelt. Diese Daten wurden dann für jedes Tier und für jeden Darmabschnitt gemittelt. Sie sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Um die ermittelten effektiven Permeabilitäten abzusichern, wurde ein Trend-Test durchgeführt, um systematische Abweichungen in Abhängigkeit von der Zeit darlegen zu können⁹⁷. Es konnte keine Veränderung oder Abweichung mit der Zeit festgestellt werden und ein zeitabhängiger Trend war demzufolge nicht nachzuweisen, so dass während der Perfusionsstudie auf jeden Fall steady state Bedingungen vorlagen.

Um Aussagen über die statistische Signifikanz zum Unterschied zweier ungepaarter Gruppen treffen zu können, wurde bei den Perfusionsstudien ein zweiseitiger Studentscher t-Test durchgeführt. Signifikanz wurde mit einem Wert von $p \leq 0,05$ festgesetzt⁹⁷. Waren die zu untersuchten Gruppen verbunden aber voneinander abhängig, wie beispielsweise bei der Perfusion ohne und später mit Inhibitor, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Paardifferenzen-Test angewendet. Signifikanz der unterschiede der Mittelwerte wurde auch hier mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

5.5. HPLC Analytik

5.5.1. Chemikalien und Geräte

5.5.1.1. Chemikalien

A-86093.0 (interner Standard)	((5S, 8S, 10S, 11S)-9-Hydroxy-2-cyclopropyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazolyl]-3,6-dioxo-8,11-bis(phenylmethyl)-2, 4, 7, 12-tetraazatridecan-13-oic acid, 5-thiazolylmethylester, Abbott, North Chicago, Illinois, USA
Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniak	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dichlormethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

5. Materialien und Methoden

H17	3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahehexacyclo[6.4.0.0 ^{2.7} .0 ^{4.11} .0 ^{5.10}]dodecan
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methyl-tert.-butylether	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
rac-Pindolol	1-(4-Indolyloxy)-3-isopropylamino-2-propanol, Sandoz AG, Basel, Schweiz
Ritonavir	[5S-(5R*,8R*,10R*,11R*)]-10-Hydroxy-2-methyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazolyl]3,6-dioxo-8,11-bis(phenylmethyl)-2,4,7,12-tetraazatridecan-13-säure-5-thiazolylmethylester, Ritonavir, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saquinavir	(3S, 4aS, 8aS)-2-[(2R,3S)-3-([Na-(2-chinolylylcarbonyl)asparaginy]amino)-2-hydroxypropyl]-N-tert-butylperhydroisochinolin-3-carboxamid,
Stickstoff 5.0	Messer Griesheim, Deutschland
rac-Talinolol	(RS)-1-(4-[3-(<i>tert</i> -Butylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl)-3-cyclohexylurea, Arzneimittelwerk Dreseden, Radebeul, Deutschland
Triethylamin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

5.5.1.2. Geräte

Datenauswertung	Windows XP, Microsoft Excel XP, Microsoft Corporation, USA Microcal Origin TM Version 7.0 Microcal Software, Northampton, USA und Prism 4 for Windows TM Version 4.00, GraphPad Software Inc., Software MacKiev TM , Kiev, Ukraine
HPLC Autosampler	AS-2000A, Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland

5. Materialien und Methoden

HPLC-Detektor (Dioden-Array)	L 4500 DAD, Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Pumpe	L 6000 Pump, Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Säulen	<u>Talinolol:</u> Hauptsäule: Chiraspher NT, 5µm, 250 • 4mm, Merck, Darmstadt, Deutschland Vorsäule: LiChroCART® 4-4, LiChrospher® 100 Diol, 5µm, 4 • 4mm, Merck, Darmstadt, Deutschland <u>Saquinavir, Indometacin:</u> Hauptsäule: ChromCart® Inertsil ODS-2 C ₁₈ , 5µm, 150 • 4,6mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland Vorsäule: ChromCart® CC 8/4 Inertsil ODS-2, 5µm 5 • 3mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
HPLC-Software	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer	Magnetic Stirrex HI 300 N, Hanna Instruments, Vertrieb durch Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter	Jonway 3051, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Probenaufkonzentrator	Techne SC-3/DB-3, Techne Cambridge Ltd., Coxford Cambridge, England
Schüttler	Thys 2, MLW Labortechnik Ilmenau, Ilmenau, Deutschland
Zentrifuge	Labofuge 400 R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

5.5.2. Bestimmung von Talinolol enantioselektiv

5.5.2.1. Chromatographische Bedingungen

Die HPLC-Methode zur Bestimmung von Talinolol wurde von *Wetterich et al.* [1996] beschrieben¹³⁸ und findet bei der Quantifizierung von Taliolol häufig Anwendung. Zur Trennung des Enantiomerenpaares wurde eine chirale stationäre Phase verwendet. Ihre

5. Materialien und Methoden

Oberfläche wurde mit Poly(N-acryloyl)-S-phenylalaninethylester imprägniert. Die chirale stationäre Phase besteht aus Silikagel (Abbildung 33).

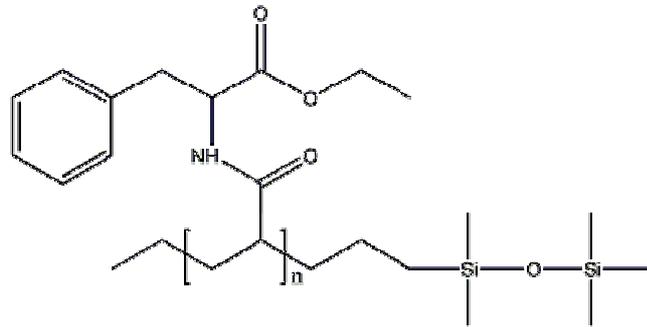


Abbildung 33

Chiraspher NT Säulenmaterial

Als Hauptsäule wurde eine ChirSpher NT-Säule mit einem Partikeldurchmesser von 5 μm und einer Länge von 250 • 4 mm verwendet. Als Vorsäulen wurden die dazu angebotenen LiChroCart 4-4, LiChrospher 100 Diol-Säulen mit einer Porengröße von 5 μm und Längenmaßen von 4 • 4mm genutzt. Die mobile Phase bestand aus Ethanol mit einem Zusatz von 0,05% Triethylamin.

Die Elution erfolgte isokratisch bei einem Druck von 110-125 kg/cm^3 . Die Flussrate betrug 0,3 ml/min und die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor über einen Wellenlängenbereich von 200-300 nm. Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 245 nm ausgewertet. Die Retentionszeiten betragen für S-Talinolol 16,0 \pm 1,2 min, für R-Talinolol 18,2 \pm 1,3 min, für S-Pindolol 21,0 \pm 0,9 min und für R-Pindolol 21,6 \pm 1,7 min (Abbildung 34).

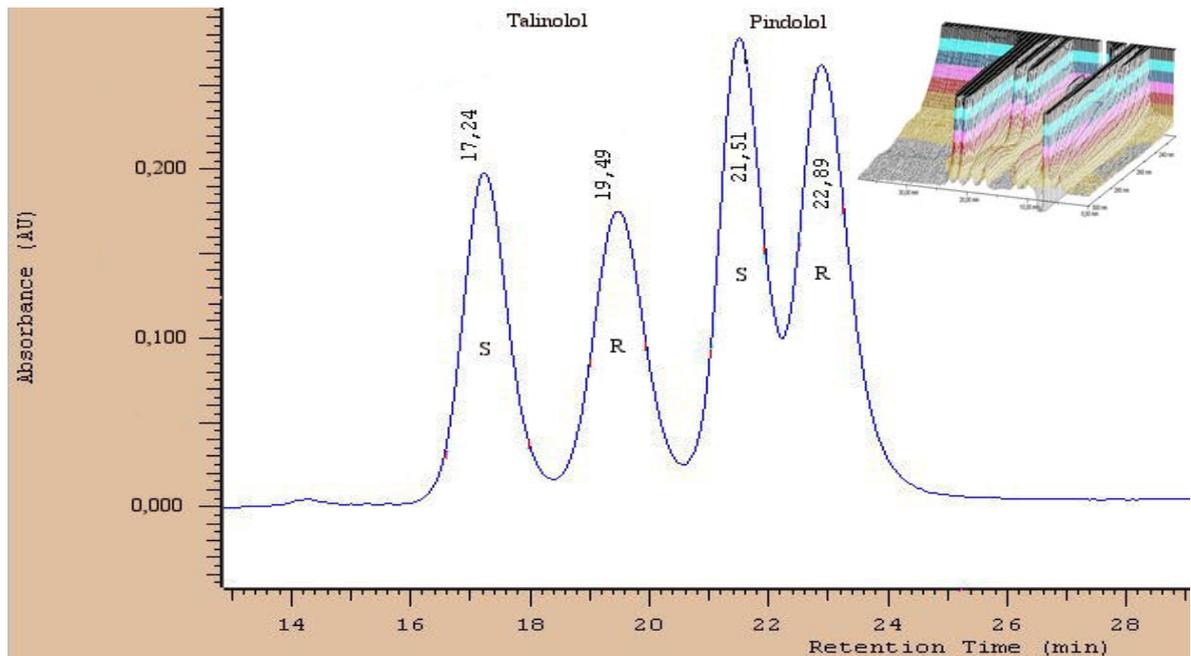


Abbildung 34

Chromatogramm der Enantiomerentrennung des Analyten Talinolol und dem internen Standard Pindolol nach Extraktion aus Tyrode-Puffer erfasst bei $\lambda=245$ nm. Im 3D-Dioden-Array-Spektrum (oben rechts) ist zu erkennen, dass sich Pindolol über den gesamten Bereich von 220-300 nm bestimmen lassen könnte, Talinolol nur bis 260 nm.

5.5.2.2. Probenbehandlung

Aus den Proben, welche aus der Perfusionsstudie mit Talinolol als Modells substanz resultierten, wurden 100 μ l entnommen. Diese wurden dann mit dem internen Standard Pindolol (2000 ng/50 μ l) versetzt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 0,1 ml 1 M Natronlauge und die Extraktion mit einer Mischung aus Dichlormethan und Isopropanol (95:5, 3 ml) auf einem Horizontal-Schüttler für 15 Minuten. Um nach diesem ersten Extraktionsschritt eine schnelle Phasentrennung zu erreichen, wurden die Proben bei 2500 Upm für 5 Minuten zentrifugiert. Danach erfolgte ein Waschen der Proben mit 0,5 ml 0,1 M Natronlauge gefolgt von einer abermaligen Extraktion auf dem Horizontal-Schüttler für weitere 15 Minuten. Die Phasentrennung wurde wiederum durch 5-minütige Zentrifugation unter vorherigen Bedingungen beschleunigt. Der Separation der organischen Phase schloss sich ein Eindampfen unter Stickstoffatmosphäre bei 40°C an. Der entstandene Rückstand wurde in 80 μ l Methanol wieder aufgenommen, wovon 50 μ l der HPLC-Analyse zugeführt wurden.

5.5.2.3. Validierung

Die Nachweisgrenze liegt für das Enantiomerenpaar R- und S-Talinolol bei Verwendung des Dioden-Array-Detektors bei 40 ng/ml und die Bestimmungsgrenze bei 120 ng/ml. Ansonsten entsprachen die Validierungsparameter den von *Hanafy* [2001] veröffentlichten Daten³⁵.

5.5.3. Bestimmung von Saquinavir

5.5.3.1. Chromatographische Bedingungen

Eine HPLC-Methode zur simultanen Bestimmung von Indinavir, Nelfinavir, Saquinavir und Ritonavir wurde von *Hugen et. al* [1999] beschrieben. Sie basiert ebenso auf einem Extraktionsverfahren zweier flüssiger Phasen gefolgt von einer Gradientenelution⁵⁰. Da wechselnde Laufmittelzusammensetzungen mit dem zur Verfügung stehenden Gerät nicht lösbar waren, wurde die Methode in modifizierter Form mit einer isokratischen Elution durchgeführt.

Die Hauptsäule und somit stationäre Phase stellte eine Umkehrphasen C₁₈-Säule (ChromCart[®] Inertsil ODS-2) mit einem Partikeldurchmesser von 5µm und einer Länge von 150 • 4,6 mm dar. Als Vorsäule wurde eine zum System passende ChromCart[®] CC 8/4 Inertsil ODS-2-Säule mit einer Porengröße von 5µm und den Abmaßen 5 • 3 mm verwendet.

Die Mobile Phase setzte sich aus Acetonitril und Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1 zusammen. Der pH Wert des Laufmittels wurde mit Natriumhydrogenphosphat (50 mM) auf 5,63 eingestellt⁵⁰. Die Elution erfolgte isokratisch bei einem Druck von 110-125 kg/cm³. Die Flussrate betrug 0,9 ml/min und die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor über einen Wellenlängenbereich von 200-300 nm; die Erfassung des Spektrums bei einer Wellenlänge von 240 nm. Für die eingesetzten Substanzen ergaben sich die in Tabelle 15 angegebenen Retentionszeiten.

Tabelle 15

Retentionszeiten für H17, Saquinavir, Ritonavir und den internen Standard A-86093.0

	H17	Saquinavir	Ritonavir	A-86093.0
Retentionszeit [min]	2,5±0,3	10,5±0,5	18,0±1,2	13,8±0,9

5. Materialien und Methoden

Ein repräsentatives Chromatogramm der Analyten und des internen Standards sind in Abbildung 35 dargestellt.

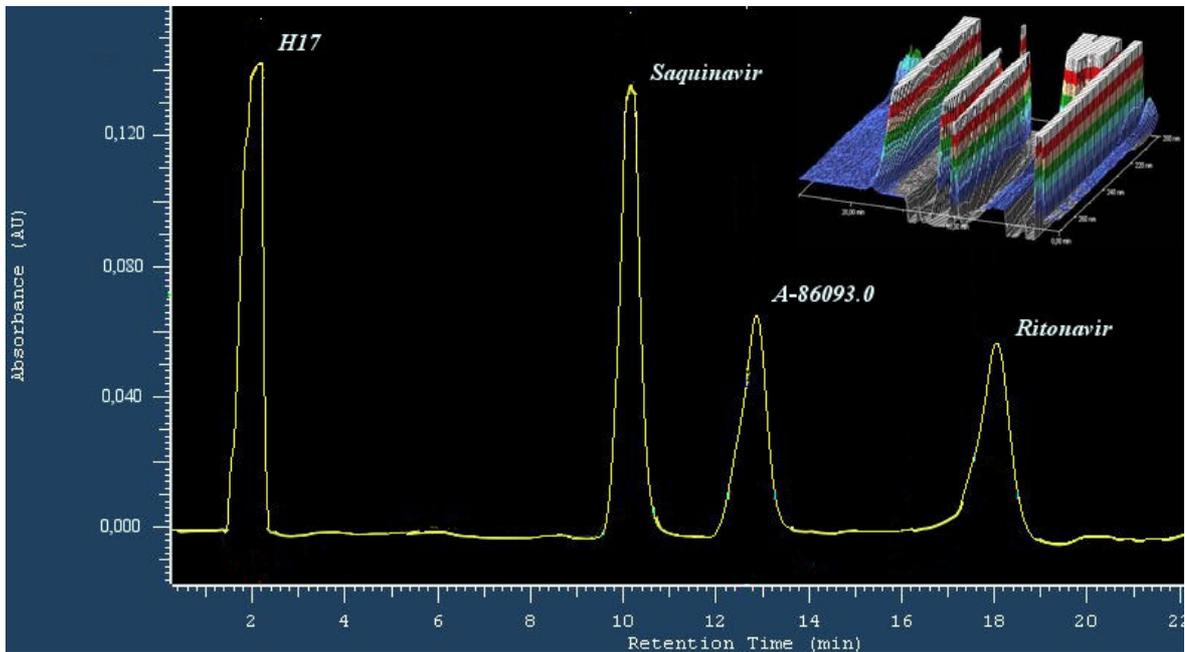


Abbildung 35

Chromatogramm der Trennung von H17, Saquinavir, Ritonavir und des internen Standards A-86093.0 bei $\lambda=240$ nm

5.5.3.2. Probenbehandlung

Aus den Proben wurde jeweils 500 μ l entnommen und mit 0,5 ml 0,1 M Ammoniumhydroxid-Lösung, 4500 ng/300 μ l internen Standard (20 μ M A-86093.0) sowie 5 ml Methyl-tert.-butylether versetzt. Danach erfolgte die Extraktion auf einem Horizontal-Schüttler für 15 Minuten, gefolgt von einer Zentrifugation bei 2500 Upm für 5 Minuten. Dann wurde die organische Phase von der wässrigen separiert und unter Stickstoffatmosphäre eingedampft. Die eingedampfte Probe wurde dann in 100 μ l Acetonitril wieder aufgenommen und 80 μ l davon konnten dann in die HPLC injiziert werden.

5.5.3.3. Validierung

Um abzusichern, ob ein Verfahren gleich bleibende verlässliche und richtige Daten liefert, ist eine Qualitätssicherung vor allem mit den statistischen Parametern Selektivität bzw. Spezifität, Linearität, Richtigkeit und Präzision unumgänglich.

5. Materialien und Methoden

5.5.3.3.1. Spezifität

Um sicher zu gehen, dass das Signal eines Analyten auch in Gegenwart von anderen Substanzen nur von seiner eigenen Konzentration herrührt, bestimmt man die Spezifität oder Selektivität einer Methode. Bei der Detektion von Saquinavir wurde der Tyrode-Puffer als Ausgangsmatrix verwendet. Es konnte sichergestellt werden, dass erstens die Matrix nicht mit dem Signal des Analyten interferierte und dass zweitens auch bei Zugabe anderer Modulatoren keine Störungen des Signals auftraten. Die Selektivität wurde in Anwesenheit aller einsetzbaren Modulatoren bestimmt. Dabei konnte Saquinavir in jedem Fall interferenzfrei bestimmt werden.

5.5.3.3.2. Linearität

Aussagen ob ein Signal einer Testsubstanz proportional zu seiner Konzentration wächst oder abfällt können mit Hilfe der Linearität einer Methode gemacht werden.

Tyrode-Puffer wurde mit sechs verschiedenen Konzentrationen an Saquinavir versetzt und die Linearität in einem Konzentrationsbereich von 1000 ng-20 µg/ml nachgewiesen. Die linearen Regressionen, Steigungen und Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 16 dargestellt und wurden mit Hilfe von Microcal Origin™ Version 7.0 erstellt.

