



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Präklinische Untersuchungen mit dem Tyrosin-Kinase-Hemmer Selumetinib“

verfasst von

Nora M'Vila

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie UniStG

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

Eidesstattliche Erklärung

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

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

Danksagung

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

Ich bedanke mich an dieser Stelle herzlich bei a.o. Univ.Prof. Mag. Dr. Martin Czejka für die Bereitstellung des Themas, seine Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragen, aber auch für das angenehme Arbeitsklima, für das er immer gesorgt hat.

Ebenso möchte ich mich bei Mag.pharm. Marie Kitzmüller für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Ein besonders großes Dankeschön gebührt meiner Familie, allen voran meinem Lebensgefährten Arjan Geven, der mich immer auf jede ihm nur mögliche Art unterstützt und mir dieses Studium damit überhaupt ermöglicht hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinen Freundinnen bedanken, insbesondere bei Monika Hlavka und Sabine Kalchgruber, die mir wichtige und treue Wegbegleiterinnen waren, und mich im Studium immer unterstützt und motiviert haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1 Theoretischer Teil.....	1
1.1 Thematik	1
1.1.1 Lungenkrebs	1
1.1.2 Schilddrüsenkrebs.....	1
1.1.3 Aderhautmelanom.....	2
1.2 Tyrosin-Kinasen	2
1.3 Tyrosin-Kinasen-Hemmer.....	2
1.4 Strukturformel und Eigenschaften von Selumetinib	3
1.5 Gewebeverteilung und Wiederfindung von Selumetinib.....	4
1.5.1 Die Aufnahmefähigkeit von Selumetinib beeinflussende Faktoren.....	4
1.6 Untersuchte Gewebe.....	5
1.6.1 Leber.....	5
1.6.2 Lunge.....	5
1.6.3 Herz	5
1.6.4 Hirn	6
1.6.5 Milz	6
1.6.6 Niere	6
1.6.7 Schwarte	6
1.7 Plasmaproteinbindung.....	7
1.8 Mikrosomale Bindung.....	7
1.9 UV-Vis-Spektroskopie	7
1.10 Hepatozyten.....	8
2 Rationale	9
3 Experimenteller Teil.....	10
3.1 Für die Probenaufbereitungen verwendete Chemikalien	10
3.2 Gewebeproben aus diversen Organen	11
3.3 Geräte und Materialien.....	11
3.3.1 Geräte und Materialien zur Herstellung des Eluenten.....	11

3.3.2	Geräte und Materialien für die Probenherstellung	12
3.4	HPLC-Anlage	13
3.5	Verwendete Software	14
3.6	Probenvorbereitung.....	14
3.6.1	Herstellung der Eluenten.....	14
3.6.2	Vorbereitung der Selumetinib- und der Docetaxel-Stammlösung.....	15
3.7	Durchführung	16
3.7.1	UV-Spektren	16
3.7.2	Chromatogramme	17
3.7.3	Transil Kits für mikrosomale Bindung und Plasmaproteinbindung	18
3.7.4	Gewebeverteilung	21
3.7.5	Wiederfindung.....	26
3.7.6	Hepatozyten.....	30
4	Auswertung und Ergebnisse.....	34
4.1	UV-Spektren.....	34
4.2	Chromatogramme	35
4.3	Transil Kits für mikrosomale Bindung und Plasmaproteinbindung	41
4.3.1	Mikrosomale Bindung.....	42
4.3.2	Plasmaproteinbindung.....	43
4.4	Gewebeverteilung	44
4.4.1	Peakfläche Herz zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten	44
4.4.2	Peakfläche Hirn zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten	45
4.4.3	Peakfläche Leber zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten	46
4.4.4	Peakfläche Lunge zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten.....	47
4.4.5	Peakfläche Milz zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten	48
4.4.6	Peakfläche Niere zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten	49
4.4.7	Peakfläche Schwarze zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten.....	50
4.5	Wiederfindung	51
4.5.1	Selumetinib in ACN	51
4.5.2	Selumetinib in PBS	53

4.5.3	Selumetinib und Docetaxel 10 µg.....	54
4.5.4	Selumetinib und Docetaxel 20 µg.....	56
4.5.5	Selumetinib und Docetaxel 10 µg nach 24 Stunden	58
4.5.6	Selumetinib und Docetaxel 20 µg nach 24 Stunden	61
4.6	Hepatozyten	63
5	Zusammenfassung.....	69
6	Summary.....	71
7	Conclusio	73
8	Literaturverzeichnis	74
9	Abbildungsverzeichnis.....	77
10	Tabellenverzeichnis	79
11.	Abkürzungsverzeichnis.....	80
12.	Curriculum Vitae	81

1 Theoretischer Teil

In den letzten Jahren haben sich Krebserkrankungen zu einer der führendsten Todesursachen in industrialisierten Ländern entwickelt. Es gibt dabei verschiedene Möglichkeiten (Prävention, (Früh-)Diagnostik, Therapie) gegen Krebs vorzugehen. Ein neuerer Ansatz ist es unter anderen, Inhibitoren der Protein-Tyrosin-Kinasen zu verabreichen. [1]

1.1 Thematik

In dieser Diplomarbeit geht es um verschiedene präklinische Untersuchungen mit dem Tyrosin-Kinase-Hemmer Selumetinib, die insbesondere die Verteilung des Wirkstoffes im Gewebe sowie die Aufnahme im Gewebe betreffen. Des Weiteren wurden Versuche durchgeführt, welche die Plasmaproteinbindung, die mikrosomale Bindung, den Metabolismus sowie die Identitätssicherung betreffen. Selumetinib ist ein Zytostatika, das sich derzeit in der klinischen Phase befindet und gegen verschiedene Krebsformen getestet wird und wurde. So zeigt es gegen nicht-kleinzeliges Lungenkarzinom (NSCLC) gute Erfolge, aber auch gegen Ovarial- und Schilddrüsenkrebs sowie Aderhautmelanom (malignes uveales Melanom, ein maligner Tumor des Auges). [2] [3] [4]

1.1.1 *Lungenkrebs*

Bei Lungenkrebs kommt es zu einer Wucherung im Bereich der Lunge bzw. der Bronchien. Es handelt sich neben Brustkrebs, Darmkrebs und Prostatakrebs um eine der häufigsten Krebserkrankungen. Man unterscheidet zwei Arten des Lungenkrebses, das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom und das kleinzellige Lungenkarzinom, wobei das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom für den Großteil der Krebserkrankungen der Lunge verantwortlich ist. Selumetinib wurde in klinischen Studien unter anderem zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms eingesetzt. [5] [6] [7]

1.1.2 *Schilddrüsenkrebs*

Auch in der Behandlung von Menschen mit Radiojod-refraktärem, metastasiertem Schilddrüsenkarzinom, zeigte Selumetinib Erfolge. So war durch die Therapie mit Selumetinib eine erneute Aufnahme von radioaktivem Jod-124 möglich, wodurch eine weitere, zum Teil erfolgreiche Behandlung des Schilddrüsenkrebs durchgeführt werden konnte. [8]

1.1.3 Aderhautmelanom

Selumetinib scheint auch das Potential zu haben, die Prognose von Menschen, die an der Erkrankung des metastasierten uvealen Melanoms leiden, zu verlängern. Dies liegt daran dass MEK, welches ein Schlüsselenzym des Stoffwechsels ist und zum Ausbruch der malignen Krebserkrankung mit kurzer Überlebenszeit der Patienten führt, durch Selumetinib gehemmt wird. [9]

1.2 Tyrosin-Kinasen

Tyrosin-Kinasen gehören zu den Protein-Kinasen und sind Enzyme, die mit Hilfe entsprechender Liganden zu Phosphorylierung von Tyrosin-Resten von Proteinen führen. Es sind Transmembranproteine mit enzymgekoppelten Rezeptoren, die auf ihrer zytosolischen Seite ein katalytisches Zentrum haben.

Das Ras Protein (der Name röhrt daher, dass jenes Protein erstmals beim Ratten-Sarkom-Virus gefunden wurde) wird von vielen enzymgekoppelten Rezeptoren aktiviert. Ist die Kaskade von Signalen einmal in Gang gesetzt, so trifft diese zunächst auf die Kinase MEK, welche Tyrosin-Reste und Threonin-Reste phosphoryliert. In Folge werden so MAP-Kinasen an je einem Tyrosin- und einem Threonin-Rest phosphoryliert.

In weiterer Folge kommt es zu Zellproliferation sowie Geweberegeneration oder auch Hemmung der Apoptose. Bei der Entwicklung bösartiger Tumore spielen Tyrosin-Kinasen oft eine entscheidende Rolle. So kann es passieren, dass es bei einer Trankslokation zur Fusion einer Tyrosin-Kinase mit einem Brückenprotein kommt, die Folge ist eine dauerhafte Aktivierung und Wucherung. Mutierte Tyrosin-Kinase-Rezeptoren können so dauerhaft und ligandenunabhängig aktiviert werden.

Tyrosin-Kinasen können aber auch durch Überexpression, beispielsweise durch Genamplifikation, aktiviert werden. Dies spielt für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) eine große Rolle.

Weiters werden Tyrosin-Kinasen manchmal durch die jeweiligen in Tumorzellen oder umliegenden Gewebe überexprimierten Liganden, vermehrt aktiviert. [1] [10]

1.3 Tyrosin-Kinasen-Hemmer

Eine Möglichkeit der Behandlung von verschiedenen Arten von Krebs ist es, Tyrosin-Kinase-Hemmer zu verabreichen und so die unkontrollierte Proliferation zu unterbrechen. Was Tyrosin-Kinase-Hemmer im Speziellen betrifft, so gibt es die folgenden Hemmungsmechanismen:

- Monoklonale Antikörper: Diese sind gegen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, also gegen die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle, gerichtet. Dadurch verhindern sie die Bindung des Liganden an den entsprechenden Rezeptor.
- Spezifische Inhibitoren: Der Prototyp der spezifischen inhibitorischen Substanzen, ist das Medikament Imatinib, das mit hoher Spezifität in der ATP-Bindungsstelle der Tyrosin-Kinase abl sowie der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit und PDGFR β bindet. [11]

1.4 Strukturformel und Eigenschaften von Selumetinib

Die Strukturformel von Selumetinib sieht folgendermaßen aus:



Abbildung 1: Strukturformel Selumetinib

Weitere wichtige Eigenschaften von Selumetinib sind:

- Molgewicht: 457.685
- Synonym: AZD6244
- Löslichkeit:
 - DMSO: >92mg/ml
 - Wasser: <1mg/ml
 - Ethanol: <1mg/ml
- Eigenschaften: Selumetinib ist ein eng-bindender, selektiver, nicht ATP-kompetitiver Tyrosin-Kinase-Inhibitor, eine sehr lipophile Substanz.
- Pharmakokinetik: Selumetinib wird vom Körper relativ schnell resorbiert und erreicht nach etwa eineinhalb Stunden die maximale Plasmakonzentration.
- Halbwertszeit: 5 – 8 Stunden

[12] [13] [14]

1.5 Gewebeverteilung und Wiederfindung von Selumetinib

Nachdem Selumetinib resorbiert wurde, verteilt sich der Arzneistoff rasch in den entsprechenden Kompartimenten (verschiedene Gewebe und Plasma). Es ist wichtig einen möglichst hohen Anteil an freiem Wirkstoff zu haben (dieser befindet sich sowohl im Plasma, als auch der interstitiellen Flüssigkeit), denn nur dieser kann an diverse Zielmoleküle, wie Proteine oder Enzyme bzw. diverse Rezeptoren binden und damit zu einer Wirkung führen, welche im besten Falle den Krebs besiegt.

Inwieweit sich der Arzneistoff in bestimmten Organen verteilt, also bindet, ist wichtig zu erfahren, da ein großer gewebegebundener Arzneistoff unter anderem auch als Reservoir dienen und so die Wirkung verlängern kann. [15] [16]

Es ist wichtig, dass der Arzneistoff schnell ins Gewebe gelangen kann. Faktoren für die Gewebegängigkeit eines Arzneistoffes sind:

- Größe des Arzneistoffmoleküls
- Affinität des Arzneistoffmoleküls zu wässrigem oder lipophilem Gewebe
- pH-Wert
- Proteinbindung
- Systemische Zirkulation
- Gewebepermeabilität
- Weitere Faktoren wie Krankheiten, Einnahme anderer Medikamente etc.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Gewebeverteilung zu bestimmen. Man kann *in vitro* anhand isolierter Organe durchführen, mit Teilen von Geweben, Homogenisaten sowie isolierten subzellulären Partikeln.