Tabelle 16

Linearitätsparameter der Kalibriergeraden zur Bestimmung von Saquinavir aus Tyrode-Puffer (n=8)

Konzentrationsbereich [ng/ml]	Korrelations- koeffizient	SEM	Anstieg	SEM	Achsen- abschnitt	SEM
1000-20000	0,997	0,002	0,366	0,033	-0,058	0,323

5.5.3.3.3. Richtigkeit und Präzision

Inwieweit ein Wert mit den gemittelten Werten aller Daten übereinstimmt, kann über die Richtigkeit einer Methode beschrieben werden. Sie wird als relative Abweichung in % angegeben. Es werden systematische Fehler erfasst.

$$\text{Richtigkeit [\%]} = 100 \cdot \frac{(\text{gemessener Wert} - \text{wahrer Wert})}{\text{wahrer Wert}}$$

Die Präzision einer Methode hingegen gibt die Streuung innerhalb einer Messreihe bei gegebenen Bedingungen an. Über die Präzision werden zufällige Fehler erfasst und sie

5. Materialien und Methoden

wird als relative Standardabweichung oder besser Variationskoeffizient ebenfalls in % angegeben.

$$\text{Variationskoeffizient [\%]} = 100 \cdot \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}}$$

Die entsprechenden Daten für Saquinavir sind in Tabelle 17 aufgeführt und belegen, dass die Substanz im untersuchten Konzentrationsbereich von 1000 ng-20 µg/ml einwandfrei analysierbar ist.

Tabelle 17

Richtigkeit und Präzision für das Analyseverfahren zur Bestimmung von Saquinavir aus Tyrode-Puffer

Matrix	Konzentration [ng/ml]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
Tyrode-Puffer	1000	2,90	4,59
	2500	3,10	4,47
	5000	3,36	4,63
	10000	3,41	4,15
	15000	2,23	5,68
	20000	2,15	3,59

5.5.3.3.4. Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Als Nachweisgrenze wird die Konzentration des Analyten bezeichnet, bei der das Detektionssignal noch mit angemessener Sicherheit von einem Leerwert unterschieden werden kann. Dieser Wert muss wenigstens dreimal größer als das „Grundrauschen“ sein.

Saquinavir zeigte bei dem verwendeten Detektor eine Nachweisgrenze von 83 ng/ml.

Die Bestimmungsgrenze hingegen verweist auf die Konzentration, die noch mit ausreichender Richtigkeit und Präzision ermittelt werden kann. Hierbei sollte die Präzision einen Wert von 15% nicht übersteigen. Für Saquinavir blieb die Präzision unter 15%. Seine Bestimmungsgrenze ergab sich daraus zu 160 ng/ml.

5.5.4. Bestimmung von Indometacin

5.5.4.1. Chromatographische Bedingungen und Probenbehandlung

Seit den achziger Jahren existieren einige etablierte Methoden zur quantitativen Bestimmung des Indometacins mit Hilfe der HPLC^{2,116}.

Sämtliche chromatographischen Bedingungen und Plasmaproben-Aufarbeitungen wurden wie von *Stubbs* [1986] beschrieben durchgeführt¹¹⁶. Das Säulenmaterial war das gleiche, welches auch zur Quantifizierung des Saquinavirs herangezogen wurde.

5.5.4.2. Validierung

Die Nachweisgrenze des Indometacins lag bei Verwendung des Dioden-Array-Detektors bei 50 ng/ml und die Bestimmungsgrenze bei 180 ng/ml. Ansonsten entsprachen die Validierungsparameter den von *Stubbs* [1986] veröffentlichten Daten¹¹⁶.

5.5.5. Bestimmung von H17

5.5.5.1. Chromatographische Bedingungen

Eine HPLC-Methode zur Bestimmung des H17s wurde von *Eisenschmidt* [2005] entwickelt²⁴. Hierbei wurde ebenfalls das gleiche Säulenmaterial wie bei der Bestimmung von Saquinavir (Kapitel 5.5.3.) verwendet. Das Laufmittel setzte sich aus einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (80:20) zusammen. Die Elution erfolgte isokratisch bei einem Druck von 110-125 kg/cm³ und einer Flussrate von 1 ml/min. Ein interner Standard wurde durch die Acetylierung des H17s an allen Hydroxymethylgruppen erhalten und somit wurde eine direkte Quantifizierung von H17 aus den Perfusatproben möglich²⁴. Die Retentionszeiten betragen für H17 4 Minuten und für den internen Standard AE1 9 Minuten. Das Spektrum wurde mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm aufgenommen. Die Auswertung des Spektrums erfolgte bei 240 nm.

5.5.5.2. Probenbehandlung

Aus den gesammelten Perfusatproben wurden je 500 µl entnommen, gefolgt von einer Zugabe von 0,5 ml Ammoniaklösung (0,1 M) und 50 µl internem Standard AE1 (40 µg/ml). Nach Zugabe von 3 ml Chloroform erfolgte eine 30-minütige

5. Materialien und Methoden

Extraktionsphase auf einem Horizontal-Schüttler. Für eine schnelle und optimale Phasentrennung schloss sich der Extraktion eine Zentrifugation bei 2000 U/min an. Danach wurde die organische Phase abgetrennt und unter Stickstoffatmosphäre bei 40°C eingedampft. Der verbliebene Rückstand wurde in 100 µl Laufmittel (Acetonitril:Wasser; 80:20) wieder aufgenommen. Davon gelangten dann 80 µl zur Analyse in die HPLC.

5.5.5.3. Validierung

Die Nachweisgrenze des H17s lag bei dieser Methode bei 1 µg/ml und die Bestimmungsgrenze bei 2,5 µg/ml. Ansonsten entsprachen die Validierungsparameter den von *Eisenschmidt* [2005] ermittelten Daten²⁴.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Seit der Entwicklung des Lebens existieren Resistenzmechanismen, die sich im Laufe der Zeit immer weiter differenzierten. Immer häufiger werden neuartige Strukturen, die für diverse Resistenzmechanismen verantwortlich gemacht werden entdeckt. Eine relativ neuartige Form der Resistenz ist das Phänomen der Multidrug-Resistance (MDR), einer vom Körper entwickelten Form der Resistenz, deren Entdeckung auf das Jahr 1976 zurückgeht⁵⁵. Der immensen Bedeutung, die ihr bei der Ausschleusung zahlreicher Arzneistoffe aus den Zielzellen und der damit einhergehenden unzureichenden Akkumulation dieser Pharmaka im Organismus zuteil wird, gilt erst seit kurzem intensivere Aufmerksamkeit. Mittlerweile wurden zahlreiche Membran- und Halbtransporter beschrieben, die offensichtlich alle ihren Teil zur Ausbildung der MDR beitragen. Über die meisten von ihnen ist kaum mehr bekannt, als das Gewebe in welchem sie entdeckt wurden. Welche Rolle sie im Kontext der MDR spielen bleibt weiterhin Thema zahlreicher Forschungsvorhaben.

Die Targetierung der membranständigen exsorptiven Transporter P-gp und MRP stand im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Bisher werden einige wenige Substanzen als direkte Modulatoren von Membrantransportern eingesetzt. Kürzlich erhielt das nichtimmunosuppressiv wirkende Cyclosporin-Analogon PSC 833 (Valspodar[®]) als erster, ausschließlich zur P-gp-Modulation eingesetzter Arzneistoff, die Zulassung der zuständigen Autorisierungsbehörden und der HIV-Proteaseinhibitor Ritonavir wird neben seiner CYP3A4 hemmenden Wirkung auch aufgrund seiner höheren Affinität zu P-gp mit dem verwandten Saquinavir koadministriert, um dessen exsorptiven Transport über P-gp zu reduzieren⁹. Auf diese Weise konnten die Dosierungen des nebenwirkungsreichen Saquinavirs insofern eingedämmt werden, dass die Therapie auf einige bisher stark nebenwirkungsempfindliche Patienten ausgedehnt werden konnte. Somit sind auch für solche Patienten entscheidende Verbesserungen in der Compliance zu erwarten^{9,56}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Studien mit neuartigen dimeren 1,4-Dihydropyridinen und Vergleichssubstanzen, wie Ritonavir, auf Affinität zu diesen Transportproteinen durchgeführt. Ursprünglich wurden die dimeren 1,4-Dihydropyridine als neuartige Gruppe nichtpeptidischer HIV-Proteasehemmer entwickelt. Durch ihren strukturellen Aufbau mit lipophilen Strukturelementen und tertiären Stickstoffatomen lag

die Vermutung einer MDR-Modulation allerdings nahe¹³⁴. Mit verschiedenen etablierten Modellen und analytischen Methoden konnte das modulatorische Potenzial dieser Substanzen aufgezeigt werden. Zuerst wurde die Verdrängung von radioaktiv markierten P-gp-Substraten gemessen, gefolgt von einem Fluoreszenz-Uptake-Assay sowohl an P-gp (L5178Y und L5178YvMDR) als auch an MRP (MDA-MB-231, ATCC: HTB26) exprimierenden Zelllinien. Aus diesem Assay gingen die dimeren 1,4-Dihydropyridine HX (1), H17 (2) und die JW-Typen (20-22) als einige der bisher am stärksten P-gp modulatorisch wirkenden Substanzen hervor, die allesamt als zelluntoxisch einzustufen waren, was durchgeführte Zytotoxizitätsuntersuchungen belegten. In darauf folgenden Evaluierungen von Struktur-Wirkungsbeziehungen konnte eine für diese Molekülgruppe ideale Zusammenstellung einer effektiven P-gp-Modulation gefunden werden. Hierüber wiederum ließen sich Aussagen über eine diskutierte Symmetrie des P-gps bzw. zu dessen Substrat-Bindungsregion ableiten. Da die affinsten Substanzen eine strenge C_2 -Symmetrie aufwiesen und deren modulatorisches Potenzial mit der Reduktion symmetrischer Elemente aus dem Molekül sank, konnte in dieser Arbeit eine begründete Vermutung einer C_2 -Symmetrie der P-gp Bindungsstelle der Modulatoren postuliert werden. Auch in darauf folgenden *in situ* Studien am perfundierten Rattendarm konnten die Erkenntnisse aus dem Fluorescence-Uptake-Assay bestätigt werden. Hierbei ergaben sich neue Hinweise auf eine eventuell zusätzliche Affinität eines Vertreters der dimeren 1,4-Dihydropyridine, dem H17, zu MRP. Durch eine Modifizierung des Perfusionsmodells mit einem MRP-Substrat wurde diese Vermutung bekräftigt. Eine direkte Bestimmung von IC50-Werten der P-gp Inhibierung zeigte, dass H17 dem Ritonavir weit überlegen war. Ungefähr halb soviel Substanz wurde benötigt, um den inhibitorischen Effekt des Ritonavirs zu erreichen. Über weitere Studien an einer MRP-exprimierenden Zelllinie (HTB-26), konnte für H17 im Vergleich mit einem der stärksten MRP-Inhibitoren, dem Probenecid¹¹¹, ein MRP-inhibitorisches Potenzial aufgezeigt werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen zeigten ein Potenzial für einen eventuellen klinischen Einsatz als direkte P-gp-Modulatoren. H17 inhibierte zusätzlich effektiv MRP-Typen. Ihre inhibitorischen Aktivitäten übertrafen die bisher bekannter und eingesetzter Modulatoren bei geringerer Zytotoxizität um ein Vielfaches. In weiteren Untersuchungen erwies sich die in Vertretung für diese Substanzklasse untersuchte Verbindung H17 im Vergleich zur Permeabilität von Saquinavir, Talinolol, und Indometacin als ein schwaches P-gp bzw. MRP-Substrat, was einen großen Vorteil in Bezug auf die Überwindung der MDR darstellt; sind doch durch diese Eigenschaften größtmögliche Inhibitionsraten bei gering einzusetzender

Konzentration zu erwarten. Zudem eröffnen sich Perspektiven einer Kombinationstherapie bei der Behandlung von HIV-infizierten Patienten, da die meisten dimeren 1,4-Dihydropyridine als Inhibitoren der HIV-Protease beschrieben sind⁴⁰, was im Rahmen eines weiteren Promotionsvorhabens untersucht wurde. Beispielsweise könnten sie anstelle des Ritonavirs mit Saquinavir oder anderen HIV-Proteaseinhibitoren, wie Ritonavir selbst, koadministriert werden, denn mittlerweile ist bewiesen, dass auch die peptidischen HIV-Proteaseinhibitoren Substrate des P-gps sind⁵¹. Die dimeren 1,4-Dihydropyridine könnten somit intensiv zur Überwindung der MDR in diese Form der Resistenzausbildung eingreifen und die Wirkungsweise der bisher verwendeten Proteaseinhibitoren bei geringerer zum Einsatz kommender Konzentration steigern. Um diesen wünschenswerten Weg beschreiten zu können, gilt es noch einiges mehr über die Spezifität, Selektivität und das eigentliche Ausmaß der Membrantransporterhemmung durch diese Substanzgruppe zu untersuchen. Außerdem ist noch wenig darüber bekannt, ob eine Daueranwendung dieser Verbindungen nicht ebenso Resistenzerscheinungen hervorruft, oder ob die dimeren 1,4-Dihydropyridine diesbezüglich nicht auch ein gewisses Potenzial zur Induktion des P-gps bzw. MRPs bergen, wie es beispielsweise für den HIV-PI Ritonavir beschrieben wurde⁸⁸. Dies Aufzuklären ist eine der kommenden und gleichzeitig naheliegendsten Aufgaben. Ungeachtet dessen bleibt das inhibitorische Potenzial unumstritten und wenn die dimeren 1,4-Dihydropyridine ebenso Affinitäten zu MRP4 zeigen würden, dann könnte dies in entscheidendem Maße, zusätzlich zu ihrer P-gp und MRP-inhibitorischen Komponente, zur Überwindung der MDR auch bei der HIV-Therapie mit Reverse Transkriptase-Inhibitoren beitragen, da die körpereigenen Resistenzausbildungen gegen die Reversen Transkriptase-Inhibitoren zu einem großen Teil auf das MRP4 zurückzuführen sind¹⁰¹. Weil noch wenig über die Spezifität der MRP-Inhibierung der dimeren 1,4-Dihydropyridine bekannt ist, scheint dieser Ansatz, wie auch viele andere auf diesem Gebiet, mehr als denkbar. Zusätzlich könnten durch weiterführende Untersuchungen der Molekülsymmetrie noch genauere Aussagen über die Struktur des P-gps bzw. dessen Substrat-Bindungsstellen getroffen werden. Nach dieser Abhandlung über die für die Ausbildung der MDR verantwortlichen Membran-Transporter der ABC-Superfamilie wird evident, warum eine Hemmung solcher Molekülpumpen *in vivo* bisher wenig erfolgreich war. Im Organismus liegt jeweils die gesamte Anzahl dieser Strukturen vor und es ist mehr als wahrscheinlich, dass wegen der mangelnden Selektivität der bisher eingesetzten Modulatoren, kaum klinische Erfolge bei der Überwindung der MDR zu verzeichnen waren. Außerdem erfüllen fast alle Membran-Transporter eine physiologische Aufgabe. Ein Totalausfall

6. Zusammenfassung und Ausblick

einer Molekül-Efflux-Pumpe kann teilweise zu erheblichen Schäden im Organismus führen¹⁰⁰. Es ist also erstrebenswert eine Substanz einzusetzen, die gute Modulationseigenschaften an den untersuchten Membran-Transportern aufweist, aber gleichzeitig außerordentlich selektiv einsetzbar ist. Sie sollte also möglichst zielgenau nur Efflux-Pumpen aus proliferativem Gewebe oder anderen Stellen im Organismus, die für einen unerwünschten physiologischen Efflux von Arzneistoffen sorgen, modulieren.

7. Literaturverzeichnis

1. K. C. Almquist, D. W. Loe, D. R. Hipfner, J. E. Mackie, S. P. C. Cole, and R. G. Deeley, *Cancer Res.*, 1995, **55**, 102-110.
2. A. Astier and B. Renat, *Journal of Chromatography*, 1982, **233**, 279-288.
3. Avendano, C. and Menéndez, C., *Recent Advances in Multidrug Resistance Modulators*, 28040 Madrid, 2004.
4. A. A. Bergen, A. Plomp, E. J. Schuurman, S. Terry, M. Breuning, H. Dauwerse, J. Swart, M. Kool, S. van Soest, F. Baas, J. W. ten Brink, and P. T. de Jong, *Nat.Genet.*, 2000, **25**, 228-231.
5. P. Borst and M. Oulette, *Annu.Rev.Microbiol.*, 1995, **49**, 427.
6. Piet Borst, Raymond Evers, Marcel Kool, and Jan Wijnholds, *J.Natl.Cancer Inst.*, 2000, **92**, 1295-1302.
7. C. A. B. Boucher and B. A. Larder, *Viral Variation and Therapeutic Strategies in HIV-Infection*, 1994,1-50.
8. I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, *Adv.Drug Del.Rev.*, 2002, **54**, 631-651.
9. D. W. Cameron, A. J. Japour, Y. Xu, A. Hsu, J. Mellors, C. Farthing, C. Cohen, D. Poretz, M. Markowitz, S. Follansbee, J. B. Angel, D. McMahon, D. Ho, V. Devanarayan, R. Rode, M. Salgo, D. J. Kempf, R. Granneman, J. M. Leonard, and E. Sun, *AIDS*, 4-2-1999, **13**, 213-224.
10. C. E. Cass, A. Janowska-Wieczorek, M. A. Lynch, H. Sheinin, A. A. Hindenburg, and W. T. Beck, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 5798-5804.
11. Z. S. Chen, T. Furukawa, T. Sumizawa, K. Ono, K. Ueda, K. Seto, and et.al., *Mol.Pharmacol.*, 1999, **55**, 921-928.
12. I. Chico, M. H. Kang, R. Bergan, J. Abraham, S. Bakke, B. Meadows, A. Rutt, R. Robey, P. Choyke, M. Merino, B. Goldspiel, T. Smith, S. Steinberg, W. D. Figg, T. Fojo, and S. Bates, *J.Clin.Oncol.*, 2001, **19**, 832-842.
13. E. F. Choo, B. Leake, C. Wandel, H. Imamura, A. J. Wood, G. R. Wilkinson, and R. B. Kim, *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*, 2000, **28**, 655-660.
14. S. P. C. Cole, G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, and et.al., *Science*, 1992, **258**, 1650-1654.
15. L. Connolly, E. Moran, K. A. Larkin, G. L. Scheffer, R. Scheper, B Sarkadi, M. Kool, and M. Clynes, *Hybridoma Hybridomics*, 2001, **20**, 333-341.
16. Y. Cui, J. König, J. K. Buchholz, H. Spring, I. Leier, and D. Keppler, *Mol.Pharmacol.*, 1999, **55**, 929-937.