Da es von grundlegender Bedeutung ist, ob Selumetinib von den verschiedenen Gewebearten überhaupt aufgenommen wird und inwieweit das der Fall ist, wurde eine Versuchsreihe zur Wiederfindung von Selumetinib durchgeführt. Anhand der Konzentration, die sich am Schluss noch mittels HPLC ermitteln ließ, konnten Rückschlüsse gezogen werden, wieviel Selumetinib ins Gewebe gelangt ist. [15] [16] [17]

1.5.1 Die Aufnahmefähigkeit von Selumetinib beeinflussende Faktoren

Verschiedene Faktoren beeinflussen, wie viel Wirkstoff vom Organismus aufgenommen wird. So hat es beispielsweise einen Einfluss, ob man vor der Verabreichung von Selumetinib Nahrung zu sich genommen hat oder nicht. Es stellte sich heraus, dass Selumetinib wesentlich wirksamer ist, wenn es auf leeren Magen verabreicht wird. [14]

Aber auch die Kombination von Selumetinib mit einem anderen Zytostatika hat Einfluss auf die Wirksamkeit. So zeigte sich, dass das Zytostatika Docetaxel in Kombination mit Selumetinib den Lungenkrebs erfolgreicher bekämpfen kann, wie wenn es alleine verabreicht wird. [7]

1.6 Untersuchte Gewebe

Im Folgenden wurden einige isolierte Organe von verschiedenen Tieren (Schwein, Rind, Huhn) untersucht und zwar Herz, Hirn, Leber, Lunge, Milz, Niere und Schwarte. Das Ausmaß der Gewebebindung ist aufgrund der hydrophilen und lipophilen Eigenschaften unterschiedlich, so nimmt die Gewebebindung beispielsweise von der Leber über die Niere über die Lunge über den Muskel stetig ab. [18]

1.6.1 Leber

Die Leber stellt das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers dar, zudem ist sie die größte Drüse des Körpers, so sezerniert die Leber einen Gutteil der von ihr synthetisierten Proteine. Sie besteht aus einem großen rechten sowie einem kleinen linken Lederlappen. Das Leberparenchym setzt sich aus Lederläppchen zusammen, welche wiederum aus Hepatozyten bestehen. Für die Aufrechterhaltung der Leberfunktion ist der Blutfluss von großer Bedeutung. Die Leber ist für den Stoffwechsel zuständig, so auch für den Arzneistoffmetabolismus. [19]

1.6.2 Lunge

Die rechte Lunge besteht beim Menschen aus drei Lappen, während die linke aus nur zwei besteht, diese unterteilen sich wiederum in verschiedene Segmente. Hier finden sich auch die Bronchien und Lymphgefäße. Die Oberfläche ist von Lungenfell bedeckt. Die Lunge enthält zwei Gefäßsysteme, deren Endäste sich in den Wänden der Lungenbläschen befinden. Während das eine Gefäßsystem dem Gasaustausch des Blutes dient, dient das andere der Versorgung des Lungengewebes selbst. [19]

1.6.3 Herz

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan in Form eines abgerundeten Kegels. Beim Menschen hat es ungefähr die Größe einer Faust der betreffenden Person. Das Herz pumpt das Blut durch den Körperkreislauf. Die Herzmuskelfasern bestehen aus einzelnen Kardiomyozyten, verlaufen schraubig um das Herz und bilden zwei bis drei Schichten. Das Herz ist der Motor

des Menschen und muss viel Arbeit verrichten. Daher enthält es viel ATP und zahlreiche Proteine. Aus diesem Grund ist beim Herz oft eine hohe Gewebebindung festzustellen. [20] [21]

1.6.4 *Hirn*

Das Gehirn bzw. Hirn ist ein sehr komplexes Organ und stellt einen Teil des zentralen Nervensystems dar. Es besteht aus etwa 100 Milliarden Neuronen.

Die Blut-Hirnschranke ist ein spezieller Schutz für die sehr empfindlichen Nervenzellen im Gehirn. Daher sind die Kapillaren im Hirn durch ihren besonderen Aufbau für hydrophile Stoffe fast undurchdringbar. [10]

1.6.5 *Milz*

Die Milz ist ein lymphatisches Organ, welches der Immunabwehr sowie der Filterung des Blutes dient.

In der Milz werden sehr viele Lymphozyten und Plasmazellen gebildet. Herrscht ein Überangebot von Hämoglobineisen, so wird dieses in der Milz gespeichert. [19] [21]

1.6.6 *Niere*

Die Niere ist an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, am wichtigsten ist dabei die Bildung des Harns durch Filtration, Reabsorption und Konzentration. Sie reguliert den Wasser- und Elektrolythaushalt sowie das Säure-Basen-Gleichgewicht. Die Niere besteht aus Rinde und Mark und ist bohnenförmig. Viele Arzneistoffe werden renal eliminiert, hier spielt die Gewebebindung ans Nierengewebe dann eine wichtige Rolle. [16] [21]

1.6.7 *Schwarte*

Als Schwarte wird die Haut von Schweinen bezeichnet oder allgemein die dicke zähe Haut mancher Säugetiere. Schwarte enthält viel Kollagen im Bindegewebe und ist dadurch sehr zäh. Erst bei längerem Erhitzen werden aus den langkettigen Kollagenverbindungen kurze wasserlösliche Eiweißverbindungen und zwar Gelatine. [22] [23]



Abbildung 2: Schwarze und Sezierbesteck

1.7 Plasmaproteinbindung

Hier wurde die Bindung von Selumetinib an Proteine im Blutplasma untersucht. Es war wichtig zu erfahren, wie hoch der Anteil gebundenen Arzneistoffes ist, da er dadurch nicht mehr aktiv wirken kann, denn nur der freie Anteil verteilt sich im Gewebe. Durch die Ergebnisse kann man die Frage, welche Menge Selumetinib-Lösung man verabreichen sollte, besser beantworten. Dabei spielt die Plasmakonzentration eine wichtige Rolle, denn die Plasmaproteinbindung ist reversibel. Jedoch ist die Plasmaproteinbindung auch davon abhängig, wie gut der Arzneistoff im Gewebe bindet, denn manchmal ist die Affinität eines Arzneistoffes für das Gewebe höher, als für die Plasmaproteine. [1] [6] [24]

1.8 Mikrosomale Bindung

Auch die Affinität von Selumetinib zur mikrosomalen Membran galt es herauszufinden. Genau wie die Plasmaproteine, können auch Mikrosomen die Konzentration an freiem Arzneistoff verringern. Dies geschieht durch CYP-Enzyme. Ist der Tyrosin-Kinase-Hemmer hier gebunden, steht er dem Zielgewebe nicht mehr zur Verfügung und kann auch keine inhibitorische Tätigkeit die Enzyme betreffend, mehr ausüben. [25]

1.9 UV-Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektroskopie stellt einen Teilbereich der Elektronenspektroskopie dar. Hierbei geht es um, durch elektromagnetische Strahlung verursachte, Übergänge von Molekülen bzw. Atomen beziehungsweise um die Absorption von ultraviolettem Licht sowie sichtbarem Licht. Damit können Moleküle sehr genau und spezifisch charakterisiert und identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde ein UV-Vis-Spektrum durchgeführt, um in Folge das HPLC-Gerät auf die richtige Wellenlänge einzustellen zu können. [26]

1.10 Hepatozyten

Anhand von Hepatozyten wurden Untersuchungen, welchen den Metabolismus von Selumetinib betreffen, durchgeführt. Hepatozyten sind parenchymale Leberepithelzellen, die für den Metabolismus wesentlich sind, so sind sie auch für die Entgiftung zuständig. Sie enthalten zahlreiche Enzyme und müssen für Untersuchungen rasch isoliert werden, da es nur wenige Stunden dauert, bis sie zu Grunde gehen. Länger haltbar gemacht werden können sie, indem man sie bei -196 ° C mit flüssigem Stickstoff tiefkühlt und sie bei Bedarf wieder auftaut. [19] [21]

2 Rationale

Selumetinib ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Tyrosin-Kinase-Hemmer, der erst seit wenigen Jahren erforscht wird, in der Hoffnung einen neuen erfolgreichen Arzneistoff gegen verschiedene Arten von Krebs zu etablieren, wie beispielsweise dem nicht-kleinzeligen Lungenkarzinom.

Sind die Ergebnisse auch vielversprechend, so befindet sich der Wirkstoff Selumetinib noch in der klinischen Phase, das heißt es gibt noch einige offene Fragen, die erst geklärt und erforscht werden müssen, bevor der Arzneistoff, sollte er den Ansprüchen genügen, zur Zulassung gelangt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit verschiedensten Fragen zum Tyrosin-Kinase-Hemmer Selumetinib und versucht einige davon an Hand verschiedener Versuche zu beantworten.

Zu Beginn wurden UV-Spektren der Substanz aufgenommen, mit dem Ziel, die Substanz Selumetinib mit Hilfe elektronenabsorptions-spektroskopischer Methoden möglichst genau zu charakterisieren und in Folge die idealen Einstellung am mit dem HPLC-Gerät verbundenen Computer einzugeben.

Weiters wurde die Gewebeverteilung durchleuchtet, also inwieweit Selumetinib in verschiedenen Organen (Herz, Hirn, Leber, Lunge, Milz, Niere, Schwarze) bindet. Außerdem wurden Versuche die Wiederfindung betreffend, durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, wie viel Prozent der Substanz von den entsprechenden Organen aufgenommen wurde (hierbei wurde auch untersucht, ob mit einem weiteren Zytostatika in Kombination bzw. wenn man 24 Stunden wartet, die Aufnahme erhöht werden kann oder nicht).

Zudem wurden Hepatozyten-Versuche durchgeführt um mehr über den Metabolismus der Substanz Selumetinib zu erfahren.

Schließlich wurden Versuche durchgeführt, um das Ausmaß der Plasmaproteinbindung sowie der mikrosomalen Bindung von Selumetinib festzustellen.

Bis auf die UV-Spektren wurden alle Versuche mittels der selektiven und empfindlichen HPLC-Methode (high-performance liquid chromatography) durchgeführt.

3 Experimenteller Teil

3.1 Für die Probenaufbereitungen verwendete Chemikalien

Im Folgenden sind die für die verschiedenen Probenaufbereitungen benötigten Chemikalien aufgelistet:

Tabelle 1: Für die Probenaufbereitungen notwendige Chemikalien

Name der Chemikalie/n	Herstellungs firma bzw. Zulassungsinhaber
ACN (Acetonitril)	Merck KG
Alkohol 70%	
Aqua destillata	Department Pharmakognosie Universität Wien
Cell-Maintenance Cocktail-B	Invitrogen – Life Technologies, USA
Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium	Invitrogen – Life Technologies, USA
Dexamethason	Invitrogen – Life Technologies, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid) > 99,9%, D4540	Sigma-Aldrich
Docetaxel (800 µl/ml) (800 µl Docetaxel und 1000 µl PBS)	Sanofi-Aventis (Suisse) SA
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich
Sealife Compounds Wasser/Essigsäure (Verhältnis 1998/2)	Hergestellt an der Universität Wien aus Bestandteilen der Merck-KG
Sealife Compounds Acetonitril/Essigsäure (Verhältnis 1998/2)	Hergestellt an der Universität Wien aus Bestandteilen der Merck-KG
Selumetinib (1 mg/ml) (1 mg Selumetinib, 320 µl DMSO 100% und 680 µl destilliertes Wasser)	AstraZeneca Global

Trypanblau 0,4%, T8154	Sigma-Aldrich
Williams Medium E	Invitrogen – Life Technologies, USA

3.2 Gewebeproben aus diversen Organen

Tabelle 2: Für die Probenaufbereitungen benötigte Organe

Organ	Hersteller
Herz vom Huhn	Lebensmittelhandel
Hirn vom Schwein	Metzgerei
Leber vom Kalb	Lebensmittelhandel
Lunge vom Rind	Metzgerei
Milz vom Rind	Lebensmittelhandel
Niere vom Schwein	Lebensmittelhandel
Schwarze vom Schwein	Lebensmittelhandel

3.3 Geräte und Materialien

3.3.1 Geräte und Materialien zur Herstellung des Eluenten

Die Eluenten wurden bereits in Tabelle 1 (Sealife Compounds) aufgelistet. Mit Hilfe welcher Geräte sie hergestellt wurden, sei in der folgenden Tabelle erläutert:

Tabelle 3: Geräte und Materialien zur Herstellung des Eluenten

Gerät	Produktinformation	Hersteller
Magnetrührer	MR 300 1 K	Heidolph Instruments
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Typ: RK 510	Bandolin electronic
Parafilm	Laboratory Film „M“	Bemis Company

3.3.2 Geräte und Materialien für die Probenherstellung

Tabelle 4: Geräte und Materialien für die Probenherstellung

Gerät bzw. Material	Produktinformation	Hersteller
Automatische Pipette		Hirschmann Laborgeräte
Cap	Deckel für HPLC-Fläschchen	Micronic
Decapper		Micronic
Deckglas	18 x 18 mm	
Einweg-Handschuhe	Class 1, AQL 1,5	Merck VWR International
Eppendorf-Gefäße	Micro Tubes, Plastibrand, 1,5 ml	Brand GmbH
Eppendorf-Pipetten	2-20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl	Research Plus
Eprouvetten	Durchmesser: 16 mm	Assistent
Gewebehomogenisator	Minilys	Bertin Technologies
Heizplatte	Techne DRI-Block DB 2A	Techne (Cambridge)
Hepatozyten von Ratten		Invitrogen – Life Technologies, USA
HPLC-Fläschchen		Biolab
Inkubator		Heraeus Instruments
Küchenrolle		
Kühlschrank		
Lysing Kits (Homogenisierungsröhrchen)	CK 28R (Keramik-Kugeln, Durchmesser 2,8 mm, verstärkte Gefäße)	Bertin Technologies
Lysing Kits (Homogenisierungsröhrchen)	CK 14 (Kermamik-Kugeln, Durchmesser: 1,4 mm)	Bertin Technologies
Lysing Kits (Homogenisierungsröhrchen)	MK 28 (Metall-Kugeln aus Stahl, Durchmesser: 2,8 mm)	Bertin Technologies
Mikroeinsätze		Biolab - Chromacol
Mikroskop	Nikon Eclipse Te2000-S	Nikon GmbH
Mini-Shaker Vortexmixscher	Vortex wizard continuous- sensor	Velp scientifica
Pasteurpipette aus Glas	150 mm Länge	Merck VWR International
Pipettensauber		

Pipettenspitzen	Universal blue tipps, 50 – 1000 µl	Merck VWR International
Pipettenspitzen	Universal yellow tipps, 2 – 200 µl	Merck VWR International
Plate Shaker	Mix Mate PCB-11	Eppendorf
Septum für HPLC-Fäschchen		Biolab – Chromacol
Sezierbesteck		Labor Siebert
Tiefkühlschrank	UF755G	Dometic
Transil XL Microsomal Binding Kit		Sovicell
Transil XL PPB Binding Kit		Sovicell
UV-Vis-Spektrometer	UV-1800	Shimadzu
Waage	Sartorius H110	Sartorius Mechatronics
Wasserbad	Transonic Digital	Elma Schmidbauer GmbH
Zählkammer	Neubauer	Assistant Deutschland
Zentrifuge für Eppendorf- Gefäße und Homogenisierungsröhrchen	Galaxy 16 DH	Merck VWR International
Zentrifuge für Transil Kits	Laborfuge 400 Function Line	Heraeus Instruments
12-Well-plate, Multiwell		Merck VWR International

3.4 HPLC-Anlage

Für die Analyse der vorbereiteten Proben wurde ein HPLC-Gerät der Firma VWR HITACHI verwendet. Im Speziellen handelte es sich um das HPLC-System 4, Zarbax, TKI. Die Gradienten für Selumetinib waren zum einen Wasser/Essigsäure im Verhältnis 1998/2, zum anderen Acetonitril/Essigsäure im Verhältnis 1998/2.