7. Literaturverzeichnis

17. A. H. Dantzig, D. P. Alwis, and M. Burgess, *M.Adv.Drug Deliv.Rev.*, 2003, **55**, 133-150.
18. H. Dassow, D. Lassner, H. Remke, and R. Preiss, *J.Clin.Pharmacol.Ther.*, 2000, **38**, 209-216.
19. Xavier Decleves, Anne Fajac, Jacqueline Lehmann-Che, Marcienne Tardy, Claire Mercier, Ilse Hurbain, Jean Louis Laplanche, Jean Francois Bernaudin, and Jean Michel Scherrmann, *International Journal of Cancer*, 2002, **98**, 173-180.
20. S. Döppenschmidt, H. Spahn-Langguth, C. Regardh, and P. Langguth, *Pharmaceutical Research*, 1998, **15**, 1001-1006.
21. M. P. Draper, R. L. Martell, and S. B. Levy, *British Journal of Cancer*, 1997, **75**, 810-815.
22. C. Dressler, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002.
23. J. Drewe, H. Gutmann, G. Fricker, M. Torok, C. Berglinger, and J. Huwyler, *Biochemical Pharmacology*, 1999.
24. A. Eisenschmidt, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, 2005.
25. G. D. Eytan and P. W. Kuchel, *Int.Rev.Cytol.*, 1999, **190**, 175-250.
26. O. Fardel, V. Lecureur, A. Corlu, and A. Guillouzo, *Biochemical Pharmacology*, 14-6-1996, **51**, 1427-1436.
27. O. Fardel, V. Lecureur, and A. Guillouzo, *General Pharmacology*, 1996, **27**, 1283-1291.
28. N. Feller, C. M Kuiper, J. Lankelma, J. K. Ruhdal, R. J. Scheper, H. M. Pinedo, and et.al., *Br.J.Cancer*, 1995, **72**, 543-549.
29. Shawn D. Flanagan, Carolyn L. Cummins, Miki Susanto, Xiaoli Liu, Lori H. Takahashi, and Leslie Z. Benet, *Pharmacology*, 2002, **64**, 126-134.
30. A. T. Fojo, K. Ueda, D. J. Slamon, and et.al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1987, **84**, 265-269.
31. M. H. Gaber, *J.Biochem.Mol.Biophys.*, 2002, **6**, 309-314.
32. Z. C. Gatmaitan and I. M. Arias, *Adv.Pharmacol.*, 1993, **24**, 77-97.
33. V. Gekeler, W. Ise, K. H. Sanders, W. R. Ulrich, and J. Beck, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1995, **208**, 345-352.
34. H. Gutmann, G. Fricker, J. Drewe, M. Torok, and D. S. Miller, *Mol.Pharmacol.*, 1999, **56**, 383-389.
35. A. Hanafy, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, 2001.

7. Literaturverzeichnis

36. A. Hanafy, P. Langguth, and H. Spahn-Langguth, *Eur.J.Pharm.Sciences*, 2001, **12**, 405-415.
37. L. A. Herzenberg, D. Parks, B. Sahaf, O. Perez, M. Roederer, and Herzenberg.Le.A., *Clinical Chemistry*, 2002, **48**, 1819-1827.
38. Higgins C.F., *Annu Rev Cell Biol.*, 1992, **8**, 67-113.
39. C. F. Higgins, R. Callaghan, K. J. Linton, M. F. Rosenberg, and R. C. Ford, *Seminars in Cancer Biology*, 1997, **8**, 135-142.
40. A. Hilgeroth, *Mini Reviews in Medical Chemistry*, 2002, **2**, 235-245.
41. A. Hilgeroth, *Pharmazie in Unserer Zeit*, 1998, **1**, 22-25.
42. A. Hilgeroth and A. Billich, *Arch.Pharm.Pharm.Med.Chem.*, 1999, **332**, 3-5.
43. A. Hilgeroth, C. Dressler, S. Neuhoff, H. Spahn-Langguth, and P. Langguth, *Die Pharmazie*, 2000, **55**, 784-785.
44. A. Hilgeroth and A. Langner, *Arch.Pharm.Pharm.Med.Chem.*, 2000, **333**, 195-197.
45. A. Hilgeroth, J. Molnár, and E. De Clerq, *Angew.Chem.*, 2002, **41**, 3623.
46. M. Hirata, K. Kusuzaki, H. Takeshita, S. Hashiguchi, Y. Hirasawa, and T. Ashihara, *Anticancer Res.*, 2001, **21**, 317-320.
47. T. Hirohashi, H. Suzuki, X. Y. Chu, I. Tamai, A. Tsuji, and Y. Sugiyama, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1-1-2000, **292**, 265-270.
48. T. Hirohashi, H. Suzuki, and Y. Sugiyama, *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**, 15181-15185.
49. C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, U. A. Germann, P. W. Cheng, I. Pastan, and M. M. Gottesman, *BIOCHEMISTRY*, 1999, **38**, 13887-13899.
50. P. W. H. Hugen, C. P. W. G. M. Verweij-van Wissen, D. M. Burger, E. W. Wuis, P. P. Koopmans, and Y. A. Hekster, *Journal of Chromatography, B*, 1999, **727**, 139-149.
51. M. T. Huisman, J. H. Beijnen, and A. H. Schinkel, *Mol.Pharmacol.*, 2001, **59**, 806-813.
52. T. Ishikawa, *Trends Biochem.Sci.*, 1992, **17**, 463-468.
53. Jedlitschky, G., *WO*, 2002003993, 17-1-2002.
54. K. Jones, P. G. Bray, S. H. Khoo, R. A. Davey, E. R. Meaden, S. A. Ward, and D. J. Back, *AIDS*, 27-7-2001, **15**, 1353-1358.
55. R. L. Juliano and V Ling, *Biochim.Biophys.Acta*, 1976, **455**, 152-162.
56. D. J. Kempf, K. C. Marsh, G. Kumar, and et.al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, **41**, 654-660.

7. Literaturverzeichnis

57. H. S. Kim, Y. D. Min, and C. H. Choi, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 2001, **283**, 64-71.
58. R. B. Kim, Martin F. Fromm, Christoph Wandel, Brenda Leake, Alastair J. J. Wood, Dan M. Roden, and Grant R. Wilkinson, *Journal of Clinical Investigation*, 15-1-1998, **101**, 289-294.
59. C. Köhler, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002.
60. J. König, A. T. Nies, Y. Cui, I. Leier, and D. Keppler, *Biochim.Biophys.Acta*, 1999, **1461**, 377-394.
61. M. Kool, M. van der Linden, M. de Haas, F. Baas, and P. Borst, *Cancer Res.*, 1999, **59**, 175-182.
62. M. Kool, Linden M. van der, M. de Haas, G. L. Scheffer, J. M. de Vree, A. J. Smith, G. Jansen, G. J. Peters, N. Ponne, R. J. Scheper, R. P. Elferink, F. Baas, and P. Borst, *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 8-6-1999, **96**, 6914-6919.
63. Gary D. Kruh, Hao Zeng, Philip A. Rea, Guosheng Liu, Zhe Sheng Chen, Kun Lee, and Martin G. Belinsky, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2001, **33**, 493-501.
64. G. R. Lankas, M. E. Cartwright, and D R Umbenhauer, *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 1997, **143**, 357-365.
65. B. A. et. al. Larder, *Science*, 1995, **269**, 696-699.
66. J. S. Lee, K. Paull, M. Alvarez, C. Hose, A. Monks, M. Grever, A. T. Fojo, and S. Bates, *Mol.Pharmacol.*, 1994, **46**, 627.
67. Kun Lee, Andres J. P. Klein-Szanto, and Gary D. Kruh, *Journal of the National Cancer Institute*, 2000, **92**, 1934-1940.
68. C. Leisen, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, 2002.
69. H. Lennernäs, *Pharmaceutical Research*, 1995, **12**, 1573-1582.
70. Jiunn H. Lin and Masayo Yamazaki, *Drug Metabolism Reviews*, 2003, **35**, 417-454.
71. Jiunn H. Lin and Masayo Yamazaki, *Clinical Pharmacokinetics*, 2003, **42**, 59-98.
72. T. Litman, T. E. Druley, W. D. Stein, and S. E. Bates, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, **58**, 931-959.
73. T. Litman, T. Zeuthen, T. Skovsgaard, and W. D. Stein, *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, 22-8-1997, **1361**, 169-176.
74. Liu, Y., Cho, C. W., Yan, X., Henthorn, T. K., Lillehei, K. O., Cobb, W. N., and Ng, K., *Y Pharm.Res.*, 2001, **18**.

7. Literaturverzeichnis

75. D. W. Loe, R. G. Deeley, and S. P. C. Cole, *Eur.J.Cancer*, 1996, **32A**, 945-957.
76. Loo T.W.and Clarke D.M., *Biol.Chem.*, 1997, **272**, 20986-20989.
77. T. W. Loo and D. M. Clarke, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**, 39272-39278.
78. C. et al. Loveday, *Lancet*, 1995, **345**, 820-824.
79. K. S. Lown, M. Gosh, and P. B. Watkins, *Drug Metab.Dspos.*, 1998, **26**, 185-187.
80. E. Marthinet, G. Divita, J. Bernaud, D. Rigal, and L. G. Baggetto, *Gene Ther.*, 2000, **7**, 1224-1233.
81. M. A. McAleer, M. A. Breen, N. L. White, and N. Matthews, *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**, 23541-23548.
82. P. Nuhn, *Deutsche Apotheker Zeitung*, 2000, **48**, 50-64.
83. T. Ohga, K. Koike, Y. Makino, Y. Itagaki, and M et. al. Tanimoto, *Cancer Res.*, 1996, **56**, 4224-4228.
84. S Orłowski and M. Garrigos, *Anticancer Res.*, 1999, **19**, 3109-3124.
85. D. F. Ortiz, S. Li, A. Iyer, X. Zhang, P. Novikoff, and I. M. Arias, *Am.J.Physiol.*, 1999, **276**, G1493-G1500.
86. Patel, V. A., Dunn, M. J., and Sorojin, A., *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**.
87. M. D. Perloff, L. L. von Moltke, J. M. Fahey, J. P. Daily, and D. J. Greenblatt, *AIDS*, 16-6-2000, **14**, 1287-1289.
88. M. D. Perloff, L. L. von Moltke, J. E. Marchand, and D. J. Greenblatt, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, **90**, 1829-1837.
89. Plo, I., Lehne, G., Beckstrom, K. J., Maestre, N., Battaieb, A., Laurent, G., and Lutier, D., *Mol.Pharmacol.*, 2002, **62**.
90. L. Profit, V. A. Eagling, and D. J. Back, *AIDS*, 10-9-1999, **13**, 1623-1627.
91. M. Ramachandra, S. V. Ambudkar, D. Chen, C. A. Hrycyna, S. Dey, M. M. Gottesman, and I. Paston, *Biochemistry*, 1998, **37**, 5010-5019.
92. M. Richter, N. Gyémánt, J. Molnár, and A. Hilgeroth, *Pharmaceutical Research*, 2004, **21**, 1864-1868.
93. J. R. Riordan, J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielinski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, M. L. Drumm, M. C. Iannuzzi, F. S. Collins, and L. C. Tsui, *Science*, 1989, **245**, 1066-1073.
94. Y. Romsicki and F. J. Sharom, *Biochemistry*, 1999, **38**, 6887-6896.

7. Literaturverzeichnis

95. M. F. Rosenberg, R. Callaghan, R. C. Ford, and C. F. Higgins, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **272**, 10685.
96. S. Ruetz and P. Gros, *Cell*, 1994, **77**, 1071-1081.
97. L. Sachs, *Angewandte Statistik*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1992.
98. Z. E. Sauna, M. M. Smith, M. Muller, K. M. Kerr, and S. Ambudkar, V, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2001, **33**, 481-491.
99. A. H. Schinkel, U. Mayer, E. Wagenaar, and et.al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1997, **94**, 4028-4033.
100. A. H. Schinkel, J. J. M. Smit, O. van Tellingen, and et.al., *Cell*, 1994, **77**, 491-502.
101. John D. Schuetz, Michele C. Connelly, Daxi Sun, Sheela G. Paibir, Patricia M. Flynn, R. V. Srinivas, Alok Kumar, and Arnold Fridland, *Nat.Med.(N.Y.)*, 1999, **5**, 1048-1051.
102. U. Schumacher and K. Møllgaard, *Histochem.Cell Biol.*, 1997, **108**, 179-182.
103. A. Seelig, *Eur.J.Biochem.*, 1998, **251**, 252-261.
104. A. Seelig and E. Landwojtowicz, *Eur.J.Pharm.Sciences*, 2000, **12**, 31.
105. A. B. Shanafelt, *Biotechniques*, 1991, **3**, 330.
106. A. B. Shapiro, K. Fox, P. Lam, and V Ling, *Eur.J.Biochem.*, 1999, **259**, 841-850.
107. A. B. Shapiro and V Ling, *Eur.J.Biochem.*, 1997, **250**, 130-137.
108. A. B. Shapiro and V Ling, *Eur.J.Biochem.*, 1997, **250**, 122-129.
109. K. Simons and S. D. Fuller, *Annu Rev Cell Biol.*, 1985, **1**, 243-288.
110. P. J. Sinko, G. D. Leesman, and G. L. Amidon, *Pharmaceutical Research*, 1991, **8**, 979-988.
111. F. M. Sirotnak and et.al., *Clinical Cancer Research*, 2000, **6**, 3705-3712.
112. A. J. Smith, A. van Helvoort, and G. van Meer, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**, 23530-23539.
113. H. Spahn-Langguth, G. Baktir, A. Radschuweit, A. Okyar, B. Terhaag, P. Ader, A. Hanafy, and P. Langguth, *J.Clin.Pharmacol.Ther.*, 1998, **36**, 16-34.
114. R. Srinivas, V, D. Middlemas, P. Flynn, and A. Fridland, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 1998, **42**, 3157-3162.
115. W. D. Stein, *Physiol.Rev.*, 1997, **77**, 545.

7. Literaturverzeichnis

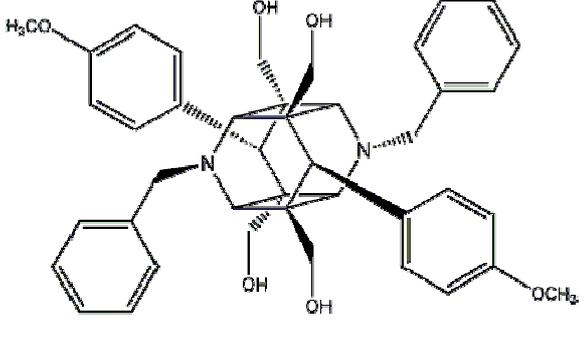
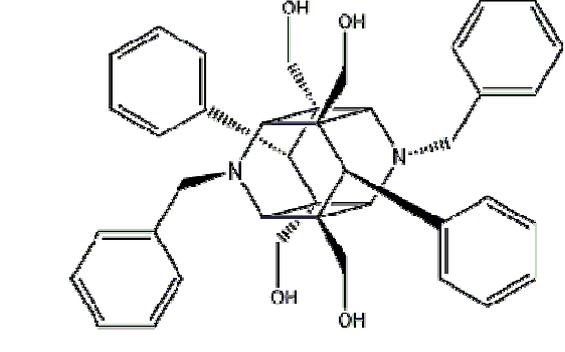
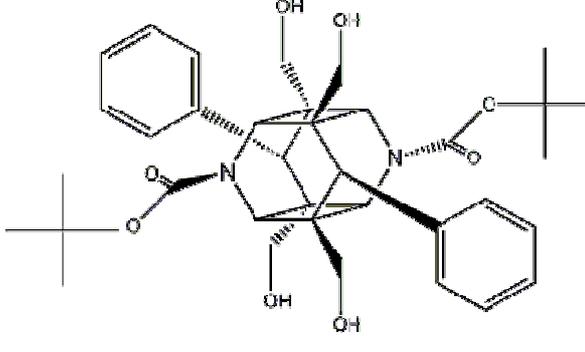
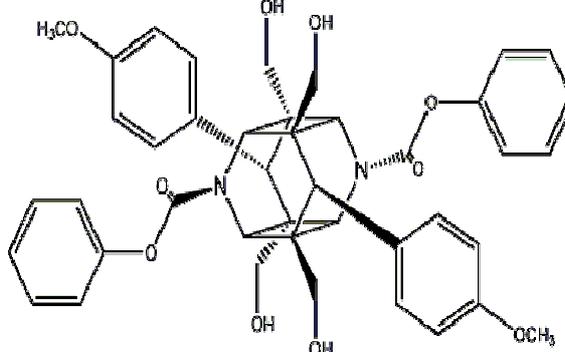
116. R. J. Stubbs, M. S. Schwartz, R. Chiou, L. A. Entwistle, W. Bayne, and F. Merck Sharp and Dohme Res. Lab., *Journal of Chromatography*, 1986, **383**, 432-437.
117. L. et. al. Stuyer, *Int. Antiviral News*, 1997, **5**, 38-40.
118. Y Sugimoto and T Tsuruo, *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*, 1991, **Plenum**, 57-70.
119. H. Takanaga, A. Ohnishi, S. Yamada, and et.al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, **293**, 230-236.
120. M. H. Teiten, M. Bezdetnaya, J. L. Merlin, D. C. Bour, M. E. Pauly, M. Dicato, and F. Guillemin, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 2001, **62**, 146-152.
121. S. Touhey, R. O'Connor, S. Plunkett, A. Maguire, and M. Clynes, *European Journal of Cancer*, 2002, **38**, 1661-1670.
122. J. Trowsdale, I. Hanson, I. Mockridge, S. Beck, A. Townsed, and A. Kelly, *Nature*, 1990, **348**, 741-743.
123. A. Tsuj and I. Tamai, *Pharmaceutical Research*, 1996, **13**, 963-977.
124. D R Umbenhauer, G. R. Lankas, and T. R Pippert, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, **146**, 88-94.
125. J. D. Unadkat, A. Dahlin, and S. Vijay, *Current Drug Metabolism*, 2004, **5**, 125-131.
126. I. L. Urbatsch, B. Sankaran, S. Bhagat, and A. E. Senior, *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**, 26956-26961.
127. A. van Helvoort, A J. Smith, and H. Sprong, *Cell*, 1996, **87**, 507-517.
128. L. van Zuylen, K Nooter, A. Sparreboom, and J. Verweij, *J. Invest. New Drugs*, 2000, **18**, 205-220.
129. B. Voigt, L. Meijer, O. Lozach, C. Schaechtele, F. Totzke, and A. Hilgeroth, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, **15**, 823-825.
130. V. J. Wachter, J. A. Silverman, Y. Zhang, and et.al., *J. Pharm. Sci.*, 1998, **87**, 1322-1330.
131. C. Wandel, R. B. Kim, S. Kajiji, F. P. Guengerich, G. R. Wilkinson, and A. J. Wood, *J. Cancer Res.*, 1999, **59**, 3944-3948.
132. G. Wang, R. Pincheira, and J. T. Zhang, *Eur. J. Biochem.*, 1998, **255**, 383-390.
133. G. Wang, R. Pincheira, M. Zhang, and J. T. Zhang, *Biochem. J.*, 1997, **328**, 897-904.
134. R. B. Wang, C. L. Kuo, L. L. Lien, and E. J. Lien, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2003, **28**, 203-228.