Im der folgenden Tabelle sind einige wichtige Parameter aufgelistet:

Tabelle 5: Wichtige Bestandteile der HPLC-Anlage

Teil des Geräts	Parameter
Autosampler	Chromaster 5210
Pumpe	Chromaster 5110
Säulenofen	Chromaster 5310, Model 892 0304
Temperatur der Säule	36 +/- 1°C
UV-Detektor	Chromaster 5410

Die Substanzen wurden mittels Umkehrphasenchromatographie (reversed phase chromatographie) analysiert. Anschließend wurden die von mit dem HPLC-System verbunden Computer graphisch dargestellten Peaks begutachtet, im Speziellen die Area under the curve des jeweiligen Peaks.



Abbildung 3: HPLC-Anlage

3.5 Verwendete Software

Folgende Software wurde bei der Durchführung und Auswertung verwendet:

- Microsoft Office Excel: Zur Berechnung von statistischen Daten
- GraphPad Prism 6: Zur Erstellung von Graphiken und Tabellen
- Microsoft Office Word: Zur Bearbeitung und Niederschrift
- Shimadzu recording spectrophotometer, UV-1800, Version 2.31

3.6 Probenvorbereitung

Sowohl die Eluenten als auch die Wirkstoff-Lösungen selbst bedürfen einer Aufbereitung, die hier kurz erläutert werden soll.

3.6.1 Herstellung der Eluenten

Die für diese HPLC-Analyse notwendigen Eluenten setzen sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Eluent 1: 1998 Teile Wasser und zwei Teile Essigsäure (also für 2 Liter 1998 ml Wasser und 2 ml Essigsäure)
- Eluent 2: 1998 Teile Acetonitril und 2 Teile Essigsäure (also für 2 Liter 1998 ml Acetonitril und 2 ml Essigsäure)

Nachdem diese beiden Flüssigkeiten jeweils zusammengeschüttet worden waren, wurden sie mit dem Magnetrührer einige Minuten lang gut durchmischt, anschließend die Gefäße mit einem Parafilm verschlossen und etwa eine halbe Stunde lang ins Ultraschallbad gestellt zwecks Entgasung.



Abbildung 4: Ultraschallbad



Abbildung 5: Eluenten

3.6.2 Vorbereitung der Selumetinib- und der Docetaxel-Stammlösung

Die Wirkstoffe Selumetinib und Docetaxel wurden zu Beginn genau eingewogen und jeweils eine Stammlösung hergestellt. Selumetinib im Verhältnis 1 mg/ml in DMSO, also 1 mg Selumetinib, 320 µl DMSO 100% und 680 µl destilliertes Wasser . Docetaxel wurde in PBS aufgelöst im Verhältnis 800 µl/ml. Was davon nicht unmittelbar verwendet wurde, wurde im Tiefkühler portionsweise eingefroren bei -80 ° C.

Die Wirkstoffe Selumetinib sowie Docetaxel wurden bei erneuten Versuchen aus dem Tiefkühlfach geholt und mussten erst aufgetaut werden. Zu diesem Zweck steht im Labor eine Heizplatte zur Verfügung, die auf etwa 34 ° C eingestellt werden musste. Das Auftauen dauerte wenige Minuten.



Abbildung 4: Heizplatte

Das Lösungsmittel PBS wurde hergestellt, indem eine Tablette „phosphat bufferd tablet“ eine Stunde lang in 200 ml Aqua destillata gelöst wurde. Danach musste man den fertigen Puffer noch gut schütteln, bevor er zum Einsatz gebracht wurde.

Die Acetonitril-Lösung, die zum Waschen, Lösen und Ausfällen verwendet wird, wurde folgendermaßen hergestellt: Man nahm 20 Teile Wasser und fügte 80 Teile ACN hinzu.

Von den Organen wurden für die verschiedenen Proben jeweils 200 mg in ein Lysing Kit (Röhrchen zum Homogenisieren im Minilys) eingewogen. Hierzu war Sezierbesteck von Nötien.



Abbildung 5: Sezierbesteck

3.7 Durchführung

Nachdem alles für die Probengänge fertig vorbereitet war, begann die Durchführung der verschiedenen Versuche.

3.7.1 UV-Spektren

Selumetinib wurde ihm Rahmen dieser Arbeit an einem Zweistrahlspektrometer analysiert. Dieser hat, wie der Name schon sagt, zwei Strahlengänge. Der eine ist für die Probenlösung, der andere für die Referenzlösung. Sowohl Proben- als auch Referenzlösung wurden in eine Küvette aus Quarz pipettiert. In die Quarzküvette mit der Referenz wurde das reine Lösungsmittel pipettiert, also ACN bzw. PBS. In die Quarzküvette mit der Probe wurde dasselbe Lösungsmittel mit Selumetinib pipettiert. Durch die zwei Strahlengänge wurde das Absorptionsspektrum des Lösungsmittels vom Absorptionsspektrum der zu analysierenden Probe abgezogen und so das zu interessierende Spektrum erhalten, das unmittelbar danach digital auf dem UV-Spektrometer angezeigt wurde. Es war wichtig, dass die Küvetten

ausreichend mit dem jeweiligen Lösungsmittel gefüllt waren, sodass der monochromatische Lichtstrahl auch wirklich die Substanz erfassen konnte.

Zuerst wurde etwas ACN (circa 1 ml) mit 5 µl Selumetinib versetzt und gegen den ANC-Leerwert vermessen, dann wurde etwas PBS (circa 1 ml) mit 5 µl Selumetinib versetzt und gegen den PBS-Leerwert vermessen.

Die Einstellung der Wellenlänge war zwischen 200 und 700 λ. Selumetinib wurde bei circa bei 290 λ geortet. Eine Struktursicherung bzw. Qualitätssicherung war damit gegeben. Es war in Folge klar, auf welche Wellenlängen man das HPLC-Gerät einstellen sollte, da die folgenden Versuche mit dem Tyrosin-Kinase-Hemmer alle zum Schluss mittels HPLC-Methode analysiert wurden.

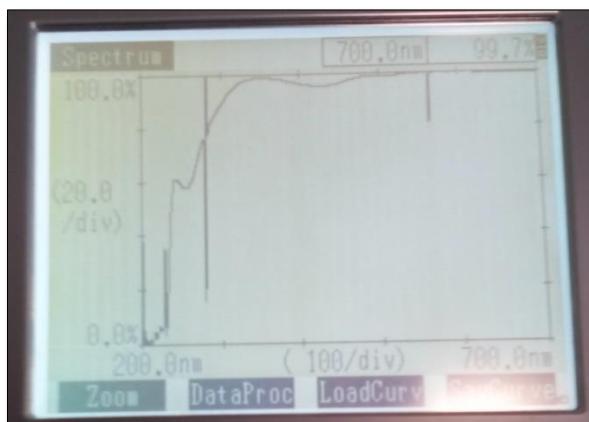


Abbildung 6: UV-Spektrogramm



Abbildung 7: UV-Spektrophotometer-Gerät

3.7.2 Chromatogramme

Die Durchführung der Versuche betreffend die Gewebeverteilung, die Wiederfindung, die Hepatozyten, aber auch die Plasmaproteinbindung sowie die mikrosomale Bindung, endeten jeweils damit, dass sie für die Analyse im HPLC-Gerät vorbereitet und dort schließlich über einige Stunden analysiert wurden. Ein Analysevorgang dauert 42 Minuten, wobei der Selumetinib-Peak immer nach circa 12,9 Minuten erschien. Danach erhielt man Chromatogramme, anhand denen man feststellen konnte, wie die Substanz(en) sich verhalten hatten, also wie viel Selumetinib noch vorhanden war, inwieweit es metabolisiert wurde, ob Metabolite dabei entstanden waren etc.

3.7.3 Transil Kits für mikrosomale Bindung und Plasmaproteinbindung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Transil XL Kits Testsysteme, kurz Transil Kits, betreffend die mikrosomale Bindung sowie die Plasmaproteinbindung durchgeführt.

Transil Kits bestehen aus kleinen Gefäße, die als „Wells“ bezeichnet werden. Sie befinden sich reihenförmig auf einer Platte, die insgesamt 96 Wells umfassen kann. Eine Reihe besteht aus 8 Wells, wobei das erste und das letzte Well den Referenzwerten dient.

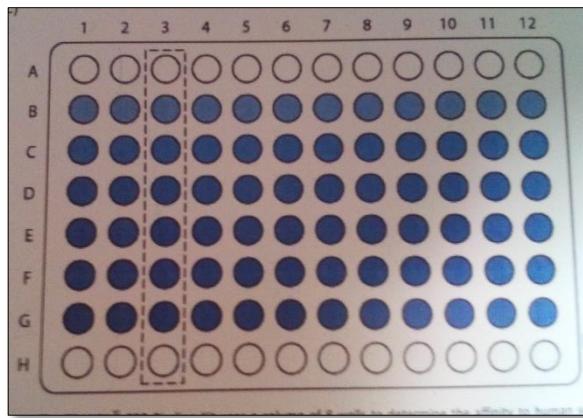


Abbildung 8: Anordnung der Wells auf der Platte

In jedem Well befinden sich viele kleine Kugelchen aus Silikat, die von einer immobilisierten Phosphatidylcholinmembran umgeben sind. Diese Kugelchen sind in einem 50 µM-Phosphat-Puffer bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4.

Während die Referenz-Wells ausschließlich Phosphat-Puffer enthalten, befinden sich in den 6 anderen Wells einer Reihe die Kugelchen aus Silikat und zwar in ansteigender Menge.



Abbildung 9: 8 Wells mit ansteigender Menge von Silikat-Kugelchen

In jedes Well wird nun dieselbe Probenlösung, auch immer dieselbe Menge, pipettiert und dann die Bindung an die Oberfläche der Phosphatidylcholinmembran mittels HPLC gemessen.

3.7.3.1. Probenaufbereitung

Zu Beginn wurde die entsprechende Konzentration mittels Schlussrechnung ermittelt. Damit wurde die Stammlösung hergestellt. Dafür wurde mit Hilfe des Molekulargewichts die notwendige Konzentration in Milligramm für die Einwaage berechnet.

Berechnung: 1 mol Selumetinib entspricht 457,69 g

Also entsprechen 80 µmol 36615,2 µg ($457,69 * 80$).

Das sind 36,62 mg/l.

Zum Schluss musste noch in die gewünschte Einheit umgewandelt werden und zwar die Konzentration für einen 50ml-Messkolben:

$$36,62 \text{ mg/l} = 3,662 \text{ mg/100 ml} = 1,85 \text{ mg/50 ml}$$

Nun wurden die berechneten 1,85 mg Selumetinib auf einer Folie auf der Analysewaage genau eingewogen, danach in 16 ml DMSO 100% aufgelöst und schließlich mit PBS langsam auf 50 ml aufgefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Lösung während des Auffüllens nicht zu stark erhitzte. Schließlich war die Lösung fertig hergestellt und zwar eine 32%-Lösung von DMSO und PBS mit einer Konzentration von Selumetinib von 80 µmol.

Für die Versuche betreffend die PPB sowie die mikrosomale Bindung war jeweils eine zusammenhängende Reihe mit 8 Wells notwendig.

Die Platte mit den Wells wurde aus dem Gefrierschrank genommen und danach über Nacht im Kühlschrank gelagert um aufzutauen. Alternativ hätte man die Platte auch drei Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen können.

Nachdem alles aufgetaut war, wurde die Platte fünf Sekunden lang bei 2100 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Danach wurden die Wells mit Hilfe des Decappers geöffnet und jeweils 15 µl Stammlösung pipettiert. Anschließend wurden die Wells mit dem Decapper verschlossen und 12 Minuten lang am Plate Shaker bei 1000 Umdrehungen pro Minute gut durchmischt.



Abbildung 10: Plate Shaker

Daraufhin wurde die Platte mit den Wells mit einem Gegengewicht in die Zentrifuge gelegt und 10 Minuten lang bei 2100 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Da die Zentrifuge sehr feinfühlig war, musste darauf geachtet werden, das Gegengewicht so präzise wie möglich der Probe anzugeleichen und zwar nicht nur was das Gewicht selbst betraf, sondern auch die Gewichtsverteilung musste nahezu ident sein. Durch das Zentrifugieren setzten sich Feststoffe und Proteine ab, sodass in Folge gut der Überstand entnommen werden konnte, ohne dass dabei Feststoffe oder Proteine mit aufgesaugt wurden.



Abbildung 11: Zentrifuge mit Well-Platten

Hierfür wurden wieder mit dem Decapper die Wells geöffnet und mit der Pipette circa jeweils 80 µl Überstand entnommen und in die Mikroehinsätze bis zur Wellenlinie pipettiert.



Abbildung 12: Platte mit Wells und Decapper

Anschließend wurden die Mikroeinsätze in bereits vorbereitete und beschriftete HPLC-Fläschchen gegeben, mit dem Deckel verschlossen, wobei man wieder darauf achten musste, dass der Deckel nicht zu fest zugeschraubt wurde, sodass später bei der HPLC-Analyse kein Überdruck entstehen konnte. Nun wurden die HPLC-Fläschchen in den Autosampler eingeordnet, dieser in das HPLC-Gerät gegeben, wo die Substanzen dann analysiert wurden.

3.7.4 Gewebeverteilung

3.7.4.1 Probenaufbereitung

Zu Beginn wurden fünf Homogenisierungsröhrchen mit je 200 mg des jeweiligen Organs gefüllt. Die Stücke wurden mit Hilfe von Sezierbesteck geschnitten und zum Teil vorzerkleinert.



Abbildung 13: Einwiegen von Gewebe auf der Präzisionswaage

Im Anschluss wurden 400 µl PBS zugefügt. Bis auf ein Röhrchen, das den Leerwert darstellte, wurden danach die vier anderen Röhren mit unterschiedlichen Mengen Selumetinib gefüllt, sodass unterschiedliche Konzentrationen entstanden. Folgende Mengen Selumetinib wurden der Probe zugefügt:

Tabelle 6: Menge Selumetinib-Lösung pro Probe

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Selumetinib	7,5 µl	15 µl	30 µl	60 µl

Nun wurden die Homogenisierungsröhrchen in den Minilys gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit für jeweils eine halbe Minute homogenisiert. Danach musste man kurz warten, damit sich die Probe nicht zu stark erhitzte, dann wurde noch mindestens ein weiteres Mal eine halbe Minute bei voller Geschwindigkeit homogenisiert.

Je nachdem, wie leicht oder schwer sich das Gewebe zerkleinern ließ, gab es unterschiedliche Homogenisierungsröhrchen in verschiedenen Stärken bzw. mit verschieden großen Kugeln aus unterschiedlichem Material, also entweder aus Keramik oder aus Stahl. Folgende Organstückchen wurden in den folgenden Homogenisierungsröhrchen zerkleinert und homogenisiert:

Tabelle 7: Gewebeproben und entsprechende Homogenisierungsröhrchen

Gewebeprobe	Homogenisierungsröhrchen (=Lysing Kits)
Herz	CK 28 R (Keramik-Kügelchen, Durchmesser 28 mm, verstärkt)
Hirn	CK 14 (Keramik-Kügelchen, Durchmesser 14 mm)
Leber	CK 14 (Keramik-Kügelchen, Durchmesser 14 mm)
Lunge	CK 28 R (Keramik-Kügelchen, Durchmesser 28 mm, verstärkt)
Milz	CK 14 (Keramik-Kügelchen, Durchmesser 14 mm)
Niere	CK 28 R (Keramik-Kügelchen, Durchmesser 28 mm, verstärkt)
Schwarte	MK 28 (Metall-Kügelchen aus Stahl, Durchmesser 28 mm)

Bei manchen Gewebe reichte es aus, sie zweimal für eine halbe Minute im Minilys zu homogenisieren, bei anderen war der Homogenisierungsvorgang wesentlich öfter notwendig und es stellte es stellte sich heraus, dass es hilfreich war, Gewebe, das sich schwer homogenisieren ließ, bereits im Vorfeld mit dem Sezermesser in kleinst mögliche Stückchen zu zerteilen. Vor allem die Niere und die Schwarte ließen sich nur schwer homogenisieren, während die anderen Organe diesbezüglich keine großen Probleme bereiteten.



Abbildung 14: Minilys zum Homogenisieren



Abbildung 15: Homogenisierungsröhrchen in verschiedenen Stärken

Nach dem Homogenisieren wurden nochmal 200 µl PBS zugefügt und der Inhalt der Homogenisierungsröhrchen mit Hilfe des Vortexmixers etwas 10 Sekunden lang nochmal gut durchmischt, bevor sie im Anschluss in die Zentrifuge gegeben wurden, wo sie 3,5 Minuten bei 12 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurden.



Abbildung 16: Vortexmischer

3.7.4.2 Probenentnahme und Proteinfällung

Nachdem die Homogenisierungsröhrchen fertig zentrifugiert hatten, kam es zur Probenentnahme. Hierfür mussten Eppendorf-Gefäße bereitgestellt werden. In diese wurden 80 µl Überstand des Inhalts des Homogenisierungsröhrchens gegeben. Nun kam es zur Proteinfällung, indem 240 µl ACN ins Eppendorf-Gefäß zu den 80 µl Probensubstanz dazu gegeben wurden. Das Gemisch wurde anschließend circa 10 Sekunden gevortext.

3.7.4.3 Zentrifugation

Die Eppendorf-Gefäße wurden nun in die Zentrifuge gegeben. Dabei musste man darauf achten, dass sich das Gewicht regelmäßig verteilte und jedes Eppendorf-Gefäß ein Gegengewicht hatte, das etwa genau gleich schwer war. War die Zahl der Eppendorf-Gefäße ungerade, musste man als Gegengewicht ein extra Eppendorf-Gefäß dazu nehmen, welches man beispielsweise mit Wasser befüllte.

Nun wurde 4 Minuten lang bei 12 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Dabei setzten sich die Feststoffe in der Probe bzw. die Proteine die ausgefällt wurden, ab. Dadurch konnte dann am Ende die Arzneistofflösung als Überstand entnommen werden.



Abbildung 17: Zentrifuge für Eppendorf-Gefäße und Homogenisierungsröhrchen

3.7.4.4 Endgültige Vorbereitung für die HPLC-Analyse

Der Überstand in den Eppendorf-Gefäßen wurde zu guter Letzt mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und in ein Mikro-Vial bis zu einer wellenförmigen Markierung pipettiert. Das Mikro-Vial ist ein kleines unten verschlossenes Röhrchen aus Glas, das genau in das HPLC-Fläschchen passt. Hierfür ist nur eine geringe Menge, die wenigen Tropfen entspricht, notwendig. Würde man das HPLC-Fläschchen direkt mit dem Überstand befüllen, wäre sehr viel mehr Flüssigkeit notwendig, diese ist aber oft nicht vorhanden oder man läuft Gefahr Feststoff-Partikel mit der Pipette mitaufzusaugen, da man so viel Überstand benötigt, dass man schon in die Nähe der abzentrifugierten Feststoffe kommt.

Beim Befüllen war darauf Acht zu geben, dass keine Luftblasen in der Flüssigkeit bzw. an der Oberfläche schwammen, da dies eventuell später die HPLC-Analyse beeinträchtigt hätte. War das Mikro-Vial ausreichend mit Überstand befüllt, wurde es in ein HPLC-Fläschchen gegeben und locker verschlossen, damit kein Überdruck entstehen konnte, wenn bei der darauf folgenden HPLC-Analyse die Nadel durch den Deckel stach.

Die Mikro-Vials wurden also nach und nach in beschriftete HPLC-Fläschchen gesteckt und dann in der richtigen Reihenfolgen, die vorher am Computer festgelegt wurde, in den Autosampler eingeordnet und ins HPLC-Gerät gegeben. Zusätzlich zu den Fläschchen mit der Selumetinib-Lösung in den verschiedenen Konzentrationen sowie mit den Leerwerten, musste noch ein HPLC-Fläschchen mit ACN befüllt werden, worin die HPLC-Nadel immer eintauchte und gereinigt wurde, bevor sie zur Analyse in das nächste HPLC-Fläschchen eintauchte und Flüssigkeit aufsaugte.

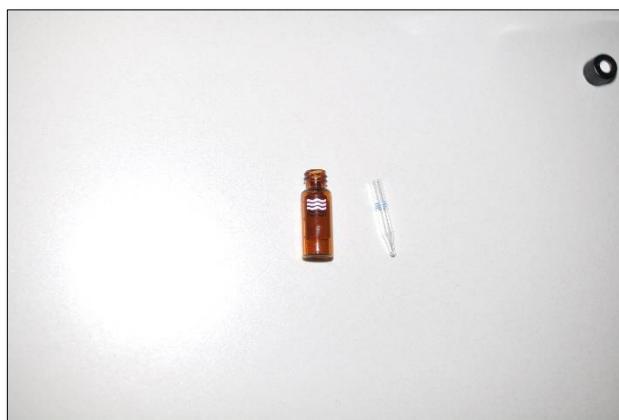


Abbildung 18: HPLC-Fläschchen und Mikro-Vial mit Wellenlinie als Markierung sowie Cap zum Verschließen

3.7.4.5 Abnahmezeitpunkte

Nach dem Aufbereiten und anschließenden Homogenisieren der Proben, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Probe entnommen, ausgefällt, gevortext und nochmals zentrifugiert und schließlich in die HPLC-Fläschchen gegeben.

Der erste Abnahmezeitpunkt erfolgte sofort, also nach 0 Minuten. Nach der Abnahme wurden die Homogenisierungsröhrchen gevortext, damit die Arzneiflüssigkeit wieder gut im Gewebe verteilt war und man so besser beobachtet werden konnte, inwiefern die Aufnahme des Arzneistoffes ins Gewebe auch von der Zeit abhängig war.

Nach einer knappen halben Stunde wurden die Homogenisierungsröhrchen wieder 3,5 Minuten zentrifugiert, um Gewebe und gefällte Proteine von der Arzneistofflösung zu trennen. Anschließend erfolgte die zweite Abnahme, also nach genau einer halben Stunde. Die Aufbereitung der Probe erfolgte dann ident mit dem Verlauf der ersten Probenentnahme.

In gleicher Weise wurde mit der dritten und vierten Probenentnahme verfahren, die nach 60 Minuten sowie nach 120 Minuten erfolgte.

Da sich schnell herausstellte, dass es nach den 30, 60 und 120 Minuten keine signifikanten Unterschiede in der Anreicherung des Gewebes mit Arzneistoff gab, wurde in Folge nur mehr Probe nach 0 Minuten sowie nach 30 Minuten entnommen. Daher wurde lediglich das Herz vom Huhn zu allen vier Abnahmezeitpunkten vermessen.

3.7.5 Wiederfindung

Bei diesen Proben ging es darum heraus zu finden, wie viel Arzneistoff, in diesem Fall also Selumetinib nach Aufbereitung und Homogenisierung sowie anschließender Zentrifugation, wieder gefunden werden konnte. Anhand des wiedergefundenen Selumetinib in der Arzneistofflösung konnte darauf rückgeschlossen werden, wie viel davon vom Gewebe aufgenommen wurde und daher nicht mehr wiederauffindbar war.

3.7.5.1 Probenaufbereitung

Wie bei der Gewebeverteilung wurden auch hier jeweils 200 mg Gewebe in ein Homogenisierungsröhrchen eingewogen, allerdings nur jeweils zwei Homogenisierungsröhrchen mit je 200 mg Gewebe pro Organ.

Nachdem 200 mg Gewebe im Homogenisierungsröhrchen eingewogen worden waren, pipettierte man in eines der beschrifteten Röhrchen 790 µl PBS und in das andere 790 µl ACN. Zuletzt pipettierte man je 10 µl Selumetinib-Lösung dazu.

Tabelle 8: Zusammensetzung

200 mg Gewebe + 790 µl ACN + 10 µl Selumetinib-Lösung
200 mg Gewebe + 790 µl PBS + 10 µl Selumetinib-Lösung

3.7.5.2 Homogenisierung

Nachdem Gewebe, Lösungsmittel und Selumetinib im Homogenisierungsröhrchen waren, wurden diese zum Homogenisieren in den Minilys gegeben, wo sie mindestens zweimal für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit durchgeschüttelt wurden. Vor allem die Niere und die Schwarte bereiteten beim Homogenisieren, insbesondere in ACN, Probleme und mussten wesentlich häufiger im Minilys geschüttelt werden.

3.7.5.3 Zentrifugation und Probenentnahme

Nach der Homogenisierung im Minilys, wurde das Homogenisat in die Zentrifuge gegeben und dort so verteilt, dass die eine Probe jeweils das Gegengewicht der anderen Probe darstellte. Nun wurde 3,5 Minuten lang zentrifugiert, dabei trennten sich die Feststoffe von der Flüssigkeit, sodass nach Ende der Zentrifugation der Überstand entnommen werden konnte.

3.7.5.4 Proteinfällung

300 µl Überstand, also Arzneistofflösung, wurden in ein Eppendorf-Gefäß gegeben, mit 900 µl ACN versetzt, wodurch es zur Proteinfällung kam. Hiernach wurde das Eppendorf-Gefäß mit der Mischung gevortext und dann vier Minuten lang zentrifugiert und zwar bei 12 000 Umdrehungen pro Minute.

3.7.5.5 Leerwerte

Auch hier wurden zur Absicherung Leerwerte durchgeführt, die sich folgendermaßen zusammensetzten:

Tabelle 9: Zusammensetzung der Leerwert-Proben mit ACN und PBS

Leerwert/ACN	990 µl ACN + 10 µl Selumetinib-Lösung
Leerwert/PBS	980 µl PBS + 10 µl Selumetinib-Lösung

Sowohl von der Mischung von Selumetinib mit PBS, also auch von der Mischung von Selumetinib mit ACN mussten also Leerwerte gemacht werden, d.h. in diesen Proben befand sich kein Gewebe. Daher war bei diesen Proben auch kein Homogenisierungsröhrchen notwendig, da es kein Gewebe zu verkleinern galt. Aus diesem Grund wurden diese Proben von Beginn an in Eppendorf-Gefäßen durchgeführt.