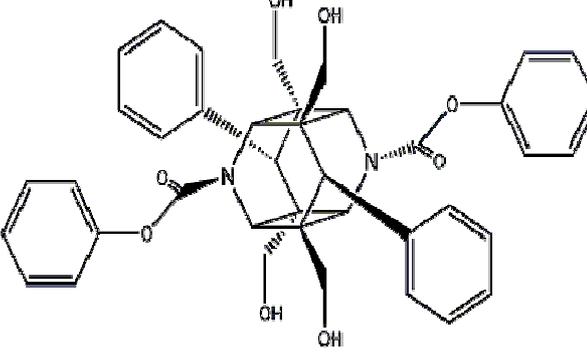
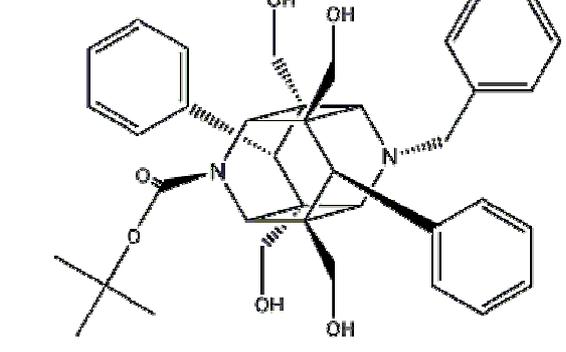
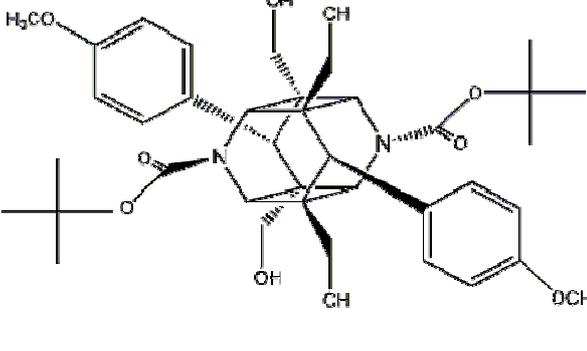
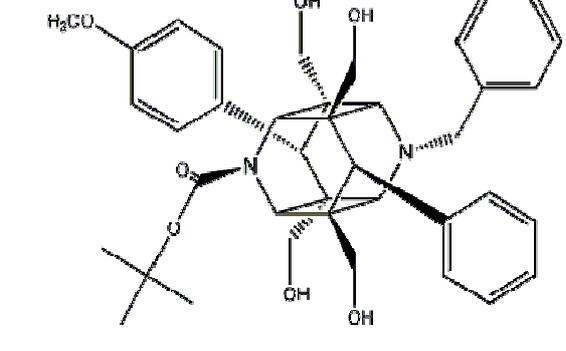
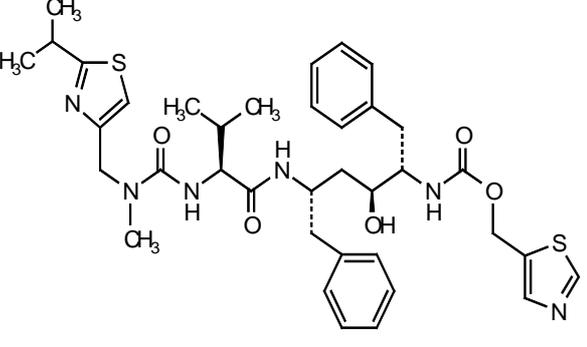
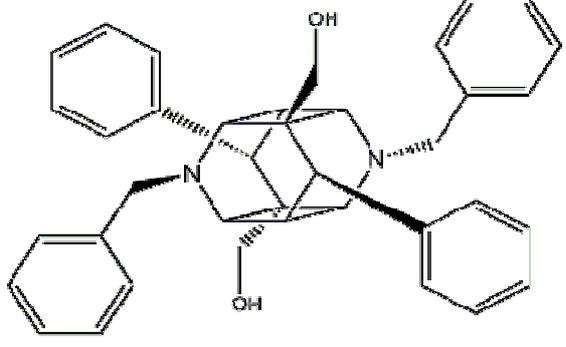
7. Literaturverzeichnis

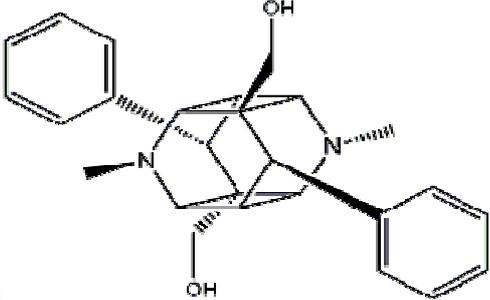
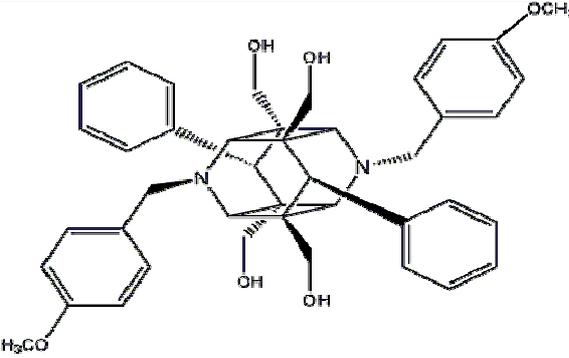
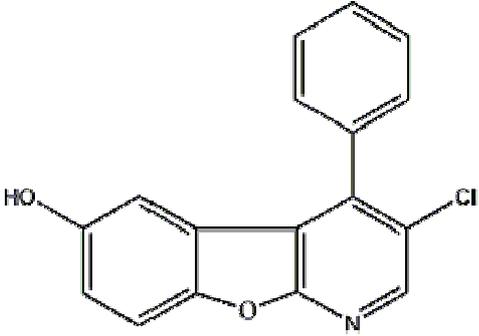
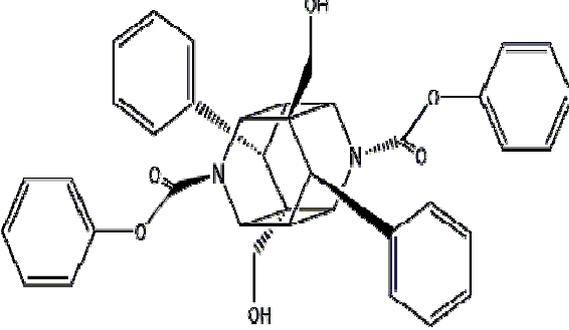
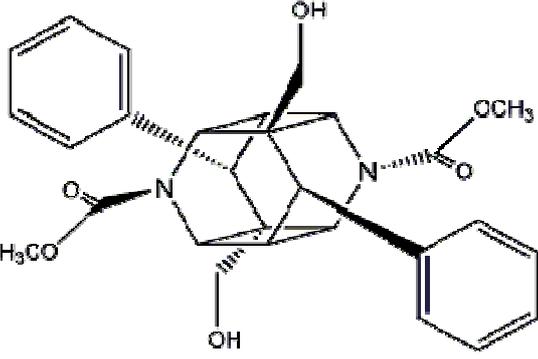
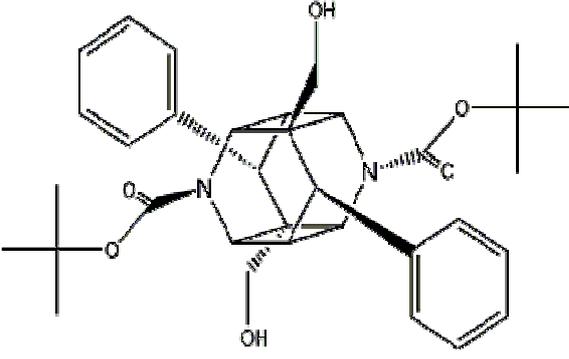
135. C. B. Washington, G. E. Duran, M. C. Man, B. Sikic, I, and T. F. Blaschke, *JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES AND HUMAN RETROVIROLOGY*, 1-11-1998, **19**, 203-209.
136. C. B. Washington, H. R. Wiltshire, M. Man, T. Moy, S. R. Harris, E. Worth, P. Weigl, Z. Liang, D. Hall, L. Marriott, and T. F. Blaschke, *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*, 2000, **28**, 1058-1062.
137. J. L. Weaver, G. Szabo, P. S. Pine, M. M. Gottesman, S. Goldenberg, and A. Aszalos, *Int.J.Cancer*, 1993, **54**, 456.
138. U. H. Wetterich, H. Spahn-Langguth, E. Mutschler, B. Terhaag, W. Rösch, and P. Langguth, *Pharmaceutical Research*, 1996, **13**, 514-522.
139. J. Wijnholds, C. A Mol, L. van Deemter, M. de Haas, G. L. Scheffer, and F. et. al. Baas, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2000, **97**, 7476-7481.
140. A. Wlodawer, M. Miller, M. Jaskolsky, B. K. Sathyanarayana, and E. Baldwin, *Science*, 1989, **245**, 616.
141. Wollmann, J., Richter, M., Molnár, J., and Hilgeroth, A. First Insight in Symmetry and Flexibility of Membrane Efflux Pump P-Glycoprotein by Novel Bifunctional Modulators. 2005.
Ref Type: Unpublished Work
142. S. Yamashita, T. Furubayahi, M. Kataoka, T. Sakane, H. Sezaki, and H. Touda, *Eur.J.Pharm.Sciences*, 2000, **10**, 195-204.
143. H. Yuasa, T. Iga, M. Hanano, and J. Watanabe, *Biochim.Biophys.Acta*, 1988, **938**, 189-198.
144. R. Yumoto, T. Murakami, Y. Nakamoto, R. Hasegawa, J. Nagai, and M. Takano, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1999, **289**, 149-155.
145. Y. Zhang and L. Z. Benet, *Clinical Pharmacokinetics*, 2001, **40**, 159-168.

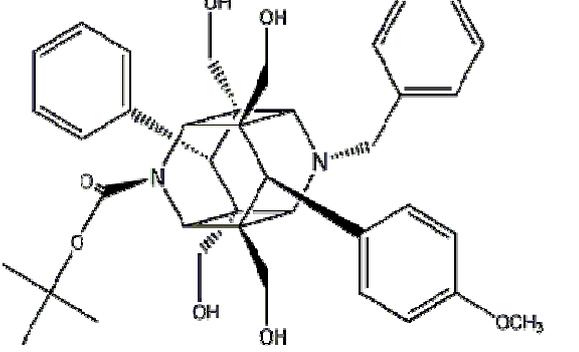
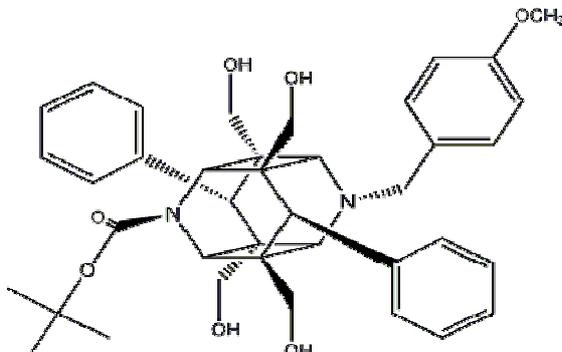
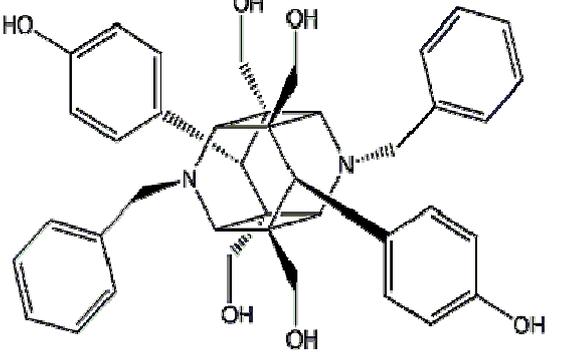
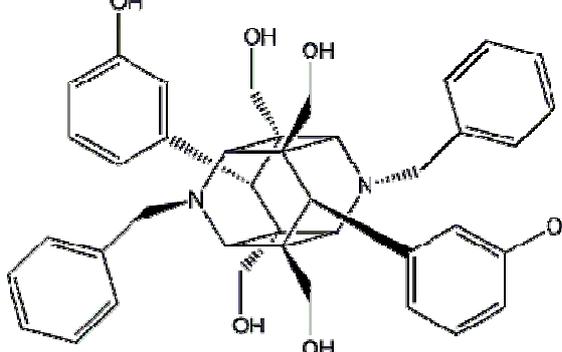
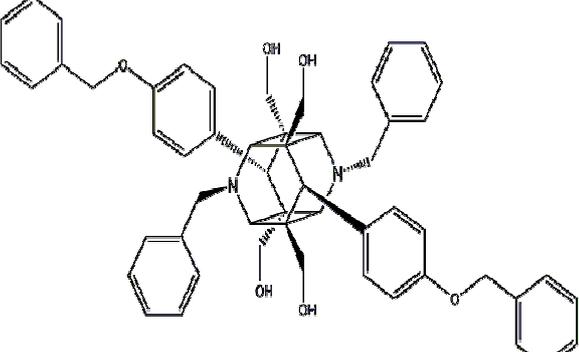
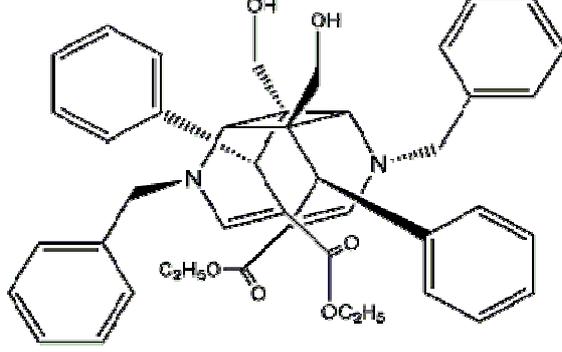
-Anhang-

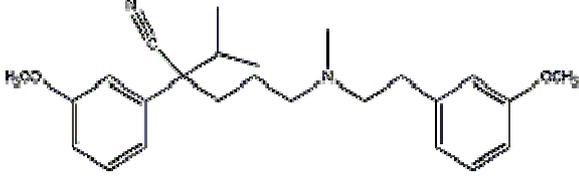
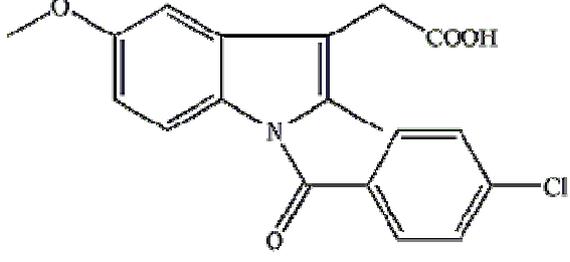
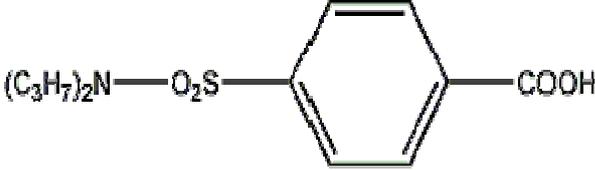
1. Verbindungen

	
<p style="text-align: center;">1 (HX)</p> <p style="text-align: center;">3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>	<p style="text-align: center;">2 (H17)</p> <p style="text-align: center;">3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>
	
<p style="text-align: center;">3</p> <p style="text-align: center;">3,9-Ditert.butylloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>	<p style="text-align: center;">4</p> <p style="text-align: center;">3,9-Dibenzylloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>

	
<p style="text-align: center;">4a</p> <p style="text-align: center;">3,9-Dibenzoyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>	<p style="text-align: center;">5</p> <p style="text-align: center;">3-Tertbutyloxycarbonyl-9-benzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>
	
<p style="text-align: center;">5a</p> <p style="text-align: center;">3,9-Ditert.butyloxycarbonyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>	<p style="text-align: center;">6</p> <p style="text-align: center;">3-Tert.butyloxycarbonyl-9-benzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6-phenyl-12-(4-methoxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>
	

<p style="text-align: center;">7 (Ritonavir)</p> <p>[5S-(5R*,8R*,10R*,11R*)]-10-Hydroxy-2-methyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazolyl]3,6-dioxo-8,11-bis(phenylmethyl)-2,4,7,12-tetraazatridecan-13-säure-5-thiazolylmethylester</p>	<p style="text-align: center;">8</p> <p>3,9-Dibenzyl-1,7-dihydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>
<p>PyPhCH₃</p>  <p style="text-align: center;">9</p>	 <p style="text-align: center;">10 (JW41)</p>
<p>3,9-Dimethyl-1,7-dihydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>	<p>1,5,7,11-Tetrahydroxymethyl-3,9-bis(4-methoxybenzyl)-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>
 <p style="text-align: center;">13</p>	 <p style="text-align: center;">15</p>
<p>3-Chloro-4-phenylbenzo[4,5]furo[2,3]pyridin-6-ol</p>	<p>1,7-Dihydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diphenyloxycarbonyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2,7}.0^{4,11}.0^{5,10}]dodecan</p>
	