Hierzu wurden 990 µl PBS bzw. 990 µl ACN in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und jeweils 10µl Selumetinib hinzugefügt. Danach war die Durchführung ident mit den Proben mit Gewebe, d.h. erst wurde das Gemisch circa 10 Sekunden im Vortexmixer gut durchmischt, danach dreieinhalb Minuten lang bei 12 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Hiernach nahm man 300 µl Überstand, wobei es in diesem Fall gar kein abzentrifugiertes Gewebe gab, also alles flüssig war. Dennoch wurden sicherheitshalber mit 900 µl ACN etwaige Proteine ausgefällt, anschließend das Eppendorf-Gefäß gevortext und zum Schluss wieder mit 12 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

3.7.5.6 Endgültige Vorbereitung für die HPLC-Analyse

Nachdem alle Proben fertig zentrifugiert waren, wurde der Überstand in bereits vorbereitete und beschriftete HPLC-Fläschchen gegeben. Da diesmal ausreichend Überstand vorhanden war, waren die Mikro-Einsätze diesmal nicht notwendig, vielmehr konnte die Flüssigkeit direkt in die HPLC-Fläschchen pipettiert werden. Wie immer wurde auch ein ACN-Fläschchen zur Reinigung der HPLC-Nadel vorbereitet.

Schließlich wurden die fertig befüllten und beschrifteten HPLC-Fläschchen in der richtigen Reihenfolge, die bereits am Computer festgelegt worden war, in den Autosampler eingeordnet und ins HPLC-Gerät gegeben, wo sie dann in Folge analysiert wurden.

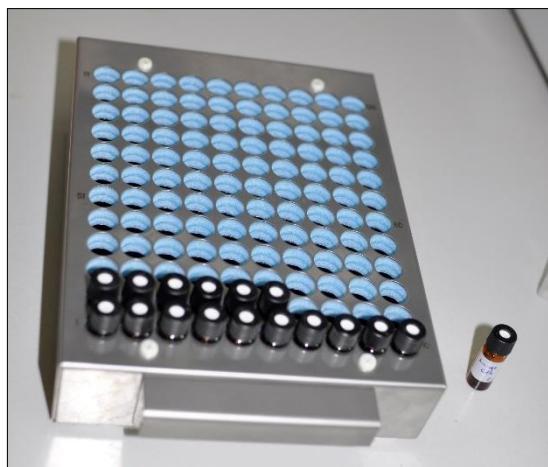


Abbildung 19: Autosampler mit eingeordneten HPLC-Fläschchen

3.7.5.7 Kombination mit Docetaxel und 24 Stunden-Wert

Von Interesse war auch die Frage, ob Selumetinib in Kombination mit Docetaxel besser ins Gewebe aufgenommen werden würde wie Selumetinib allein.

Hierfür wurde den Proben Docetaxel in zwei verschiedenen Konzentrationen zugegeben, also 10 µl und 20 µl. Diese Proben wurden bei Herz, Lunge, Milz und Niere durchgeführt. Folgendermaßen war die Zusammensetzung:

Tabelle 10: Wiederfindung mit 10 µl Selumetinib und 10 µl Docetaxel

	Gewebe	ACN/PBS	Selumetinib-Lösung	Docetaxel-Lösung
Gewebe/ACN	200 mg	780 µl ACN	10 µl	10 µl
Gewebe/PBS	200 mg	780 µl PBS	10 µl	10 µl
Leerwert/ACN	0 mg	980 µl ACN	10 µl	10 µl
Leerwert/PBS	0 mg	980 µl PBS	10 µl	10 µl

Tabelle 11: Wiederfindung mit 10 µl Selumetinib und 20 µl Docetaxel

	Gewebe	ACN/PBS	Selumetinib-Lösung	Docetaxel-Lösung
Gewebe/ACN	200 mg	770 µl ACN	10 µl	20 µl
Gewebe/PBS	200 mg	770 µl PBS	10 µl	20 µl
Leerwert/ACN	0 mg	970 µl ACN	10 µl	20 µl
Leerwert/PBS	0 mg	980 µl PBS	10 µl	20 µl

Anschließend wurde fortgefahren wie immer, also Proben mit Gewebe homogenisiert, Leerwerte gevortext, anschließend zentrifugiert, dann 300 µl Überstand mit 900 µl ACN versetzt, wieder gevortext, danach nochmals zentrifugiert und der Überstand schließlich in ein HPLC-Fläschchen pipettiert.

Bei diesen Proben wurde auch ein 24 Stunden-Wert durchgeführt, die Homogenisierungsröhrchen mit dem Homogenisat wurden also 24 Stunden lang stehen gelassen, sodass die Arzneistofflösung mehr Zeit für die Gewebepermeation hatte. Nach 24 Stunden wurden diese letzten Proben aufbereitet und im HPLC-Gerät analysiert.

3.7.6 Hepatozyten

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde auch ein Hepatozyten-Versuch durchgeführt, in diesem Fall mit Ratten-Hepatozyten. Dieser Versuch soll im Folgenden kurz erläutert werden. Mehr Informationen zu Hepatozyten-Versuchen liefern andere Diplomarbeiten, die bei Prof. Czejka verfasst wurden und werden. (beispielsweise jene von Astrid Köberl oder von Theresa Haas).

3.7.6.1 Vorbereitung allgemein

Das Williams Medium E dient dem Erhalt der lebenden Hepatozyten. Es wurde mit 20 ml Hepatozyten Maintenance und 5 µl Dexamethason versetzt und war damit im Kühlschrank 31 Tage lang haltbar. Vor Durchführung des Hepatozyten-Versuchs musste es circa zwei Stunden lang in einem Wasserbad bei 37°C aufgewärmt werden.



Abbildung 20: Wasserbad

Ebenfalls musste das sogenannte Recovery Medium im Wasserbad zwei Stunden erwärmt werden.



Abbildung 21: Williams Medium E



Abbildung 22: Recovery Medium

In der Zwischenzeit konnte die Laminar Air Flow Werkbank, also eine sterile Werkbank, vorbereitet werden, das heißt sie wurde mit 70%igem Alkohol desinfiziert und alle für den Probendurchgang notwendigen Utensilien, wie Halterungen, Platten, Küchenrolle, Pipetten etc. bereit gelegt und ebenfalls desinfiziert. Es war sehr wichtig unter diesen Bedingungen zu arbeiten, da die Hepatozyten sehr empfindlich sind und kleinste Verunreinigungen bereits ausreichen können, um sie zu zerstören.



Abbildung 23: Laminar Air Flow Werkbank

Weiters wurde das Gegengewicht für die Zentrifuge bereits vorbereitet (51,5 ml, da 50 ml Recovery Medium und 1,5 ml Zellen).

3.7.6.2 Vorbereitung Hepatozyten

Die benötigte Menge an Hepatozyten, welche mit flüssigem Stickstoff bei -196°C tiefgefroren waren, um sie länger haltbar zu machen, wurden nun für 2 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach wurden die Zellen ins Recovery Medium gegeben und mit 1 ml Recovery Medium nachgespült, damit auch wirklich alle Hepatozyten ins Gefäß gelangen konnten. Nun wurden die Zellen durch Schwenken (kopfüber) im Medium homogenisiert und danach 10 Minuten lang bei 600 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Dadurch setzten sich die Hepatozyten unten ab und man konnte das Recovery Medium nun einfach entsorgen, da es nicht mehr benötigt wurde. Jedoch benötigten die Hepatozyten nun ein anderes Medium, um weiter überleben zu können und nicht auszutrocknen. Hierfür wurde das Williams Medium E verwendet.

Nun mussten die Zellen gezählt werden. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und 700 µl Medium und 200 µl Trypanblau 0,4% hinzugefügt. Das Ganze wurde gemischt, davon wurden 10 µl entnommen und in die jeweilige Zählkammer pipettiert. Anhand der Färbung oder Nicht-Färbung konnte man gut erkennen, ob es sich um lebende oder um tote Zellen handelt, denn nur tote Zellen nehmen den Farbstoff an und werden

dunkelblau. Der Zählvorgang funktionierte so, dass vier Quadrate gezählt wurden, also auf jeder Seite zwei und der Durchschnitt daraus gebildet wurde.

Berechnet wurde dann folgendermaßen:

$$(1) \text{Zellen pro Milliliter} = \text{lebende intakte Zellen pro Quadrat} * \text{Dilutionsfaktor (10)} * 10\,000$$

$$(2) \text{Viabilität} = \frac{\text{lebende Zellen pro Quadrat}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} * 100$$

Es war wichtig, dass genügend lebende Zellen vorhanden waren und die Viabilität mindestens 80% betrug.

3.7.6.3 Stammlösung und Verdünnungen

Nachdem die Eppendorf-Gefäße vorbereitet waren, wurde folgendermaßen vorgegangen. Zunächst wurde eine 5 mM-Stammlösung hergestellt. Hierfür wurden 2,3 mg Selumetinib in 1 ml DMSO 100% gelöst. Anhand des Molekulargewichts von Selumetinib, das 457,86 beträgt, konnte dies berechnet werden.

Anschließend wurden die Verdünnungen für die Hepatozyten folgendermaßen vorgenommen.

- 400 µM: 200 µl der 5 mM-Stammlösung und 2300 µl Medium
(die wahre Konzentration in den Zellen betrug 200 µM)
- 200 µM: 1 ml der vorhergehenden Verdünnung (400 µM) und 1 ml Medium
(die wahre Konzentration in den Zellen betrug 100 µM)
- 100 µM: 750 µl der vorhergehenden Verdünnung (200 µM) und 750 µl Medium
(die wahre Konzentration in den Zellen betrug 50 µM)
- 20 µM: 300 µl der vorhergehenden Verdünnung (100 µM) und 1200 µl Medium
(die wahre Konzentration in den Zellen betrug 10 µM)

3.7.6.4 Durchführung des Hepatozyten-Versuchs

In eine 12-Well-Platte wurden je 500 µl der jeweiligen Konzentration pipettiert. Die Platte musste nun unter dem Laminar geschwenkt werden und 5 bis 10 Minuten in den Inkubator gegeben werden.

Es wurde auch eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Dafür nahm man einige Zellen, gab sie in ein Eppendorf-Gefäß und erhitzte dieses in einem Wasserbad bei etwa 60 ° C. Dadurch wurden die Zellen abgetötet und keinerlei enzymatische Reaktion fand mehr statt. Diese Zellen wurden auch in die für sie vorgesehenen Wells pipettiert. Ebenfalls wurden Leerwertproben in

Wells pipettiert, also nur Williams Medium E ohne Hepatozyten. So ließ sich der Abbau von Selumetinib auch ohne Hepatozyten feststellen.

Als die 12-Well-Platte fertig befüllt war, kam es zur Probenentnahme. Die Probenentnahme erfolgte zu den folgenden Zeitpunkten: 0 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten, 180 Minuten, 240 Minuten, 300 Minuten, 24 Stunden

Zwischen den Abnahmezeitpunkten wurde die Platte immer in den Inkubator bei 37°C gegeben. Damit wurde die Körpertemperatur simuliert.

Bei jeder Abnahme wurden aus jedem Well mit der Pipette je 80 µl entnommen und in ein vorbereitetes und beschriftetes Eppendorf-Gefäß gegeben. Da die Zellen nun getötet wurden, war es nicht mehr notwendig an der Laminar Air Flow Werkbank zu arbeiten. Es mussten nun schnell jeweils 80 µl ACN hinzugefügt werden, um die Reaktion zu stoppen.

Nun wurden die Proben noch 5 Minuten lang bei 12 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, dann der Überstand entnommen und in Mikro-Vials pipettiert, welche in vorbereitete HPLC-Fläschchen gegeben und mit dem Deckel locker verschlossen wurden. Danach folgte die HPLC-Analyse.

4 Auswertung und Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der verschiedenen Proben dargestellt.

4.1 UV-Spektren

Bevor die verschiedenen Proben mittels HPLC-Analyse gemessen wurden, wurde noch einmal die Wellenlänge, bei der Selumetinib auftritt mittels UV-Spektrometer kontrolliert. So konnte in Folge das HPLC-Gerät auf die richtige Wellenlänge eingestellt werden.

Die Einstellung der Wellenlänge erfolgte zwischen 200 und 700 λ .

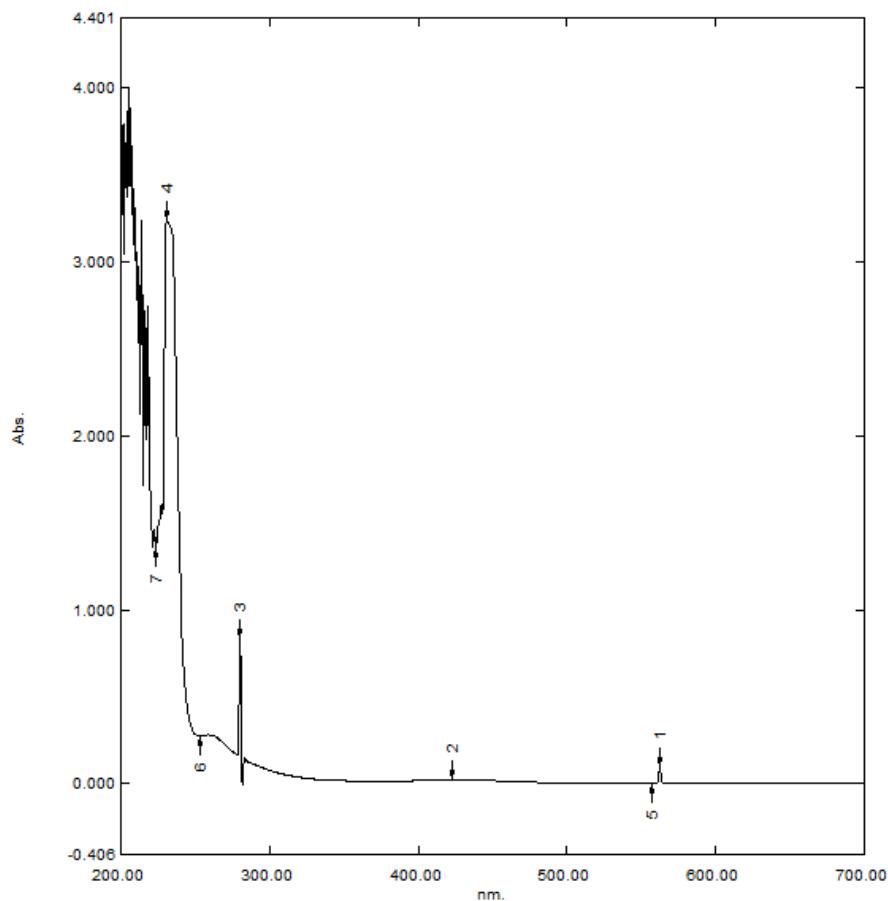


Abbildung 24: UV-Spekrogramm Selumetinib in ACN

Der Peak Nummer 3 ist der Selumetinib-Peak. Er trat bei einer Wellenlänge von circa 290 λ auf.

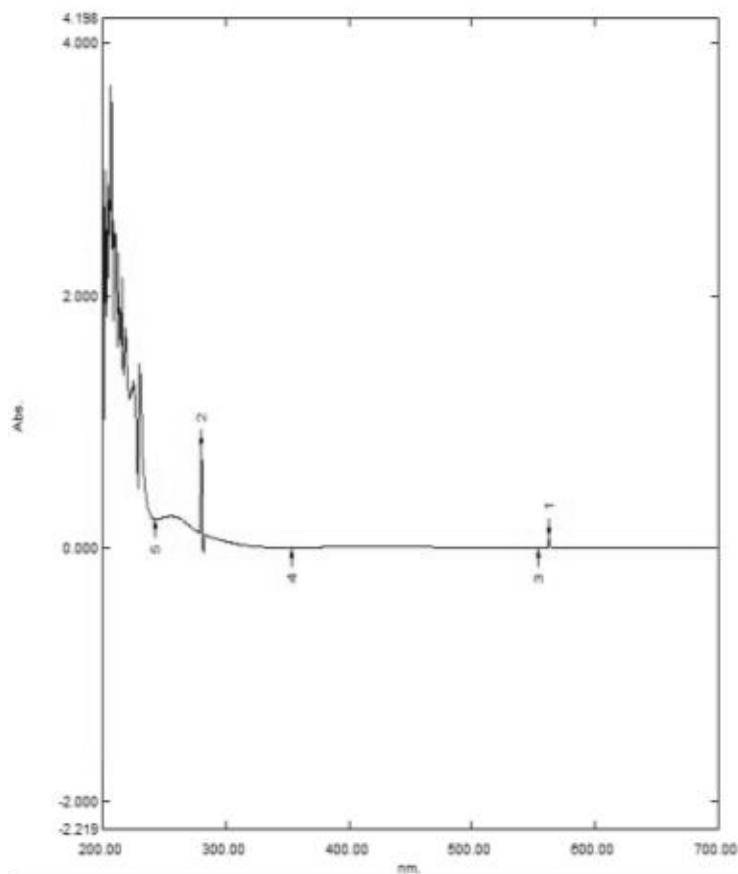


Abbildung 25: UV-Spekrogramm Selumetinib in PBS

Hier ist der Peak Nummer 2 der Selumetinib-Peak. Er trat ebenfalls bei einer Wellenlänge von circa $290\text{ }\lambda$ auf.

Selumetinib wurde also sowohl in ACN als auch in PBS bei circa $290\text{ }\lambda$ geortet. Eine Struktursicherung bzw. Qualitätssicherung war damit gegeben und die HPLC-Anlage konnte in Folge passend eingestellt werden

4.2 Chromatogramme

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden mit Hilfe der selektiven und empfindlichen HPLC-Methode zahlreiche Chromatogramme erstellt, anhand deren Peakflächen bzw. AUC wichtige Messdaten erhoben werden konnten.

Ein Analysevorgang dauerte etwa 42 Minuten. Dabei wurden zahlreiche Substanzen chromatographisch erfasst. Von Interesse war in diesem Falle natürlich der Selumetinib-Peak, der in den Fokus rückte bzw. etwaige Metabolite. Da der Peak immer nach circa 12,9 Minuten aufschien, sind die folgenden Chromatogramme nicht bis zu 42 Minuten dargestellt, sondern wurden nach 20 Minuten mittels Computerprogramm abgeschnitten.

Beispielhaft sind im Folgenden Chromatogramme verschiedener Gewebeproben dargestellt, wobei der erste Peak immer den Standard-Peak darstellt und der zweite Peak den Selumetinib-Peak.

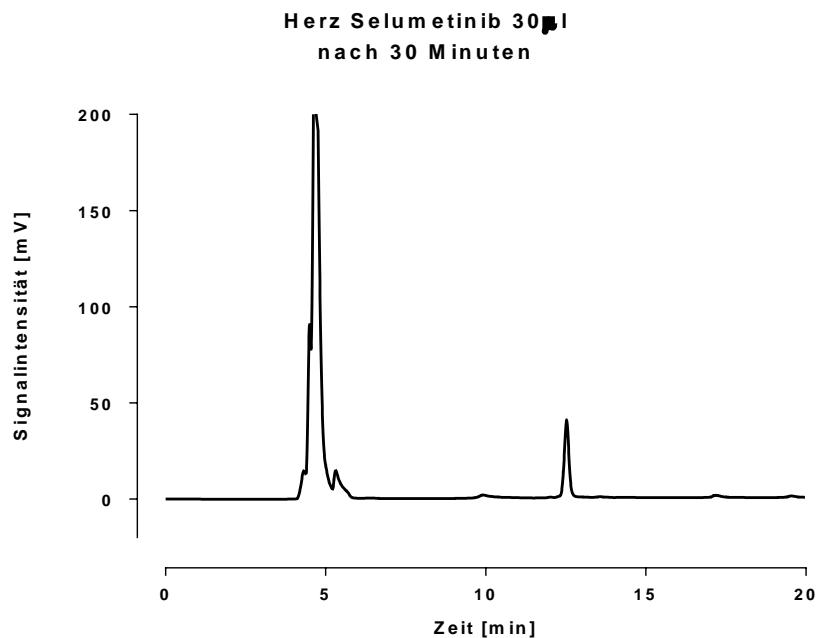


Abbildung 26: Chromatogramm Gewebeverteilung Herz

Hier sieht man nach circa 5 Minuten den Standard-Peak, nach knapp 13 Minuten dann den Selumetinib-Peak. Er ist nicht sehr groß, jedoch deutlich und scharf und damit gut zu erkennen und zu identifizieren. Offensichtlich wurde nach einer halben Stunde ein großer Teil der Selumetinib-Lösung vom Herzen aufgenommen.

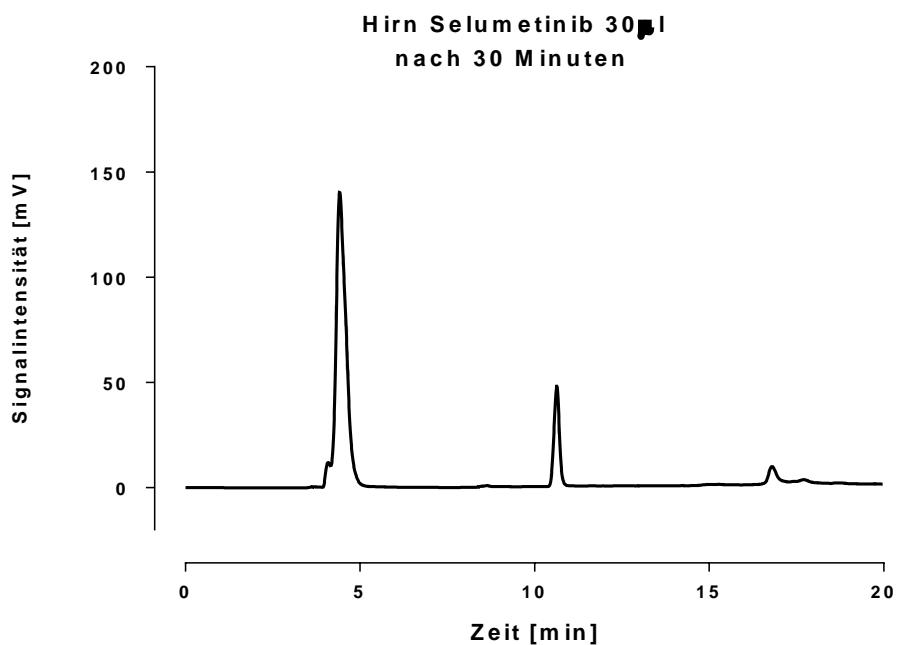


Abbildung 27: Chromatogramm Gewebeverteilung Hirn

Beim Hirn ist sowohl der Standard-Peak, also auch der Selumetinib-Peak gut und deutlich zu erkennen. Das Hirngewebe scheint die Selumetinib-Lösung also zum Teil aufgenommen zu haben. Weiter hinten ist ein kleiner Peak einer unbekannten Substanz erkennbar, mitunter handelt es sich hierbei um eine Verschmutzung.

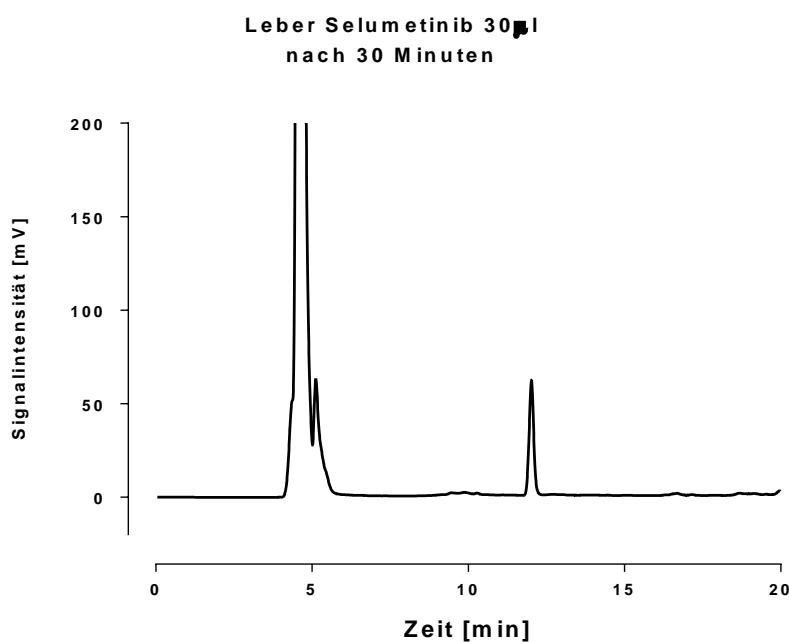


Abbildung 28: Chromatogramm Gewebeverteilung Leber

Bei der Leber sieht man einen sehr hohen und nicht ganz scharfen Standard-Peak, der aufgrund seiner Größe oben abgeschnitten wurde. Daneben wieder scharf und deutlich zu erkennen ein mittelgroßer Selumetinib-Peak nach knapp 13 Minuten.

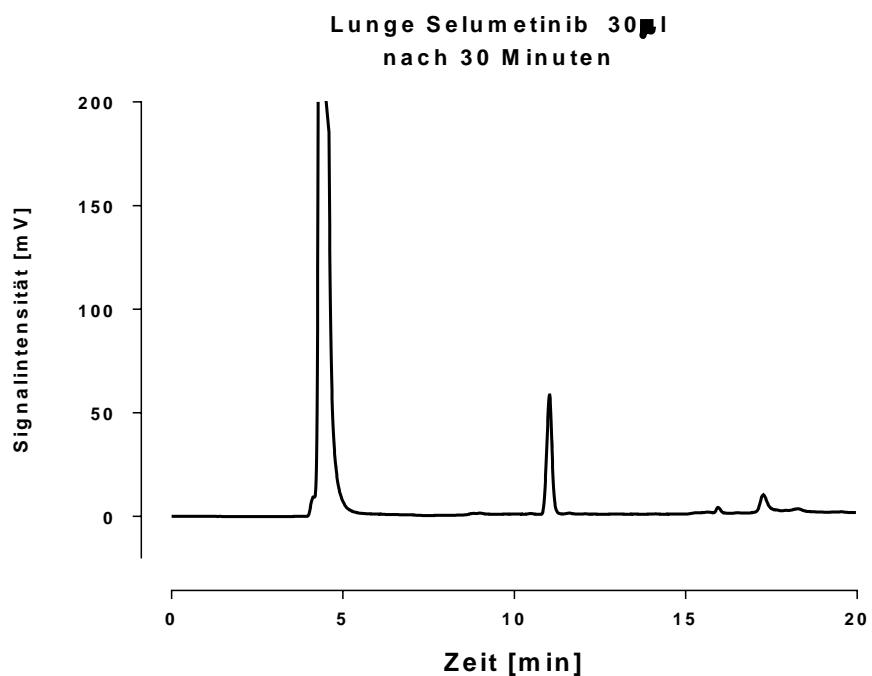


Abbildung 29: Chromatogramm Gewebeverteilung Lunge

Auch hier ist wieder eine sehr hohe Signalintensität des Standard-Peaks erkennbar und der Selumetinib-Peak ist sehr klar und deutlich zu erkennen, Selumetinib wurde vom Lungengewebe zum Teil also aufgenommen. Weiter hinten sind wieder kleine unbekannte Peaks erkennbar.