<p style="text-align: center;">16</p> <p style="text-align: center;">1,7-Dihydroxymethyl-3,9-dimethyloxycarbonyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan</p>	<p style="text-align: center;">17</p> <p style="text-align: center;">1,7-Dihydroxymethyl-3,9-di-tert.butyloxycarbonyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan</p>
	
<p style="text-align: center;">19</p> <p style="text-align: center;">3-Tetrabutylloxycarbonyl-9-benzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6-(4-methoxyphenyl)-12-phenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan</p>	<p style="text-align: center;">19a</p> <p style="text-align: center;">3-Tetrabutylloxycarbonyl-9-(4-methoxyphenyl)-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-diphenyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan</p>
	
<p style="text-align: center;">20 (JW 46b)</p> <p style="text-align: center;">3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(4-hydroxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan</p>	<p style="text-align: center;">21 (JW 53)</p> <p style="text-align: center;">3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-6,12-bis(3-hydroxyphenyl)-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan</p>
	

<p style="text-align: center;">22 (JW 46a)</p> <p>3,9-Dibenzyl-6,12-bis(4-benzyloxyphenyl)-1,5,7,11-tetrahydroxymethyl-3,9-diazahexacyclo[6.4.0.0^{2.7}.0^{4.11}.0^{5.10}]dodecan</p>	<p style="text-align: center;">H19</p> <p>Diethyl-1,5-dibenzyl-1, 5, 8, 8bβ-tetrahydro-4aβ, 8aβ-dihydroxymethyl-4,8-diphenylcyclobuta[1,2-b:3,4-b']dipyridin-3,7(4H,4bβH)dicarboxylat</p>
	
<p style="text-align: center;">Verapamil</p> <p>(RS)-2-Isopropyl-2,8-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaocctannitril</p>	<p style="text-align: center;">Indometacin</p> <p>1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolessigsäure</p>
	
<p>Probenecid</p> <p>N,N-(Dipropylsulfamoyl)-benzoesäure</p>	

2. Daten MTT-Assay

Absorptionen der untersuchten Substanzen bei neun verschiedenen Konzentrationen

Konzentration [μ M]	Substanz									
	HX (1)	SEM	H17 (2)	SEM	3	SEM	4	SEM	4a	SEM
	Absorption									
0,1171875	0,368	0,016	0,328	0,012	0,282	0,007	0,381	0,014	0,379	0,017
0,234375	0,312	0,012	0,318	0,011	0,296	0,007	0,356	0,013	0,351	0,016
0,46875	0,327	0,013	0,313	0,011	0,306	0,008	0,355	0,013	0,359	0,016
0,9375	0,266	0,011	0,227	0,008	0,302	0,008	0,348	0,013	0,351	0,016
1,875	0,185	0,008	0,218	0,007	0,311	0,008	0,296	0,011	0,294	0,013
3,75	0,189	0,008	0,214	0,007	0,288	0,007	0,254	0,009	0,233	0,010
7,5	0,16	0,007	0,204	0,007	0,189	0,005	0,182	0,007	0,198	0,009
15	0,153	0,006	0,172	0,006	0,194	0,005	0,156	0,006	0,161	0,007
30	0,099	0,004	0,113	0,004	0,08	0,002	0,11	0,004	0,111	0,005

Anhang

Konzentration [μ M]	Substanz									
	5	SEM	5a	SEM	6	SEM	Ritonavir (7)	SEM	8	SEM
	Absorption									
0,1171875	0,361	0,005	0,408	0,010	0,39	0,017	0,47	0,009	0,491	0,007
0,234375	0,384	0,005	0,399	0,010	0,359	0,015	0,455	0,009	0,482	0,007
0,46875	0,319	0,004	0,342	0,008	0,352	0,015	0,364	0,007	0,467	0,006
0,9375	0,332	0,004	0,342	0,008	0,335	0,014	0,389	0,007	0,426	0,006
1,875	0,325	0,004	0,345	0,008	0,295	0,013	0,271	0,005	0,352	0,005
3,75	0,242	0,003	0,239	0,006	0,236	0,010	0,233	0,004	0,22	0,003
7,5	0,127	0,002	0,224	0,005	0,173	0,007	0,102	0,002	0,14	0,002
15	0,13	0,002	0,189	0,005	0,159	0,007	0,092	0,002	0,128	0,002
30	0,074	0,001	0,082	0,002	0,094	0,004	0,052	0,001	0,074	0,001
Konzentration [μ M]	Substanz									
	9	SEM	10	SEM	13	SEM	15	SEM	16	SEM
	Absorption									
0,1171875	0,53	0,025	0,532	0,023	0,483	0,016	0,082	0,002	0,117	0,004
0,234375	0,429	0,020	0,465	0,020	0,488	0,016	0,077	0,002	0,107	0,004
0,46875	0,402	0,019	0,426	0,019	0,462	0,016	0,071	0,001	0,102	0,003
0,9375	0,376	0,018	0,392	0,017	0,405	0,014	0,059	0,001	0,101	0,003
1,875	0,359	0,017	0,367	0,016	0,371	0,012	0,052	0,001	0,096	0,003
3,75	0,32	0,015	0,34	0,015	0,279	0,009	0,052	0,001	0,089	0,003
7,5	0,228	0,011	0,243	0,011	0,185	0,006	0,049	0,001	0,071	0,002
15	0,145	0,007	0,202	0,009	0,136	0,005	0,046	0,001	0,055	0,002
30	0,107	0,005	0,137	0,006	0,149	0,005	0,048	0,001	0,06	0,002

Anhang

Konzentration [μ M]	Substanz									
	17	SEM	19	SEM	19a	SEM	JW46b (20)	SEM	JW53 (21)	SEM
	Absorption									
0,1171875	0,157	0,005	0,388	0,010	0,357	0,007	0,178	0,010	0,166	0,015
0,234375	0,142	0,004	0,374	0,010	0,334	0,007	0,160	0,011	0,172	0,025
0,46875	0,134	0,004	0,322	0,009	0,312	0,006	0,152	0,008	0,162	0,021
0,9375	0,105	0,003	0,322	0,009	0,296	0,006	0,182	0,018	0,186	0,013
1,875	0,073	0,002	0,318	0,009	0,224	0,005	0,147	0,020	0,203	0,101
3,75	0,05	0,001	0,214	0,006	0,184	0,004	0,158	0,015	0,197	0,008
7,5	0,039	0,001	0,196	0,005	0,173	0,003	0,178	0,008	0,202	0,004
15	0,038	0,001	0,169	0,005	0,159	0,003	0,210	0,019	0,193	0,008
30	0,034	0,001	0,112	0,003	0,099	0,002	0,214	0,007	0,281	0,024
Konzentration [μ M]	Substanz									
	22	SEM	DMSO 1%	SEM	DMSO ^{D6} 1%	SEM				
	Absorption									
0,1171875	0,426	0,010	0,449	0,013	0,528	0,018				
0,234375	0,411	0,010	0,45	0,013	0,482	0,016				
0,46875	0,405	0,010	0,446	0,013	0,466	0,016				
0,9375	0,388	0,009	0,414	0,012	0,46	0,016				
1,875	0,378	0,009	0,411	0,012	0,441	0,015				
3,75	0,336	0,008	0,397	0,012	0,427	0,014				
7,5	0,354	0,009	0,408	0,012	0,408	0,014				
15	0,322	0,008	0,392	0,012	0,437	0,015				
30	0,369	0,009	0,401	0,012	0,444	0,015				

3. Daten Fluorescence-Uptake-Assay zur Überwindung der MDR in P-gp exprimierenden Tumor-Zellen

3.1. Screen

Verbindungen	μl	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
PAR +R123	-	400,07	89,88	804,51		784
PAR \emptysetR123	-	400,38	89,54	2,10		1
MDR Kontrolle	-	463,59	134,02	12,05		10
MDR +R123 (mean)	-	<i>448,88</i>	<i>130,65</i>	<i>11,87</i>		-
Verapamil	10	459,93	131,37	338,82	<i>28,54</i>	305
1 (HX)	2	438,06	128,66	<i>293,51</i>	<i>24,72</i>	22
	20	445,05	125,34	1032,90	<i>87,01</i>	897
2 (H17)	2	443,48	132,59	<i>496,02</i>	<i>41,78</i>	547
	20	439,06	121,37	595,50	<i>50,16</i>	532
4	2	445,86	127,61	<i>4,52</i>	<i>0,38</i>	10
	20	438,06	128,08	17,18	<i>1,44</i>	12
4a	2	442,53	125,67	11,51	<i>0,97</i>	9
	20	435,31	130,22	21,48	<i>1,81</i>	11
7 (Ritonavir)	2	432,36	127,89	22,28	<i>1,87</i>	17
	20	424,76	129,39	227,02	<i>19,12</i>	11
11	2	438,00	125,90	11,78	<i>0,99</i>	9
	20	433,27	128,00	12,15	<i>1,02</i>	9
MDR Kontrolle	-	434,17	127,28	11,70		9
DMSO control 20 μL		430,84	134,70	8,73	<i>0,51</i>	7

Verbindungen	μM	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
PAR +R123	-	473,58	176,12	1043,65		1084
PAR ØR123	-	469,66	174,00	2,25		2
MDR Kontrolle	-	525,93	247,71	10,53		9
MDR +R123 (mean)	-	<i>502,51</i>	<i>239,12</i>	9,88		
Verapamil	10	526,00	258,33	<i>181,67</i>	18,39	49
16	1	497,42	231,68	20,90	2,12	13
	10	486,76	220,91	<i>164,25</i>	16,62	11
17	1	484,54	233,40	9,63	0,97	8
	10	481,74	224,17	<i>103,64</i>	10,49	8
15	1	599,31	283,82	265,00	14,41	14
	10	600,66	277,37	530,37	28,84	425
19	1	563,36	254,34	21,33	1,16	9
	10	573,78	256,43	269,23	14,64	8
MDR Kontrolle	-	479,08	230,53	9,23		7
DMSO control 20 μL	-	472,82	232,15	4,98	0,49	3

Verbindungen	μl	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
PAR +R123	-	500,47	91,92	903,70		798
PAR ØR123	-	500,81	94,31	2,13		1
MDR Kontrolle	-	449,61	83,18	9,49		7
MDR +R123 (<i>mean</i>)	-	450,89	82,52	8,56		-
Verapamil 1 mg/mL	10	5	469,05	85,22	11,70	11,70
3	2	454,24	82,73	18,68	2,18	9
	20	452,27	81,77	282,91	33,05	547
5	2	453,14	84,44	15,58	1,82	9
	20	458,72	80,90	280,96	32,82	345
6	2	449,83	82,80	10,45	1,22	7
	20	450,33	80,37	103,28	12,07	9
8	2	441,85	79,05	142,20	16,61	80
	20	447,30	78,66	175,31	20,48	95
9	2	448,06	84,64	10,95	1,28	8
	20	443,27	79,90	102,68	12,00	7
10	2	444,49	81,98	8,39	0,98	7
	20	436,67	81,66	13,73	1,60	7
13	2	450,96	83,04	6,96	0,81	6
	20	448,55	85,41	6,67	0,78	6
MDR Kontrolle	-	452,17	81,85	7,62		6
DMSO Kontrolle 20 μL		441,49	84,08	7,96	0,50	6

3.2. Konzentrationsabhängige Bestimmung

Verbindungen	μM	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
PAR +R123	-	414,29	111,81	769,97		723
PAR ØR123	-	411,11	107,11	2,28		1
MDR Kontrolle	-	497,71	166,70	13,77		12
MDR +R123 (<i>mean</i>)	-	<i>474,51</i>	<i>160,84</i>	12,21		-
Verapamil 1 mg/mL	10	490,88	167,29	201,28	16,48	91
1 (HX)	0,2	481,14	163,83	<i>192,55</i>	15,77	18
	1	470,96	160,22	<i>420,07</i>	34,40	22
	5	469,32	159,53	<i>571,56</i>	46,81	865
	10	474,19	158,63	1062,39	87,01	991
	20	451,36	147,13	952,01	77,97	437
2 (H17)	0,2	460,39	154,49	<i>428,82</i>	35,12	429
	1	464,29	161,22	<i>418,58</i>	34,28	667
	5	468,39	151,98	705,87	57,81	542
	10	463,25	156,19	<i>827,30</i>	50,20	500
	20	470,79	151,25	<i>492,58</i>	40,34	414
3	1	439,00	151,97	<i>34,66</i>	2,84	11
	5	448,96	152,18	<i>109,92</i>	9,00	13
	10	473,30	159,64	<i>543,84</i>	33,00	11
	20	464,34	159,83	<i>431,21</i>	35,32	729
	25	458,42	145,66	<i>625,93</i>	51,26	710
MDR		451,30	154,98	10,64		10
DMSO control 20 μl		446,73	164,88	8,51	0,70	7

Verbindungen	μM	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
PAR +R123	-	523,41	183,61	936,01		922
PAR ØR123	-	518,37	188,03	1,98		1
MDR Kontrolle	-	512,02	230,33	9,07		9
MDR +R123 (<i>mean</i>)	-	512,02	230,33	9,07		
Verapamil 1 mg/mL	10	566,68	253,71	226,26	24,95	361
5	1	583,55	258,55	25,08	2,77	13
	5	587,57	260,99	18,14	2,00	12
	10	591,56	259,76	459,14	50,62	491
	20	576,46	247,47	299,31	33,00	406
	25	569,97	235,77	446,38	49,22	339
6	1	578,71	253,45	12,53	1,38	9
	5	576,58	257,35	13,77	1,52	8
	10	580,69	266,50	16,17	1,78	6
	20	549,80	239,60	113,38	12,50	495
	25	527,31	227,51	388,44	42,83	504
7 (Ritonavir)	0,2	570,41	253,49	14,19	1,56	11
	1	563,56	252,99	15,33	1,69	11
	5	570,54	253,11	17,30	1,91	10
	10	512,53	237,09	220,08	24,27	8
	20	511,83	238,77	412,33	45,46	667
MDR		512,02	230,33	9,07		9
DMSO control 20 μl		558,13	260,12	8,47	0,93	8

Verbindungen	μM	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
PAR +R123	-	556,15	200,72	957,49		1036
PAR ØR123	-	565,70	205,57	2,28		1
MDR Kontrolle	-	649,83	291,21	11,11		10
MDR +R123 (<i>mean</i>)	-	<i>626,06</i>	<i>290,55</i>	<i>10,48</i>		
Verapamil 1 mg/mL	10	637,14	289,54	366,92	35,01	395
8	0,2	640,31	287,18	<i>159,30</i>	15,20	70
	1	658,88	296,35	<i>256,22</i>	24,45	319
	5	653,06	294,45	<i>153,65</i>	14,66	57
	10	651,69	284,45	<i>194,44</i>	18,55	191
	20	636,60	293,93	<i>210,36</i>	20,07	114
9	1	644,02	298,40	12,16	1,16	10
	5	643,64	293,61	14,06	1,34	10
	10	633,18	296,22	21,97	2,10	10
	20	618,49	281,66	<i>283,49</i>	27,05	10
	25	618,93	<i>277,49</i>	<i>359,08</i>	34,26	567
19	1	613,36	293,53	11,86	1,13	9
	5	615,82	289,53	19,93	1,90	10
	10	614,01	293,12	129,95	12,40	10
	20	595,04	278,64	<i>302,37</i>	28,85	8
	25	588,65	<i>256,79</i>	<i>390,48</i>	37,26	763
MDR		602,48	289,88	9,84		9
DMSO control 20 μl		600,28	296,28	7,78	0,74	7

Verbindungen	μM	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
PAR +R123	-	535,95	144,28	905,37		1074
PAR ØR123	-	517,92	143,61	1,62		1
MDR Kontrolle	-	659,18	259,58	11,31		9
MDR +R123 (<i>mean</i>)	-	<i>600,39</i>	<i>246,66</i>	<i>11,36</i>		
Verapamil 1 mg/mL	10	588,00	266,77	<i>166,95</i>	<i>14,70</i>	29
15	1	578,71	253,45	319,21	<i>28,10</i>	14
	5	576,58	257,35	311,38	<i>27,41</i>	15
	10	580,69	266,50	350,68	<i>30,87</i>	13
	20	549,80	239,60	287,86	<i>25,34</i>	469
	25	527,31	227,51	340,00	<i>29,93</i>	327
16	1	596,56	270,81	21,61	<i>1,90</i>	14
	5	604,09	268,63	122,41	<i>10,78</i>	15
	10	606,77	267,44	211,32	<i>18,60</i>	13
	20	588,61	261,61	242,43	<i>21,34</i>	469
	25	573,22	248,34	239,98	<i>21,13</i>	327
17	1	564,92	256,06	76,57	<i>6,74</i>	13
	5	585,08	255,03	72,14	<i>6,35</i>	10
	10	578,56	252,74	84,40	<i>7,43</i>	10
	20	563,52	233,97	358,22	<i>31,53</i>	495
	25	567,64	236,64	377,55	<i>33,24</i>	414
MDR		541,60	233,73	11,40		7
DMSO control 20 μl	20 μl	572,82	232,15	6,29	<i>0,55</i>	3

Verbindungen	μM	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
PAR +R123	-	516,10	120,04	849,11		813
PAR ØR123	-	521,87	125,91	2,44		2
MDR Kontrolle	-	636,21	195,13	34,60		21
MDR +R123 (<i>mean</i>)	-	552,44	166,05	8,75		
Verapamil 1 mg/mL	10	631,38	190,21	<i>179,41</i>	20,50	77
20 (JW 46b)	0,2	619,39	187,14	308,92	35,31	39
	1	616,04	183,71	347,28	39,69	53
	5	605,16	180,26	896,43	102,45	1321
	10	613,19	180,34	929,25	106,20	930
	20	601,51	182,97	425,32	48,61	403
21 (JW 53)	1	582,06	171,62	1107,58	126,58	1240
	5	588,67	172,43	1266,66	144,76	1382
	10	575,74	166,38	1055,95	120,68	1207
	20	571,68	168,68	2x519,16	118,67	542
	25	571,68	168,68	2x519,16	118,67	542
22 (JW 46a)	1	591,26	180,35	223,39	25,53	990
	5	589,14	178,86	1015,96	116,11	1106
	10	578,27	170,42	623,88	71,30	1203
	20	575,65	171,04	1052,63	120,3	1198
	25	561,48	167,73	1057,61	120,87	1201
MDR		549,74	161,21	11,02	1,26	5
DMSO control 20 μl	20 μl	540,53	162,62	9,03	1,03	7

Verbindungen	μM	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
PAR +R123	-	535,95	144,28	905,37		1074
PAR ØR123	-	517,92	143,61	1,62		1
MDR Kontrolle	-	659,18	259,58	11,31		9
MDR +R123 (<i>mean</i>)	-	<i>600,39</i>	<i>246,66</i>	<i>10,81</i>		
Verapamil 1 mg/mL	10	588,00	266,77	<i>158,91</i>	<i>14,70</i>	29
5a	1	578,71	253,45	12,22	<i>1,13</i>	14
	5	576,58	257,35	188,20	<i>17,41</i>	15
	10	580,69	266,50	158,26	<i>14,64</i>	13
	20	549,80	239,60	241,50	<i>22,34</i>	469
	25	527,31	227,51	302,36	<i>27,97</i>	327
10	1	596,56	270,81	21,61	<i>17,90</i>	14
	5	604,09	268,63	170,58	<i>15,78</i>	15
	10	606,77	267,44	287,55	<i>26,60</i>	13
	20	588,61	261,61	273,93	<i>25,34</i>	469
	25	573,22	248,34	308,52	<i>28,54</i>	327
19a	1	564,92	256,06	40,43	<i>3,74</i>	13
	5	585,08	255,03	68,64	<i>6,35</i>	10
	10	578,56	252,74	274,90	<i>25,43</i>	10
	20	563,52	233,97	336,52	<i>31,13</i>	495
	25	567,64	236,64	363,65	<i>33,64</i>	414
MDR		541,60	233,73	10,40		7
DMSO control 20 μl	20 μl	572,82	232,15	6,81	<i>0,63</i>	3

4. Daten Fluorescence-Uptake-Assay zur Überwindung der MDR in MRP exprimierenden Tumor-Zellen

Verbindungen	μM	FSC	SSC	FL-1	Fluorescence Activity Ratio	Peak Ch
HTB26 \emptysetCBF	-	543	199	29		22
HTB26+CBF	-	547	194	584		403
Indometacin (+ Kontrolle)	28	541	191	587	0,9	395
2 (H17)	2	541	191	587	0,9	392
Probenecid	2	536	193	801	1,3	537
HTB26+CBF	-	541	185	645		385
HTB26+DMSO	-	535	192	649	1,0	375

5. Daten Checkerboard-Studie repräsentativ für Verb. 8

Subst.8 checkerboard mit Epirubicin (MDR-Zelllinie)		
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	A
35	10	0,094
17,5	10	0,106
8,75	10	0,127
4,375	10	0,121
2,188	10	0,125
1,094	10	0,147
0,544	10	0,193
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	5	0,079
17,5	5	0,096
8,75	5	0,107
4,375	5	0,107
2,188	5	0,12
1,094	5	0,19
0,544	5	0,257
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	2,5	0,076
17,5	2,5	0,086
8,75	2,5	0,105
4,375	2,5	0,096
2,188	2,5	0,16
1,094	2,5	0,297
0,544	2,5	0,273
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	1,25	0,082
17,5	1,25	0,092
8,75	1,25	0,105
4,375	1,25	0,133
2,188	1,25	0,282
1,094	1,25	0,316
0,544	1,25	0,292
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	0,625	0,076
17,5	0,625	0,091
8,75	0,625	0,138
4,375	0,625	0,24
2,188	0,625	0,292
1,094	0,625	0,339
0,544	0,625	0,282

c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	0,313	0,075
17,5	0,313	0,089
8,75	0,313	0,165
4,375	0,313	0,248
2,188	0,313	0,264
1,094	0,313	0,308
0,544	0,313	0,269
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	0,156	0,076
17,5	0,156	0,091
8,75	0,156	0,152
4,375	0,156	0,188
2,188	0,156	0,2
1,094	0,156	0,216
0,544	0,156	0,216
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	0,078	0,077
17,5	0,078	0,089
8,75	0,078	0,146
4,375	0,078	0,178
2,188	0,078	0,208
1,094	0,078	0,255
0,544	0,078	0,217
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	0,039	0,087
17,5	0,039	0,105
8,75	0,039	0,147
4,375	0,039	0,2
2,188	0,039	0,215
1,094	0,039	0,263
0,544	0,039	0,249
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	0,020	0,056
17,5	0,020	0,062
8,75	0,020	0,114
4,375	0,020	0,167
2,188	0,020	0,23
1,094	0,020	0,278
0,544	0,020	0,304

c Epirub in Mikrogr./ml			
	10		0,209
	5		0,22
	2,5		0,231
	1,25		0,291
	0,625		0,292
	0,313		0,292
	0,156		0,293
	0,078		0,298
	0,039		0,316
	0		0,327
FIC und FIX Werte			
FIC A (Epirub 10ug/ml)	FIC A (Epirub 5ug/ml)	FIC A (Epirub 2,5ug/ml)	FIC A (Epirub 1,25ug/ml)
0,450	0,359	0,329	0,282
0,507	0,436	0,372	0,316
0,608	0,486	0,455	0,361
0,579	0,486	0,416	0,457
0,598	0,545	0,693	0,969
0,703	0,864	1,286	1,086
0,923	1,168	1,182	1,003
FIC A (Epirub 0,6ug/ml)	FIC A (Epirub 0,3ug/ml)	FIC A (Epirub 0,1ug/ml)	FIC A (Epirub 0,08ug/ml)
0,260	0,257	0,259	0,258
0,312	0,305	0,311	0,299
0,473	0,565	0,519	0,490
0,822	0,849	0,642	0,597
1,000	0,904	0,683	0,698
1,161	1,055	0,737	0,856
0,966	0,921	0,737	0,728
FIC A (Epirub 0,04ug/ml)			
0,275			
0,332			
0,465			
0,633			
0,680			
0,832			
0,788			

FIC B 8 (35uM)	FIC B 8 (17,5uM)	FIC B 8 (8,75uM)	FIC B 8 (4,375uM)
1,679	1,710	1,114	0,725
1,411	1,548	0,939	0,641
1,357	1,387	0,921	0,575
1,464	1,484	0,921	0,796
1,357	1,468	1,211	1,437
1,339	1,435	1,447	1,485
1,357	1,468	1,333	1,126
1,375	1,435	1,281	1,066
1,554	1,694	1,289	1,198
FIC B 8 (2,1875uM)	FIC B 8 (1,09375uM)	FIC B 8 (0,543875uM)	
0,543	0,529	0,635	
0,522	0,683	0,845	
0,696	1,068	0,898	
1,226	1,137	0,961	
1,270	1,219	0,928	
1,148	1,108	0,885	
0,870	0,777	0,711	
0,904	0,917	0,714	
0,935	0,946	0,819	
FIC A (Epirub 10ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 5ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 2,5ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 1,25ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)
2,128	1,770	1,686	1,746
2,217	1,985	1,759	1,800
1,722	1,425	1,376	1,282
1,303	1,127	0,990	1,253
1,142	1,067	1,388	2,195
1,232	1,547	2,354	2,223
1,558	2,014	2,080	1,964

FIC A (Epirub 0,6ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 0,3ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 0,1ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 0,08ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)
1,617	1,596	1,617	1,633
1,779	1,740	1,778	1,734
1,683	2,012	1,852	1,771
2,259	2,334	1,767	1,663
2,270	2,052	1,552	1,602
2,380	2,163	1,514	1,773
1,893	1,806	1,448	1,442

FIC A (Epirub 0,04ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)
1,829
2,026
1,755
1,831
1,615
1,778
1,607

Subst.8 checkerboard mit Epirubicin (PAR-Zelllinie)		
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	Absorption
35	10	0,098
17,5	10	0,105
8,75	10	0,108
7,375	10	0,112
2,188	10	0,114
1,094	10	0,114
0,544	10	0,134
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	
35	5	0,07
17,5	5	0,074
8,75	5	0,105
7,375	5	0,076
2,188	5	0,087
1,094	5	0,085
0,544	5	0,087

c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	Absorption
35	2,5	0,064
17,5	2,5	0,063
8,75	2,5	0,095
7,375	2,5	0,053
2,188	2,5	0,068
1,094	2,5	0,072
0,544	2,5	0,063
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	Absorption
35	1,25	0,057
17,5	1,25	0,053
8,75	1,25	0,09
7,375	1,25	0,05
2,188	1,25	0,073
1,094	1,25	0,064
0,544	1,25	0,066
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	Absorption
35	0,625	0,04
17,5	0,625	0,053
8,75	0,625	0,055
7,375	0,625	0,064
2,188	0,625	0,069
1,094	0,625	0,072
0,544	0,625	0,093
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	Absorption
35	0,3125	0,057
17,5	0,3125	0,057
8,75	0,3125	0,096
7,375	0,3125	0,066
2,188	0,3125	0,091
1,094	0,3125	0,11
0,544	0,3125	0,123
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	Absorption
35	0,15625	0,06
17,5	0,15625	0,06
8,75	0,15625	0,116
7,375	0,15625	0,105
2,188	0,15625	0,151
1,094	0,15625	0,151
0,544	0,15625	0,166

c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	Absorption
35	0,078125	0,06
17,5	0,078125	0,06
8,75	0,078125	0,112
7,375	0,078125	0,108
2,188	0,078125	0,148
1,094	0,078125	0,152
0,544	0,078125	0,161
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	Absorption
35	0,0390625	0,063
17,5	0,0390625	0,062
8,75	0,0390625	0,115
7,375	0,0390625	0,1
2,188	0,0390625	0,127
1,094	0,0390625	0,133
0,544	0,0390625	0,129
c 8 in Mikromol	c Epirub in Mikrogr./ml	Absorption
35	0,01953125	0,03
17,5	0,01953125	0,038
8,75	0,01953125	0,088
7,375	0,01953125	0,066
2,188	0,01953125	0,148
1,094	0,01953125	0,159
0,544	0,01953125	0,157
c Epirub in Mikrogr./ml		Absorption
10		0,068
5		0,073
2,5		0,085
1,25		0,088
0,625		0,123
0,313		0,133
0,156		0,141
0,078		0,145
0,039		0,158
0		0,164

FIC und FIX Werte			
FIC A (Epirub 10ug/ml)	FIC A (Epirub 5ug/ml)	FIC A (Epirub 2,5ug/ml)	FIC A (Epirub 1,25ug/ml)
1,441	0,959	0,753	0,648
1,544	1,014	0,741	0,602
1,588	1,438	1,118	1,023
1,647	1,041	0,624	0,568
1,676	1,192	0,800	0,830
1,676	1,164	0,847	0,727
1,971	1,192	0,741	0,750
FIC A (Epirub 0,6ug/ml)	FIC A (Epirub 0,3ug/ml)	FIC A (Epirub 0,1ug/ml)	FIC A (Epirub 0,08ug/ml)
0,325	0,429	0,426	0,414
0,431	0,429	0,426	0,414
0,447	0,722	0,823	0,772
0,520	0,496	0,745	0,745
0,561	0,684	1,071	1,021
0,585	0,827	1,071	1,048
0,756	0,925	1,177	1,110
FIC A (Epirub 0,04ug/ml)			
0,399			
0,392			
0,728			
0,633			
0,804			
0,842			
0,816			
FIC B 8 (35uM)	FIC B 8 (17,5uM)	FIC B 8 (8,75uM)	FIC B 8 (4,375uM)
3,267	2,763	1,227	1,697
2,333	1,947	1,193	1,152
2,133	1,658	1,080	0,803
1,900	1,395	1,023	0,758
1,333	1,395	0,625	0,970
1,900	1,500	1,091	1,000
2,000	1,579	1,318	1,591
2,000	1,579	1,273	1,636
2,100	1,632	1,307	1,515

FIC B 8 (2,1875uM)	FIC B 8 (1,09375uM)	FIC B 8 (0,543875uM)	
0,770	0,717	0,854	
0,588	0,535	0,554	
0,459	0,453	0,401	
0,493	0,403	0,420	
0,466	0,453	0,592	
0,615	0,692	0,783	
1,020	0,950	1,057	
1,000	0,956	1,025	
0,858	0,836	0,822	
FIC A (Epirub 10ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 5ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 2,5ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 1,25ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)
4,708	3,292	2,886	2,548
4,307	2,961	2,399	1,997
2,816	2,632	2,197	2,045
3,344	2,193	1,427	1,326
2,447	1,780	1,259	1,323
2,393	1,699	1,300	1,130
2,824	1,746	1,142	1,170
FIC A (Epirub 0,6ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 0,3ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 0,1ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)	FIC A (Epirub 0,08ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)
2,002	2,105	2,396	2,414
1,623	1,593	1,617	1,993
1,247	1,569	1,564	2,045
1,350	1,224	1,495	2,381
1,027	1,299	2,091	2,021
1,038	1,519	2,021	2,004
1,348	1,708	2,235	2,136
FIC A (Epirub 0,04ug/ml)+ FIC B 8 (all conc.)			
2,499			
2,024			
2,035			
2,148			
1,662			
1,678			
1,638			

5.1. IC50-Werte der Zytotoxizität aller getesteter Substanzen

IC50-Werte c Verb. 8=konst.				
Epirubicin-Konzentration	MDR	PAR	SEM.MDR	SEM PAR
10	6,01	5,60	0,52	0,92
5	6,09	7,70	0,55	0,75
2,5	6,81	8,10	0,41	0,71
1,25	7,30	7,39	0,51	0,81
0,625	12,07	8,43	0,48	0,88
0,313	12,53	7,94	0,33	0,53
0,156	12,26	10,19	0,56	0,76
0,078	13,04	9,89	0,61	0,61
0,039	13,14	11,94	0,39	0,69
0,020	13,18	11,64	0,48	0,88
0	13,38	11,91	0,5	0,79
IC50-Werte c Epirubicin=Konst.				
Subst. 8 Konzentration	MDR	PAR	SEM MDR	SEM PAR
35	0,09	0,08	0,11	0,21
17,5	0,05	0,09	0,19	0,19
8,75	0,08	0,09	0,18	0,18
7,375	0,09	0,13	0,15	0,19
2,188	0,33	0,15	0,18	0,18
1,093	1,58	0,21	0,33	0,23
0,544	3,6	0,75	0,56	0,36

IC50-Werte c Verb 9 =konst.				
Epirubicin-Konzentration	MDR	PAR	SEM MDR	SEM PAR
10	2,16	2,15	0,04	0,04
5	5,15	2,24	0,10	0,04
2,5	5,62	2,23	0,11	0,04
1,25	5,08	3,48	0,10	0,07
0,625	6,60	4,04	0,13	0,08
0,313	6,26	4,02	0,13	0,08
0,156	6,95	3,82	0,14	0,08
0,078	6,94	4,82	0,14	0,10
0,039	7,39	5,57	0,15	0,11
0,020	7,43	7,25	0,15	0,14
0	7,44	7,12	0,15	0,14
IC50-Werte c Epirubicin=Konst.				
Subst. 9 Konzentration	MDR	PAR	SEM MDR	SEM PAR
22,5	0,57	0,03	0,11	0,08
11,25	0,58	0,13	0,18	0,19
5,625	0,86	0,25	0,19	0,18
2,8125	0,85	0,39	0,15	0,19
1,40625	1,5	0,41	0,18	0,18
0,703125	1,5	0,65	0,33	0,23
0,3515625	1,87	0,76	0,26	0,16

IC50-Werte c Verb 15 =konst.				
Epirubicin-Konzentration	MDR	PAR	SEM MDR	SEM PAR
10	6,36	4,37	0,13	0,09
5	5,23	5,82	0,10	0,12
2,5	10,92	8,61	0,22	0,17
1,25	12,89	10,96	0,26	0,22
0,625	14,71	10,34	0,29	0,21
0,313	14,40	10,56	0,29	0,21
0,156	13,84	10,61	0,28	0,21
0,078	15,68	11,67	0,31	0,23
0,039	13,32	11,24	0,27	0,22
0,020	18,61	13,42	0,37	0,27
0	20,96	12,72	0,42	0,25
IC50-Werte c Epirubicin=Konst.				
Subst. 15 Konzentration	MDR	PAR	SEM MDR	SEM PAR
64,5	0,09	0,07	0,00	0,00
32,25	0,42	0,53	0,14	0,18
16,125	0,42	0,58	0,16	0,19
8,0625	0,43	0,6	0,14	0,17
4,03125	2,21	0,99	0,38	0,12
2,015625	3,01	1,02	0,55	0,24
1,0078125	3,72	3	0,61	0,52

IC50-Werte c Verb 17=konst.				
Epirubicin-Konzentration	MDR	PAR	SEM MDR	SEM PAR
10	1,77	0,92	0,04	0,02
5	2,29	0,72	0,05	0,01
2,5	2,24	1,14	0,04	0,02
1,25	2,02	2,20	0,04	0,04
0,625	2,31	2,06	0,05	0,04
0,313	1,91	2,03	0,04	0,04
0,156	2,47	2,22	0,05	0,04
0,078	2,32	2,37	0,05	0,05
0,039	2,48	2,18	0,05	0,04
0,020	3,00	2,55	0,06	0,05
0	3,18	2,53	0,06	0,05
IC50-Werte c Epirubicin=Konst.				
Subst. 17 Konzentration	MDR	PAR	SEM MDR	SEM PAR
8	0,17	0,22	0,02	0,05
4	0,37	0,23	0,14	0,11
2	1,36	0,24	0,21	0,10
1	1,63	0,67	0,23	0,18
0,5	2,23	0,76	0,31	0,22
0,25	2,89	0,76	0,33	0,31
0,125	2,94	2,52	0,40	0,42