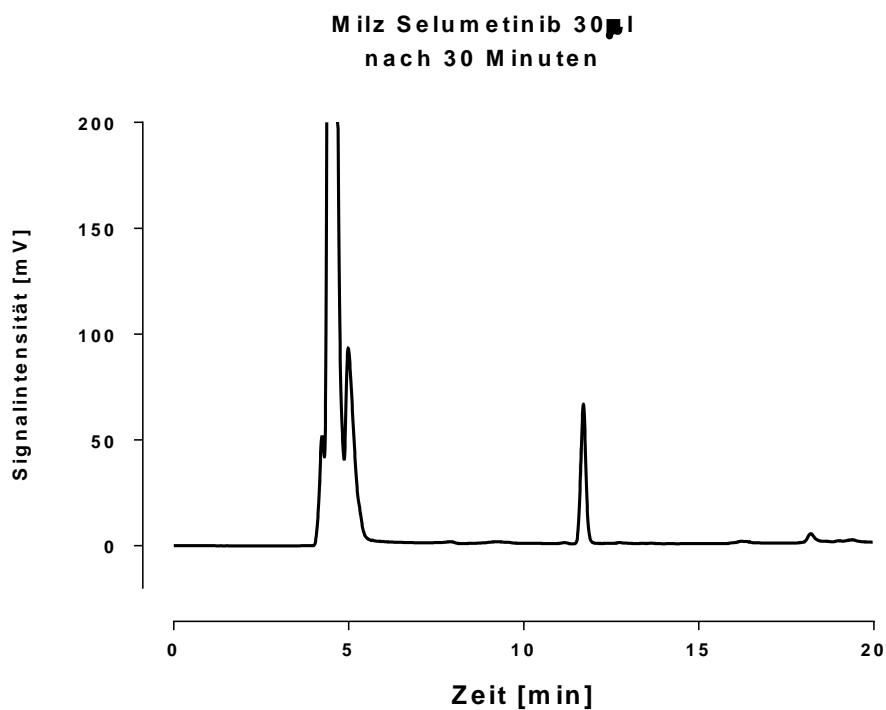


Abbildung 30: Chromatogramm Gewebeverteilung Milz

Wieder ist der Selumetinib-Peak nach 12,9 Minuten scharf und deutlich zu identifizieren.

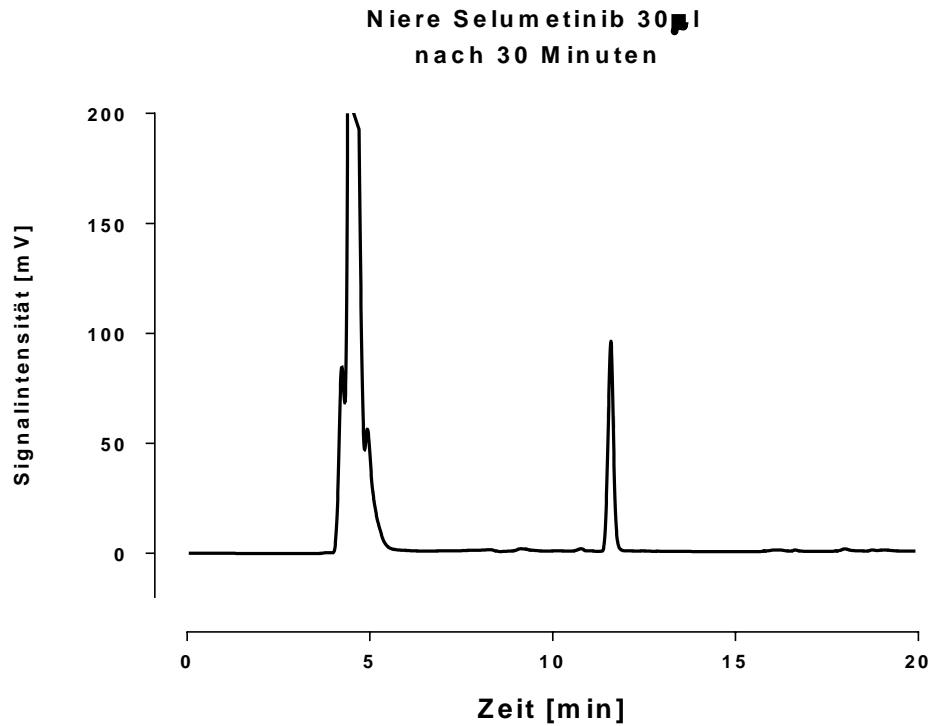


Abbildung 31: Chromatogramm Gewebeverteilung Niere

Die Niere scheint nicht allzu viel Selumetinib aufgenommen zu haben, da hier der Peak recht hoch ist und die AUC dementsprechend höher ausfällt.

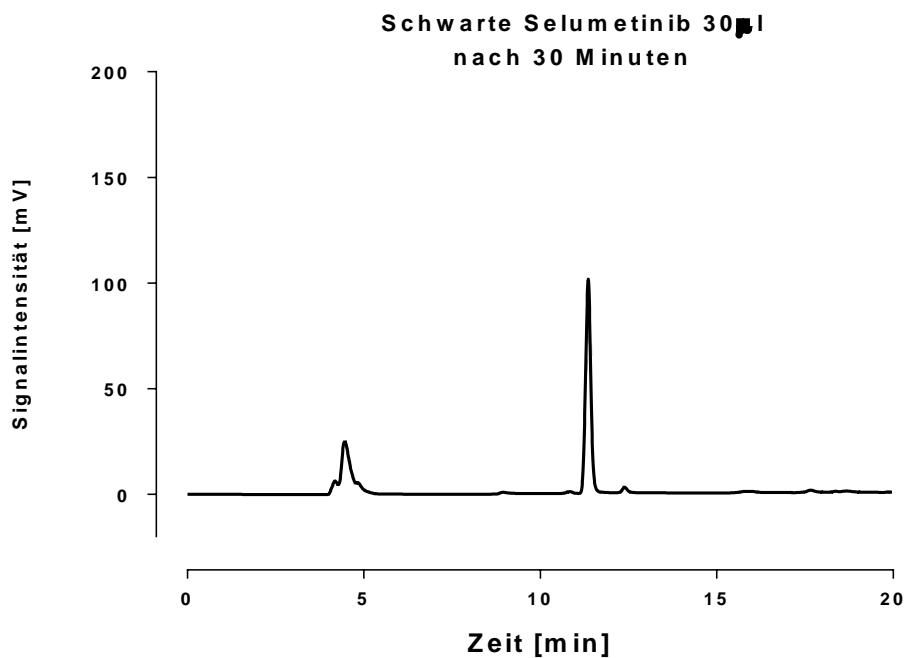


Abbildung 32: Chromatogramm Gewebeverteilung Schwarze

Die Schwarze ist ein sehr lipophiles Gewebe und hat daher kaum das ebenfalls sehr lipophile Selumetinib aufgenommen, wie man an diesem Chromatogramm gut erkennen kann. Der Standard-Peak ist klein und unscharf. Eine mögliche Erklärung hierfür wären die

Schwierigkeiten bei der Homogenisierung, denn die Schwarze ließ sich nur sehr schwer verkleinern und die Ergebnisse weichen daher etwas voneinander ab.

Außerdem wurden auch Leerwerte, also Werte ohne Gewebe, mit zwei verschiedenen Lösungsmitteln gemacht und zwar mit PBS und mit ACN. Anschließend wurden die zwei Chromatogramme mit Hilfe des Computerprogramms übereinander gelegt, sodass man gut sehen kann, in welchem Lösungsmittel mehr Wirkstoff aufgenommen wird.

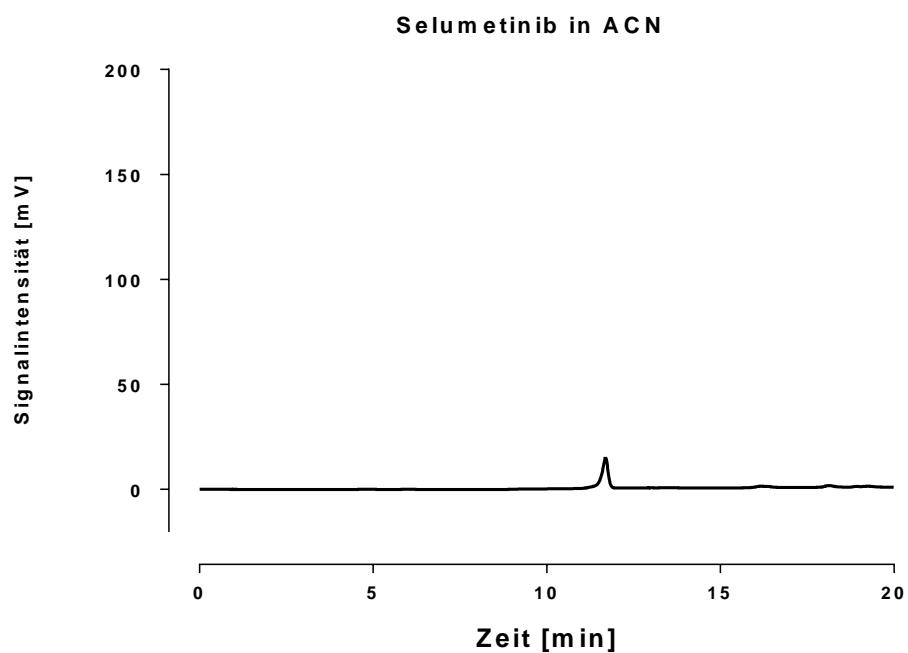


Abbildung 33: Chromatogramm Selumetinib in ACN

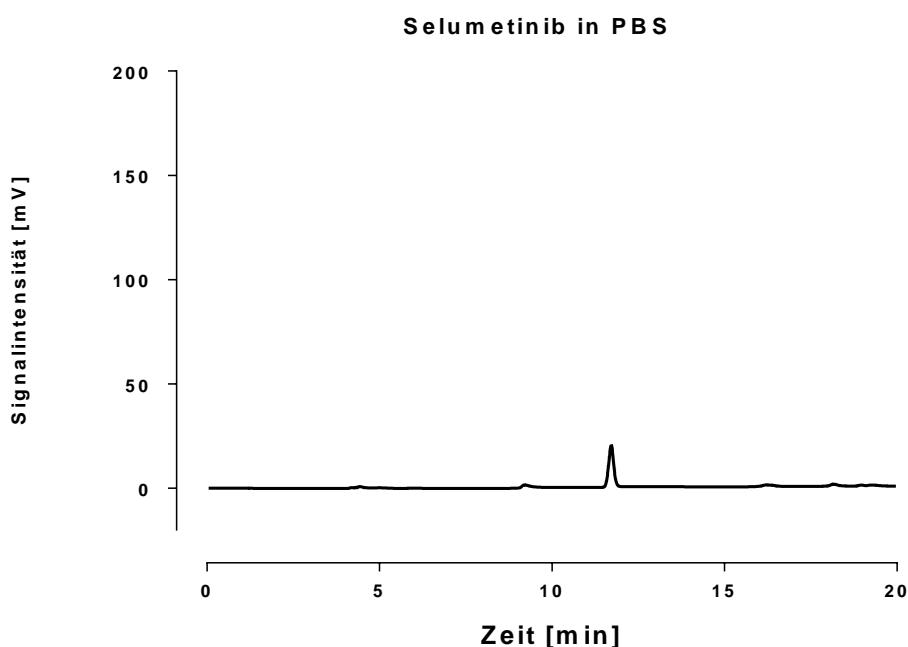


Abbildung 34: Chromatogramm Selumetinib in PBS

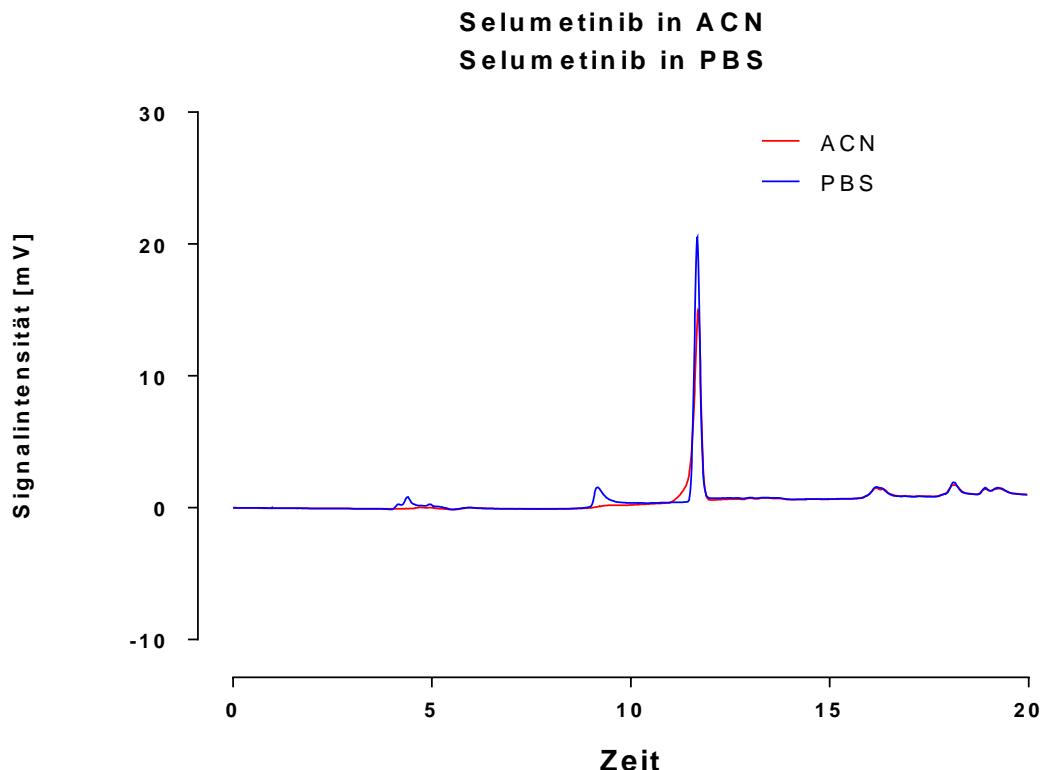


Abbildung 35: Chromatogramm Selumetinib-Peaks in ACN und PBS übereinander gelegt

Man kann also hier erkennen, dass der Unterschied der beiden Lösungsmittel in der Aufnahmefähigkeit nicht herausragend ist. Der Peak von ACN ist zwar kleiner, was auf den ersten Blick darauf hindeutet, dass mehr Substanz vom Gewebe aufgenommen wurden, dafür ist er aber auch etwas breiter und nicht symmetrisch, was wieder für das Lösungsmittel PBS spricht.