6. Daten *in situ* Perfusionsstudien – P-gp Modulierung

6.1. Modellsubstanz Talinolol (R, S)

		Kolon							
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
R-Talinolol		5	10	15	20	25	30	MW	SEM
	P _{eff} [10 ⁻⁴ cm/s]								
1.Ratte	2,3	0,70	3,38	2,79	1,30	3,60	1,40	2,19	1,22
2.Ratte	1,7	1,19	3,25	1,90	2,81	0,70	0,64	1,75	1,10
3.Ratte	2,5	2,27	1,42	3,63	3,37	1,45	5,87	3,00	1,68
4.Ratte	1,9	0,97	7,65	2,14	1,47	1,16	2,5	2,65	2,52
S-Talinolol									
1.Ratte	2,3	0,59	3,34	2,76	1,27	3,45	1,27	2,11	1,22
2.Ratte	1,7	2,66	2,88	0,82	2,62	3,57	2,68	2,54	0,91
3.Ratte	2,5	1,84	0,73	2,86	2,61	0,72	4,48	2,21	1,43
4.Ratte	1,9	0,9	7,41	2,35	0,99	1,04	2,27	2,49	2,49
R-Talinolol+Ritonavir									
1.Ratte	2,3	4,16	4,73	5,27	2,52	2,36	3,84	4,01	1,17
2.Ratte	1,7	3,78	4,04	4,08	6,90	3,66	6,49	4,83	1,46
3.Ratte	2,5	4,24	0,96	7,42	5,14	1,40	4,10	3,88	2,4
4.Ratte	1,9	4,33	2,71	2,32	5,71	1,78	4,31	3,53	1,49
S-Talinolol+Ritonavir									
1.Ratte	2,3	3,59	4,27	4,53	1,57	1,63	2,42	3,00	1,31
2.Ratte	1,7	1,72	3,45	2,96	5,64	3,12	5,21	3,69	1,48
3.Ratte	2,5	4,02	2,49	7,13	4,24	1,69	3,54	3,85	1,88
4.Ratte	1,9	3,97	2,58	2,56	6,13	1,88	4,18	3,55	1,55
R-Talinolol+Vinblastin									
1.Ratte	2,3	1,58	2,19	1,70	6,17	13,86	2,06	4,59	4,86
2.Ratte	1,7	6,49	7,8	5,91	3,94	7,32	6,47	6,32	1,34
3.Ratte	2,5	5,44	6,23	6,53	7,48	6,82	6,75	6,54	0,68
4.Ratte	1,9	6,13	6,54	4,78	2,28	4,19	2,61	4,42	1,76
S-Talinolol+Vinblastin									
1.Ratte	2,3	1,59	1,88	1,75	5,77	13,21	2,16	4,39	4,59
2.Ratte	1,7	3,07	7,16	5,32	4,98	6,63	5,96	5,52	1,45
3.Ratte	2,5	4,13	8,81	5,46	6,23	5,75	5,76	6,02	1,54
4.Ratte	1,9	6,40	6,37	4,51	1,99	3,88	2,41	4,26	1,89

Ileum									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
R-Talinolol		5	10	15	20	25	30	MW	SEM
		$P_{\text{eff}} [10^{-4} \text{ cm/s}]$							
1.Ratte	6,5	1,75	2,1	0,67	5,77	1,91	2,53	2,46	1,74
2.Ratte	6,5	4,46	2,63	3,98	2,89	2,12	1,91	3,00	0,93
3.Ratte	5,6	3,06	1,97	4,69	1,71	2,73	1,60	2,62	1,16
4.Ratte	3,0	0,57	1,68	0,71	0,82	0,12	1,87	0,96	0,68
S-Talinolol									
1.Ratte	6,5	0,96	1,77	0,37	5,39	1,74	2,38	2,10	1,76
2.Ratte	6,5	2,87	1,25	2,42	1,36	2,55	2,39	2,14	0,67
3.Ratte	5,6	1,4	0,89	3,4	0,63	1,58	2,27	1,70	1,01
4.Ratte	3,0	0,66	1,43	0,73	0,84	0,16	1,73	0,93	0,56
R-Talinolol+Ritonavir									
1.Ratte	6,5	3,80	1,88	2,80	4,82	7,04	4,02	4,06	1,78
2.Ratte	6,5	4,78	6,88	2,76	1,34	4,16	1,72	3,60	2,09
3.Ratte	5,6	1,44	5,67	2,82	1,88	3,89	5,69	3,56	1,84
4.Ratte	3,0	1,35	1,47	1,94	1,13	2,46	1,32	1,61	0,5
S-Talinolol+Ritonavir									
1.Ratte	6,5	3,43	2,45	2,15	4,97	7,3	4,14	4,07	1,9
2.Ratte	6,5	4,00	6,15	2,79	1,14	3,83	1,07	3,16	1,93
3.Ratte	5,6	1,44	5,73	2,1	2,45	5,41	3,97	3,52	1,8
4.Ratte	3,0	1,43	1,51	1,95	1,45	3,03	1,49	1,81	0,63
R-Talinolol+Vinblastin									
1.Ratte	6,5	5,03	6,00	3,41	5,78	5,98	9,37	5,93	1,78
2.Ratte	6,5	6,06	6,52	6,47	4,9	8,49	5,14	6,26	1,28
3.Ratte	5,6	4,94	6,85	9,63	7,56	8,52	8,75	7,71	1,67
4.Ratte	3,0	2,37	2,41	1,74	2,84	2,47	3,62	2,57	0,62
S-Talinolol+Vinblastin									
1.Ratte	6,5	5,37	7,85	4,57	6,86	7,32	10,9	7,15	2,22
2.Ratte	6,5	5,99	6,40	6,99	3,95	7,54	5,1	5,99	1,31
3.Ratte	5,6	4,97	6,37	8,7	6,4	6,31	8,12	6,81	1,36
4.Ratte	3,0	2,87	2,83	1,86	3,37	3,1	3,88	2,99	0,67

Jejunum									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
R-Talinolol		5	10	15	20	25	30	M	SEM
		P _{eff} [10 ⁻⁴ cm/s]							
1.Ratte	4,5	3,76	2,15	2,14	2,17	3,36	1,39	2,50	0,88
2.Ratte	6,0	1,15	0,82	2,17	3,01	1,22	1,40	1,63	0,82
3.Ratte	8,7	2,40	4,85	2,52	4,03	1,16	1,30	2,71	1,47
4.Ratte	9,1	2,87	1,33	0,24	-0,43	1,46	1,71	1,20	1,16
S-Talinolol									
1.Ratte	4,5	4,50	2,58	2,75	2,60	3,65	1,77	2,98	0,96
2.Ratte	6,0	1,25	1,61	1,46	4,35	2,45	2,14	2,21	1,14
3.Ratte	8,7	1,66	3,35	1,73	3,15	1,42	1,26	2,09	0,91
4.Ratte	9,1	3,40	2,13	1,77	1,87	2,23	2,67	2,35	0,61
R-Talinolol+Ritonavir									
1.Ratte	4,5	5,87	7,72	6,54	4,34	4,11	6,95	5,92	1,45
2.Ratte	6,0	2,78	2,49	2,68	4,64	2,86	4,27	3,29	0,92
3.Ratte	8,7	4,29	3,75	2,38	2,12	2,21	1,13	2,64	1,16
4.Ratte	9,1	0,00	0,52	3,3	1,64	1,21	12,51	3,20	4,7
S-Talinolol+Ritonavir									
1.Ratte	4,5	6,61	8,79	7,01	4,82	4,42	7,5	6,53	1,65
2.Ratte	6,0	2,65	2,43	3,46	3,66	3,75	3,02	3,16	0,55
3.Ratte	8,7	1,86	4,13	2,71	2,86	3,93	2,85	3,06	0,84
4.Ratte	9,1	0,38	0,91	4,00	1,68	1,26	12,59	3,47	4,64
R-Talinolol+Vinblastin									
1.Ratte	4,5	5,59	6,81	7,30	9,70	9,85	5,81	7,51	1,87
2.Ratte	6,0	4,61	8,00	9,16	3,15	4,88	5,54	5,89	2,26
3.Ratte	8,7	2,99	7,33	7,49	7,64	7,22	4,07	6,12	2,04
4.Ratte	9,1	5,72	4,83	6,41	5,39	3,54	4,7	6,00	0,99
S-Talinolol+Vinblastin									
1.Ratte	4,5	8,83	7,61	7,94	10,50	10,24	6,75	8,64	1,5
2.Ratte	6,0	4,77	8,20	7,35	3,83	4,68	6,50	5,89	1,72
3.Ratte	8,7	3,03	6,58	6,83	6,06	6,81	3,25	5,43	1,79
4.Ratte	9,1	6,83	5,61	7,69	6,11	4,70	5,94	6,15	1,03

Ileum									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
R-Talinolol		5	10	15	20	25	30	MW	SEM
		P_{eff} [10⁻⁴ cm/s]							
1.Ratte	6,5	1,75	2,1	0,67	5,77	1,91	2,53	2,46	1,74
2.Ratte	6,5	4,46	2,63	3,98	2,89	2,12	1,91	3,00	0,93
3.Ratte	5,6	3,06	1,97	4,69	1,71	2,73	1,60	2,62	1,16
4.Ratte	3,0	0,57	1,68	0,71	0,82	0,12	1,87	0,96	0,68
S-Talinolol									
1.Ratte	6,5	0,96	1,77	0,37	5,39	1,74	2,38	2,10	1,76
2.Ratte	6,5	2,87	1,25	2,42	1,36	2,55	2,39	2,14	0,67
3.Ratte	5,6	1,4	0,89	3,4	0,63	1,58	2,27	1,70	1,01
4.Ratte	3,0	0,66	1,43	0,73	0,84	0,16	1,73	0,93	0,56
R-Talinolol+Ritonavir									
1.Ratte	6,5	3,80	1,88	2,80	4,82	7,04	4,02	4,06	1,78
2.Ratte	6,5	4,78	6,88	2,76	1,34	4,16	1,72	3,60	2,09
3.Ratte	5,6	1,44	5,67	2,82	1,88	3,89	5,69	3,56	1,84
4.Ratte	3,0	1,35	1,47	1,94	1,13	2,46	1,32	1,61	0,5
S-Talinolol+Ritonavir									
1.Ratte	6,5	3,43	2,45	2,15	4,97	7,3	4,14	4,07	1,9
2.Ratte	6,5	4,00	6,15	2,79	1,14	3,83	1,07	3,16	1,93
3.Ratte	5,6	1,44	5,73	2,1	2,45	5,41	3,97	3,52	1,8
4.Ratte	3,0	1,43	1,51	1,95	1,45	3,03	1,49	1,81	0,63
R-Talinolol+Vinblastin									
1.Ratte	6,5	5,03	6,00	3,41	5,78	5,98	9,37	5,93	1,78
2.Ratte	6,5	6,06	6,52	6,47	4,9	8,49	5,14	6,26	1,28
3.Ratte	5,6	4,94	6,85	9,63	7,56	8,52	8,75	7,71	1,67
4.Ratte	3,0	2,37	2,41	1,74	2,84	2,47	3,62	2,57	0,62
S-Talinolol+Vinblastin									
1.Ratte	6,5	5,37	7,85	4,57	6,86	7,32	10,9	7,15	2,22
2.Ratte	6,5	5,99	6,40	6,99	3,95	7,54	5,1	5,99	1,31
3.Ratte	5,6	4,97	6,37	8,7	6,4	6,31	8,12	6,81	1,36
4.Ratte	3,0	2,87	2,83	1,86	3,37	3,1	3,88	2,99	0,67

Kolon									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
R-Talinolol		5	10	15	20	25	30	M	SEM
		P _{eff} [10 ⁻⁴ cm/s]							
5.Ratte	2,4	5,08	1,27	3,31	0,43	4,25	3,68	3,00	1,64
6.Ratte	1,9	2,04	2,23	3,98	3,44	2,08	1,77	2,59	0,82
7.Ratte	2,9	1,74	2,33	0,90	4,66	2,07	2,38	2,35	1,15
8.Ratte	2,2	2,62	1,49	2,45	1,32	2,98	1,21	2,01	0,76
S-Talinolol									
5.Ratte	2,4	4,55	0,76	2,85	1,99	3,95	3,44	2,92	1,38
6.Ratte	1,9	2,20	2,00	3,82	3,66	2,03	1,75	2,58	0,92
7.Ratte	2,9	1,61	1,5	2,69	4,54	1,76	1,84	2,32	1,17
8.Ratte	2,2	2,13	1,11	2,93	1,11	2,18	0,67	1,69	0,86
R-Talinolol+H17									
5.Ratte	2,4	5,95	6,29	4,27	4,42	3,82	4,58	4,89	0,99
6.Ratte	1,9	5,61	4,62	1,91	1,93	4,23	4,97	3,88	1,59
7.Ratte	2,9	6,22	2,03	6,83	5,87	4,49	5,48	5,15	1,72
8.Ratte	2,2	3,88	4,11	4,36	5,49	3,39	3,39	4,10	0,78
S-Talinolol+H17									
5.Ratte	2,4	5,78	6,11	4,00	3,88	3,29	4,22	4,55	1,13
6.Ratte	1,9	5,66	4,45	1,70	1,81	4,70	4,71	3,84	1,67
7.Ratte	2,9	4,02	2,58	5,97	4,39	4,01	4,03	4,17	1,09
8.Ratte	2,2	3,18	3,87	4,10	5,18	2,97	3,06	3,73	0,85
R-Talinolol+Vinblastin									
5.Ratte	2,4	5,81	7,49	6,43	4,13	7,77	4,56	6,03	1,49
6.Ratte	1,9	6,10	6,35	6,72	4,34	10,1	4,06	6,27	2,16
7.Ratte	2,9	6,73	7,88	4,88	5,74	9,09	9,87	7,37	1,94
8.Ratte	2,2	8,70	6,80	7,55	5,11	4,02	4,31	6,08	1,89
S-Talinolol+Vinblastin									
5.Ratte	2,4	6,00	7,70	6,31	6,34	8,04	4,73	6,51	1,20
6.Ratte	1,9	5,65	6,19	6,3	3,95	9,62	3,75	5,91	2,12
7.Ratte	2,9	6,24	7,60	4,62	5,45	9,37	6,58	6,64	1,67
8.Ratte	2,2	8,16	5,98	7,61	5,16	4,01	5,65	6,10	1,55

Ileum									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
R-Talinolol		5	10	15	20	25	30	M	SEM
		P _{eff} [10 ⁻⁴ cm/s]							
5.Ratte	8,7	2,41	2,75	5,08	2,1	0,93	1,86	2,52	1,64
6.Ratte	3,0	2,38	1,57	1,00	1,63	2,02	1,71	1,72	0,46
7.Ratte	4,5	3,43	3,20	2,20	4,19	1,95	3,57	3,09	0,86
8.Ratte	3,8	0,37	1,49	0,17	1,78	2,85	3,47	1,69	1,31
S-Talinolol									
5.Ratte	8,7	1,72	1,78	4,15	1,63	0,33	1,66	1,88	1,24
6.Ratte	3,0	2,18	1,56	0,97	1,63	2,1	1,69	1,69	0,43
7.Ratte	4,5	1,49	2,95	1,84	3,05	1,79	2,52	2,27	0,66
8.Ratte	3,8	0,96	1,44	0,20	1,82	2,61	3,12	1,69	1,07
R-Talinolol+H17									
5.Ratte	8,7	1,45	2,65	2,04	2,89	4,60	4,09	2,95	1,20
6.Ratte	3,0	2,32	1,39	2,04	12,8	1,31	1,57	3,57	4,54
7.Ratte	4,5	3,49	4,69	4,96	6,55	3,52	5,94	4,86	1,24
8.Ratte	3,8	3,68	1,30	1,81	3,15	3,67	3,43	2,84	1,02
S-Talinolol+H17									
5.Ratte	8,7	1,23	2,99	3,52	2,75	4,72	3,57	3,13	1,15
6.Ratte	3,0	2,23	1,39	1,93	9,40	1,26	1,30	2,92	3,2
7.Ratte	4,5	2,94	3,53	3,93	5,26	2,39	6,10	4,02	1,41
8.Ratte	3,8	3,93	1,52	2,41	3,4	3,87	3,41	3,09	0,94
R-Talinolol+Vinblastin									
5.Ratte	8,7	6,82	6,99	6,82	8,37	7,45	7,61	7,34	0,6
6.Ratte	3,0	4,62	5,55	4,04	5,35	4,62	4,47	4,77	0,57
7.Ratte	4,5	5,77	7,44	4,89	7,99	7,63	5,23	6,49	1,35
8.Ratte	3,8	4,89	5,18	6,20	6,98	8,60	4,59	6,07	1,53
S-Talinolol+Vinblastin									
5.Ratte	8,7	6,95	6,74	6,26	7,71	6,57	8,09	7,05	0,71
6.Ratte	3,0	4,5	5,42	3,85	4,75	4,34	4,17	4,50	0,57
7.Ratte	4,5	4,8	6,22	4,46	7,16	6,97	4,72	5,72	1,21
8.Ratte	3,8	5,04	5,35	6,46	6,75	8,69	5,16	6,24	1,39

Jejunum									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
R-Talinolol		5	10	15	20	25	30	M	SEM
		P _{eff} [10 ⁻⁴ cm/s]							
5.Ratte	6,9	3,00	3,08	2,28	2,34	3,42	2,24	2,73	0,50
6.Ratte	7,4	0,71	-0,47	2,65	2,1	2,69	5,33	2,17	1,81
7.Ratte	4,8	2,95	5,68	2,20	3,28	4,76	3,75	3,77	1,27
8.Ratte	4,4	1,76	0,88	3,17	3,28	0,43	5,59	2,52	1,90
S-Talinolol									
5.Ratte	6,9	2,62	3,7	2,88	2,44	1,64	2,53	2,64	0,67
6.Ratte	7,4	1,02	0,46	2,61	1,66	2,69	4,44	2,15	1,42
7.Ratte	4,8	1,49	4,29	1,37	2,88	3,62	2,70	2,73	1,15
8.Ratte	4,4	1,72	1,31	2,72	2,50	0,08	4,61	2,16	1,53
R-Talinolol+H17									
5.Ratte	6,9	1,88	5,16	4,83	1,85	4,00	1,42	3,19	1,66
6.Ratte	7,4	4,84	5,09	3,94	2,74	4,60	2,10	3,88	1,21
7.Ratte	4,8	4,50	4,92	3,25	4,6	3,52	5,47	4,38	0,84
8.Ratte	4,4	3,41	1,31	3,65	3,00	5,78	4,15	3,55	1,46
S-Talinolol+H17									
5.Ratte	6,9	1,67	5,94	4,42	2,49	4,95	3,39	3,81	1,59
6.Ratte	7,4	4,69	4,95	3,80	2,67	4,56	2,06	3,79	1,18
7.Ratte	4,8	3,88	3,74	2,96	4,27	3,40	4,72	3,83	0,62
8.Ratte	4,4	3,40	1,31	3,27	2,41	5,06	3,48	3,15	1,25
R-Talinolol+Vinblastin									
5.Ratte	6,9	7,27	3,25	3,78	9,27	4,20	6,71	5,75	2,37
6.Ratte	7,4	6,82	2,48	4,93	8,36	4,00	7,41	5,67	2,24
7.Ratte	4,8	9,01	5,79	5,29	5,43	5,28	9,79	6,76	2,06
8.Ratte	4,4	7,40	6,33	4,98	7,33	5,94	6,09	6,34	0,91
S-Talinolol+Vinblastin									
5.Ratte	6,9	7,67	3,61	5,21	8,78	4,67	6,91	6,14	1,97
6.Ratte	7,4	5,9	2,4	4,36	8,62	3,34	6,67	5,22	2,44
7.Ratte	4,8	9,33	4,51	4,16	4,05	4,58	8,27	5,82	2,34
8.Ratte	4,4	6,99	6,04	4,7	7,15	5,84	6,00	6,12	0,89

6.2. Modellsubstanz Saquinavir

Kolon									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
Saquinavir		5	10	15	20	25	30	M	SEM
		P _{eff} [10 ⁻⁴ cm/s]						W	
9.Ratte	1,8	4,15	2,9	1,04	0,85	1,12	2,01	2,01	1,30
10.Ratte	1,7	3,48	0,99	1,52	3,94	1,96	1,51	2,23	1,09
11.Ratte	2,9	1,41	0,30	3,00	1,44	3,92	1,74	1,97	1,17
12.Ratte	1,8	2,77	4,43	0,52	2,14	3,16	0,11	2,19	1,64
Saquinavir+Ritonavi									
9.Ratte	1,8	3,85	4,07	4,46	3,74	3,08	2,42	3,60	0,74
10.Ratte	1,7	4,02	3,23	3,67	3,77	3,61	4,15	3,74	0,33
11.Ratte	2,9	3,67	4,41	4,56	3,18	3,79	4,29	3,98	0,53
12.Ratte	1,8	3,15	10,4	2,93	2,34	2,65	3,22	4,11	3,08
Saquinavir+Vinblastin									
9.Ratte	1,8	4,92	5,55	3,30	4,09	2,83	4,57	4,21	1,02
10.Ratte	1,7	4,40	4,65	4,41	3,31	3,45	3,85	4,01	0,56
11.Ratte	2,9	4,39	5,43	2,28	4,35	5,09	5,15	4,45	1,15
12.Ratte	1,8	5,03	0,71	4,41	5,99	9,03	2,85	4,67	2,83

Ileum									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
Saquinavir		5	10	15	20	25	30	M	SEM
		P _{eff} [10 ⁻⁴ cm/s]							
9.Ratte	5,3	2,81	3,15	1,22	1,73	2,03	2,43	2,23	0,71
10.Ratte	5,0	2,81	2,89	1,50	0,84	2,98	2,86	2,31	0,83
11.Ratte	6,3	1,98	3,78	3,76	3,77	1,76	2,62	2,94	0,86
12.Ratte	5,4	5,11	1,88	0,58	1,72	2,16	0,05	1,92	1,76
Saquinavir+Ritonavi									
9.Ratte	5,3	3,77	3,36	3,77	2,52	3,48	2,36	3,21	0,62
10.Ratte	5,0	3,41	3,21	3,86	3,73	3,87	3,76	3,64	0,27
11.Ratte	6,3	3,7	3,76	3,84	3,46	3,64	3,35	3,62	0,19
12.Ratte	5,4	3,65	3,46	3,93	3,21	3,27	3,48	3,5	0,26
Saquinavir+Vinblastin									
9.Ratte	5,3	3,38	4,20	3,8	4,66	4,74	4,41	4,2	0,52
10.Ratte	5,0	4,10	4,80	5,34	4,35	3,98	5,24	4,63	0,58
11.Ratte	6,3	3,42	3,56	4,55	4,07	5,44	5,21	4,38	0,84
12.Ratte	5,4	3,58	3,73	4,78	3,28	4,24	4,88	4,08	0,66

Jejunum									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
Saquinavir		5	10	15	20	25	30	M	SEM
		P _{eff} [10 ⁻⁴ cm/s]							
9.Ratte	5,3	2,84	2,71	2,12	2,16	1,98	2,49	2,38	0,35
10.Ratte	7,7	3,73	0,86	3,82	3,95	0,59	0,48	2,24	1,60
11.Ratte	3,6	2,95	3,24	3,04	2,16	1,54	1,63	2,43	0,68
12.Ratte	4,9	2,29	3,33	0,4	1,07	2,79	4,67	2,43	1,55
Saquinavir+Ritonavi									
9.Ratte	5,3	3,50	2,71	3,21	3,32	2,87	3,84	3,24	0,41
10.Ratte	7,7	3,78	3,12	2,42	3,24	3,31	3,37	3,21	0,45
11.Ratte	3,6	2,84	3,64	3,01	2,75	3,47	3,16	3,15	0,35
12.Ratte	4,9	3,93	3,46	2,15	3,79	3,45	3,43	3,37	0,63
Saquinavir+Vinblastin									
9.Ratte	5,3	3,84	4,57	4,61	3,42	4,55	4,68	4,28	0,52
10.Ratte	7,7	4,87	4,95	3,14	3,86	4,68	5,32	4,47	0,81
11.Ratte	3,6	4,48	4,32	5,11	2,68	4,58	4,63	4,30	0,84
12.Ratte	4,9	4,61	4,23	3,54	5,02	4,33	4,29	4,34	0,49

Kolon									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
Saquinavir		5	10	15	20	25	30	M	SEM
		P_{eff} [10⁻⁴ cm/s]							
13.Ratte	2,4	2,39	3,09	6,48	1,19	1,54	2,59	2,88	1,90
14.Ratte	2,4	3,16	1,44	3,86	3,62	1,21	3,70	2,83	1,09
15.Ratte	2,4	6,08	2,39	2,92	0,83	0,80	-0,81	2,04	2,18
16.Ratte	2,3	9,42	1,17	0,09	0,69	0,6	0,15	2,02	3,65
Saquinavir+H17									
13.Ratte	2,4	2,29	5,04	5,26	3,39	4,58	3,96	4,09	1,12
14.Ratte	2,4	4,44	3,35	3,58	3,26	2,83	7,16	4,10	1,59
15.Ratte	2,4	3,41	1,04	5,09	5,35	4,24	4,25	3,90	1,56
16.Ratte	2,3	8,13	5,05	2,26	4,53	3,32	2,25	4,26	2,22
Saquinavir+H17									
13.Ratte	2,4	7,52	3,16	3,13	2,91	4,7	2,91	4,05	1,83
14.Ratte	2,4	5,80	4,42	4,06	5,96	4,58	7,91	5,45	1,43
15.Ratte	2,4	3,64	1,12	0,86	12,1	-0,81	3,57	3,41	4,58
16.Ratte	2,3	3,33	6,22	3,62	3,83	3,18	7,58	4,63	1,82

Ileum									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
Saquinavir		5	10	15	20	25	30	M	SEM
		P_{eff} [10⁻⁴ cm/s]							
13.Ratte	5,0	3,47	3,11	1,96	2,12	2,15	2,05	2,48	0,64
14.Ratte	6,0	1,78	3,24	2,14	2,21	2,35	2,25	2,33	0,44
15.Ratte	5,0	3,98	4,4	1,33	0,46	4,39	0,44	2,5	1,79
16.Ratte	4,2	6,34	0,89	3,86	1,14	0,74	1,99	2,49	2,21
Saquinavir+H17									
13.Ratte	5,0	2,88	4,12	3,54	3,96	3,37	3,56	3,57	0,44
14.Ratte	6,0	3,87	3,99	5,12	2,04	2,12	3,5	3,44	1,18
15.Ratte	5,0	4,55	4,21	2,94	2,26	3,17	3,48	3,44	0,84
16.Ratte	4,2	5,12	3,35	4,67	2,87	3,11	3,34	3,74	0,92
Saquinavir+H17									
13.Ratte	5,0	4,97	4,25	3,57	4,76	4,62	4,39	4,43	0,49
14.Ratte	6,0	3,27	3,89	5,23	4,88	4,73	5,49	4,58	0,84
15.Ratte	5,0	3,27	3,96	5,47	4,91	5,34	4,72	4,61	0,85
16.Ratte	4,2	2,45	3,74	4,56	4,87	4,59	4,48	4,12	0,9

Jejunum									
Segmentlänge [cm]		Zeit [min]							
Saquinavir		5	10	15	20	25	30	M W	SEM
	P_{eff} [10⁻⁴ cm/s]								
13.Ratte	6,1	3,14	2,97	1,54	2,04	2,35	2,24	2,38	0,59
14.Ratte	7,0	3,67	2,57	1,43	1,66	2,13	2,16	2,27	0,73
15.Ratte	5,0	2,98	0,04	3,59	4,63	0,85	2,58	2,44	1,57
16.Ratte	4,1	3,41	3,12	2,36	2,41	2,23	2,69	2,7	0,47
Saquinavir+H17									
13.Ratte	6,1	5,32	1,87	4,32	2,22	3,50	3,48	3,45	1,29
14.Ratte	7,0	4,37	4,11	2,64	1,99	3,36	3,17	3,27	0,89
15.Ratte	5,0	4,92	5,81	1,64	2,75	3,24	2,86	3,54	1,54
16.Ratte	4,1	3,17	2,61	5,37	3,67	2,98	3,01	3,47	0,99
Saquinavir+H17									
13.Ratte	6,1	3,26	2,68	4,97	5,36	5,11	4,11	4,25	1,09
14.Ratte	7,0	3,22	2,86	5,44	4,39	4,93	5,97	4,47	1,23
15.Ratte	5,0	3,64	4,86	2,94	4,93	4,87	5,88	4,52	1,05
16.Ratte	4,1	3,63	5,77	4,16	4,67	4,15	4,39	4,46	0,73

6.3. Daten IC50-Werte der P-gp Hemmung

Die Daten wurden nach dem gleichen Schema wie in Kapitel 6.1. und 6.2. für das Jejunum und Ileum ermittelt (Modellsubstanzen: Talinolol (R, S) und Saquinavir; Inhibitoren: Ritonavir und **2** (H17)). Modellsubstanz: Talinolol (R, S) und Saquinavir; Segment: Ileum und Jejunum (13-18. Ratte).

Ileum								
c Ritonavir [μM]								
	0	15	30	45	60	75	90	IC50\pmSEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]							
R-Talinolol+Ritonavir	3,10	3,00	3,31	4,59	6,17	6,6	6,67	37,05 \pm 0,97
S-Talinolol+Ritonavir	3,10	3,41	3,62	5,57	6,28	6,37	6,43	39,69 \pm 1,19
Saquinavir+Ritonavir	3,59	3,64	3,91	5,04	6,82	7,5	7,8	50,17 \pm 0,92
c 2 (H17) [μM]								
	0	15	20	25	30	35	40	IC50\pmSEM
R-Talinolol+H17	3,10	3,12	3,45	4,29	4,61	4,88	5,00	23,66 \pm 0,09
S-Talinolol+H17	3,10	3,12	3,45	4,29	4,61	4,88	5,00	23,66 \pm 0,25
Saquinavir+H17	3,22	3,3	3,45	3,48	3,55	5,29	7,8	35,86 \pm 0,96
Jejunum								
c Ritonavir [μM]								
	0	15	30	45	60	75	90	IC50\pmSEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]							
R-Talinolol+Ritonavir	2,98	3,46	3,44	5,27	5,4	5,41	5,65	35,11 \pm 0,93
S-Talinolol+Ritonavir	3,56	3,25	4,57	6,7	7,5	7,86	7,89	37,32 \pm 1,26
Saquinavir+Ritonavir	3,88	3,92	4,14	5,33	6,73	7,8	8,02	51,99 \pm 1,04
c 2 (H17) [μM]								
	0	15	20	25	30	35	40	IC50\pmSEM
R-Talinolol+H17	2,98	3,09	3,46	4,85	5,71	5,79	5,99	23,84 \pm 0,09
S-Talinolol+H17	3,67	3,75	4,24	5,95	6,5	6,7	6,99	23,16 \pm 0,19
Saquinavir+H17	4,64	4,93	5,01	6,08	8,66	9,08	9,28	26,60 \pm 0,18

7. Daten in situ Perfusionstudien – MRP Modulierung

7.1. Modellsubstanz Indometacin

Das Studiendesign entspricht dem aus Kapitel 6.2. Als Inhibitor wurde H17 eingesetzt. Positivkontrolle war Probenecid. Pro Ratte wurden die sechs erhaltenen Perfusatproben zu dem angegebenen Wert gemittelt.

Kolon						
Indometacin	19	20	21	22	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]					
	1,77	1,81	1,75	1,79	1,78	0,03
Indometacin+H17	19	20	21	22	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]					
	2,48	2,39	2,45	2,41	2,43	0,04
Indom.+Probenecid	19	20	21	22	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]					
	2,75	2,69	2,77	2,72	2,73	0,04
Ileum						
Indometacin	19	20	21	22	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]					
	1,86	1,91	1,79	1,80	1,84	0,06
Indometacin+H17	19	20	21	22	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]					
	2,80	2,71	2,76	2,75	2,76	0,04
Indom.+Probenecid	19	20	21	22	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]					
	2,99	2,88	2,85	2,95	2,92	0,06
Jejunum						
Indometacin	19	20	21	22	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]					
	1,26	1,35	1,33	1,31	1,31	0,04
Indometacin+H17	19	20	21	22	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]					
	1,96	2,01	2,11	1,99	2,02	0,07
Indom.+Probenecid	19	20	21	22	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]					
	2,13	2,32	2,26	2,17	2,22	0,09

8. Daten in situ Perfusionsstudie – Substrateigenschaften H17 (Substanz 2)

8.1. Modellsubstanz H17

Die Auswertungen entsprachen dem in Kapitel 6.2. dargestellten Schema. Für die Koperfusion von H17 mit Vinblastin wurden n=2 Ratten verwendet und für die Koperfusion von H17 mit Indometacin n=3 Ratten. Pro Ratte wurden die sechs erhaltenen Perfusatproben zu dem angegebenen Wert gemittelt.

Kolon					
H17	22	23	24	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]				
	2,18	2,05	1,92	2,05	0,13
H17+Indometacin	22	23	24	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]				
	2,69	2,30	2,63	2,54	0,21
H17+Vinblastin	22	23	24	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]				
	2,44	2,11	-	2,27	0,23
Ileum					
H17	22	23	24	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]				
	2,31	2,76	2,12	2,40	0,33
H17+Indometacin	22	23	24	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]				
	2,65	3,09	2,41	2,72	0,35
H17+Vinblastin	22	23	24	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]				
	3,21	2,82	-	3,02	0,28
Jejunum					
H17	22	23	24	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]				
	2,05	2,44	2,59	2,36	0,28
H17+Indometacin	22	23	24	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]				
	2,50	2,77	2,79	2,69	0,16
H17+Vinblastin	19	20	21	MW	SEM
	P_{eff} [10^{-4} cm/s]				
	2,73	2,73	-	2,73	0,00

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus ihnen wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen Universität oder Hochschule weder im In- noch im Ausland zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Halle, 25.05.2005

Martin Richter

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname:	Martin Richter
Geburtstag:	23.09.1975
Geburtsort:	Halle
Wohnort:	Halle
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern: Vater:	Prof. Heinrich Richter
Mutter:	Sieglinde Richter (geb. Lohmann)

Schulbildung:

1982 - 1990	Polytechnische Oberschule Göthe in Halle
1990 - 1992	Thomas-Müntzer-Gymnasium in Halle
1992 - 1993	La Porte High School in Houston (Texas) USA
1993 - 1995	Thomas-Müntzer-Gymnasium in Halle
	Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Studium:

1996 - 2000	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität in Halle
September 1998	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
September 2000	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
02.01.2002	Abschluss: Erteilung der Approbation als Apotheker
seit 2002	Studium der Philosophie an der Martin-Luther-Universität in Halle

Lebenslauf

Berufstätigkeit:

- 2000 - 2001 Pharmazie-Praktikant in der Salza-Apotheke in
Salzmünde
- Mai 2001 – Juni 2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der
Martin-Luther-Universität in Halle
- März 2003 – Juni 2003 Forschungsaufenthalt an der Universität in Szeged,
Medizinische Fakultät, Institut für Mikrobiologie,
Gefördert von der EU und dem BMBF
- August 2004 – September 2004 Forschungsaufenthalt an der Universität in Szeged,
Medizinische Fakultät, Institut für Mikrobiologie,
Gefördert von der EU und dem BMBF
- September 2001 – Februar 2005 Honorarlehrer für Arzneimittellehre an der Europaschule
(ESO – Euro-Schulen-Organisation) in Halle

Wehrdienst:

Oktober 1995 - September 1996 Bundeswehr

Halle, 25.05.2005

Martin Richter

Präsentationen

Publikationen

Pharmaceutical Research 21 (10) 1864-1868 (2004)

“COMPARATIVE EFFECTS ON INTESTINAL ABSORPTION IN SITU BY P-GP-MODIFYING HIV-PROTEASE-INHIBITORS”

Richter, M.; Gyémánt, N.; Molnár, J.; Hilgeroth, A.

Chembiochem in print release (2005)

“FIRST INSIGHT IN SYMMETRY AND FLEXIBILITY OF MEMBRANE EFFLUX PUMP P-GLYCOPROTEIN BY NOVEL BIFUNCTIONAL MODULATORS”.

Wollmann, J.; Richter, M.; Molnár, J.; Hilgeroth, A.

Vorträge

Annual meeting of the German Pharmaceutical Society Wuerzburg 2003-Germany (DPhG-Tagung Würzburg 2003): **“BIOANALYTIC EVALUATION OF HIV-PROTEASE-INHIBITORS AS P-GLYCOPROTEIN-MODULATORS“**

Richter, M.; Hilgeroth, A.

Annual meeting of the German Pharmaceutical Society Regensburg 2004-Germany (DPhG-Tagung Regensburg 2004): **“BIOANALYSIS OF MULTIDRUG RESISTANCE MODIFYING HIV PROTEASE INHIBITORS: *IN SITU*- AND *IN VITRO* STUDIES”.**

Richter, M.; Hilgeroth, A.

Poster

Annual meeting of the German Pharmaceutical Society Regensburg 2004-Germany (DPhG-Tagung Regensburg 2004): “**TRANSPORTER SPECIFITIES OF HIV-PROTEASE INHIBITOR DMP 323: *IN SITU*- AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION.**”

Eisenschmidt, A.; Richter, M.; Gyémánt, N.; Molnár, J.; Hilgeroth, A.