4.3 Transil Kits für mikrosomale Bindung und Plasmaproteinbindung

Die Ergebnisse der Transil-Kit-Versuche betreffend die mikrosomale Bindung sowie die Plasmaproteinbindung gaben Aufschluss über die Affinität von Selumetinib zur Phosphatidylcholinmembran. Dadurch erhält man Informationen über Arzneistoffwirkungen, wie die Bindung an die Membran, die Membranpermeabilität sowie verschiedene Wechselwirkungen. Anhand der Peakflächen kann man gut sehen inwieweit Selumetinib eine Plasmaproteinbindung bzw. eine mikrosomale Bindung eingegangen ist. Im Folgenden sind beispielhaft Chromatogramme dargestellt:

4.3.1 Mikrosomale Bindung

Im Folgenden sieht man das Chromatogramm zur mikrosomalen Bindung mit übereinandergelegten Peaks von drei verschiedenen Wells sowie eine Tabelle, in der die Werte aufgelistet sind, die die HPLC-Analyse aller 8 Wells ergab:

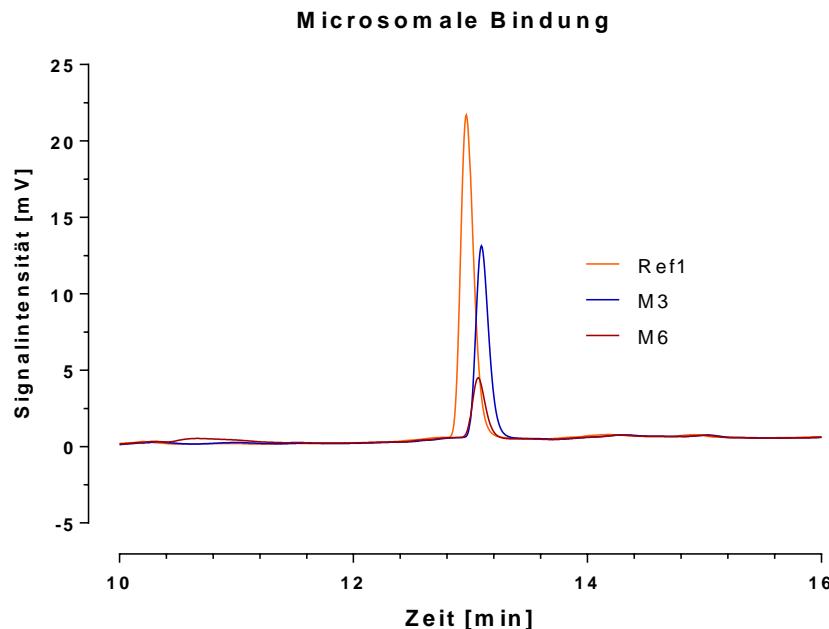


Abbildung 36: Mikrosomale Bindung von drei verschiedenen Wells

Tabelle 12: Mikrosomale Bindung in den 8 Wells

Inhalt des Wells	Peakfläche
Referenz 1	140,6
MIC 1	96,9
MIC 2	56,7
MIC 3	41,9
MIC 4	29,3
MIC 5	75,8
MIC 6	4,3
Referenz 2	104,2

Die Grafik in Abbildung 36 zeigt, dass Referenz 1 keine Bindung eingegangen ist, woraus ein großer Peak resultiert. Bei Well 3 macht die Peakfläche weniger als die Hälfte im Vergleich zur Referenz-Peakfläche aus, es konnte also deutlich weniger Selumetinib detektiert werden. Bei Well 6 ist der Großteil von Selumetinib schon von den Membran aufgenommen worden.

4.3.2 Plasmaproteinbindung

Bei der Plasmaproteinbindung kam es zu den folgenden Ergebnissen:

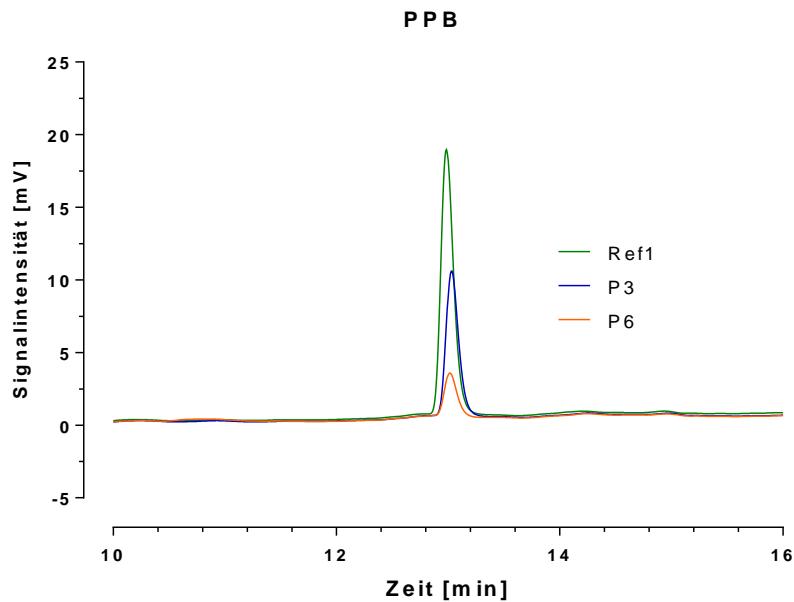


Abbildung 37: PPB von drei verschiedenen Wells

Tabelle 13: PPB in den 8 Wells

Inhalt des Wells	Peakfläche
Referenz 1	144,4
PPB 1	121,0
PPB 2	105,0
PPB 3	79,4
PPB 4	60,0
PPB 5	39,1
PPB 6	24,0
Referenz 2	166,3

Abbildung 37 zeigt, dass Referenz 1 keine Bindung eingegangen ist, weshalb hier viel Selumetinib in der Stammlösung vorhanden war, woraus ein großer Peak resultiert. Bei Well 3 konnte schon weniger Selumetinib detektiert werden, die Peakfläche ist ungefähr halb so groß und bei Well 6 noch weniger, da dies am meisten Phosphatidylcholinmembran enthält. Somit kann man gut sehen, dass die Stammlösung gut mit den mit Phosphatidylcholin überzogenen Silikat-Kügelchen zu interagieren scheint. Die mikrosomale Bindung war im Vergleich zur Plasmaproteinbindung am Schluss noch deutlich höher.

4.4 Gewebeverteilung

Von Interesse war bei den Daten, die der Computer auswarf, diesmal die AUC, da man hieran gut erkennen kann, inwieweit der Arzneistoff vom Gewebe aufgenommen und verteilt wurde. Folgende Peakflächen ergaben sich bei den unterschiedlichen Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeiten:

4.4.1 Peakfläche Herz zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten

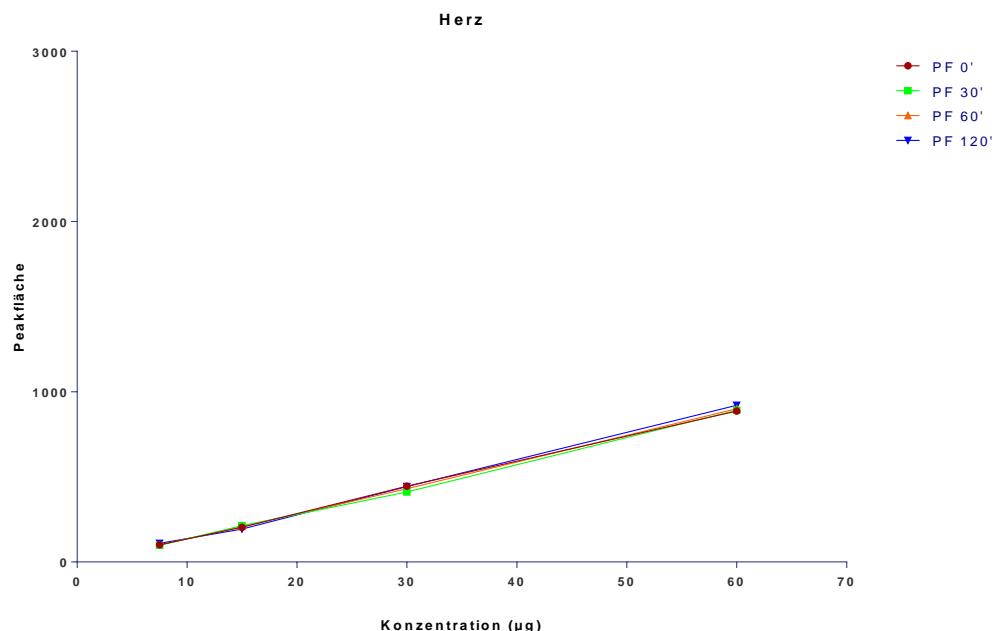


Abbildung 38: Peakflächen Herz in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit

Tabelle 14: Peakflächen Herz

Abnahmezeitpunkt	AUC bei 7,5 μl Selumetinib	AUC bei 15 μl Selumetinib	AUC bei 30 μl Selumetinib	AUC bei 60 μl Selumetinib
0 Minuten	100,6	203,3	445,0	887,0
30 Minuten	97,4	213,8	411,4	891,1
60 Minuten	98,6	207,9	430,3	900,1
120 Minuten	109,4	193,1	900,1	920,5

Wie man hier gut sehen kann, sind die Ergebnisse, was die Gewebeverteilung betrifft, in diesem Fall nicht sehr abhängig von der Zeit. Sowohl nach 0, als auch nach 30, 60 und 120 Minuten fällt das Ausmaß der Gewebeverteilung im Herz sehr ähnlich aus, weshalb in Folge bei den anderen Organen nur mehr nach 0 und nach 30 Minuten Proben zur Gewebeverteilung analysiert wurden.

4.4.2 Peakfläche Hirn zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten

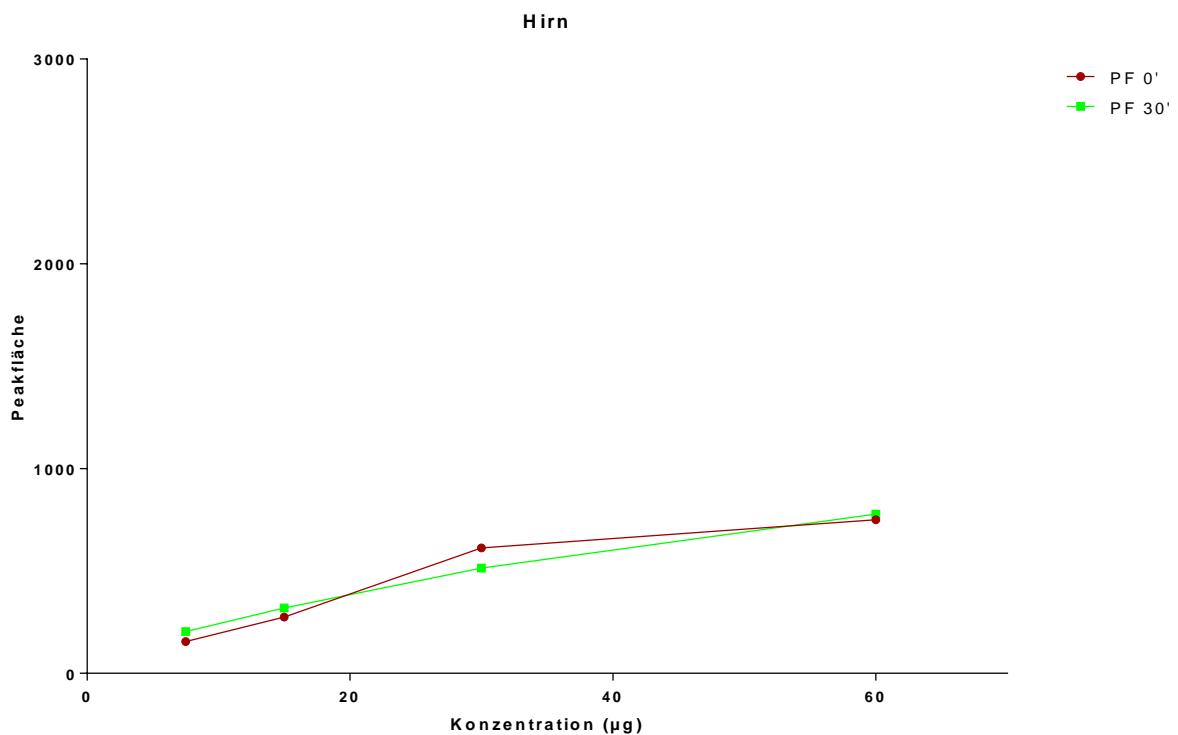


Abbildung 39: Peakflächen Hirn in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit

Tabelle 15: Peakflächen Hirn

Abnahmezeitpunkt	AUC bei 7,5 µl Selumetinib	AUC bei 15 µl Selumetinib	AUC bei 30 µl Selumetinib	AUC bei 60 µl Selumetinib
0 Minuten	155,2	275,1	612,5	749,8
30 Minuten	203,3	319,6	514,0	777,6

Vor allem bei der Konzentration von 30 µl fällt auf, dass die Peakfläche beim 30-Minuten-Peak kleiner ist, das Hirngewebe hier also doch etwas mehr Selumetinib binden konnte. Bei einer Konzentration von 60 µl sind wiederum keine großen Unterschiede erkennbar, wenn man es unter dem Aspekt der Zeit betrachtet.

4.4.3 Peakfläche Leber zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten

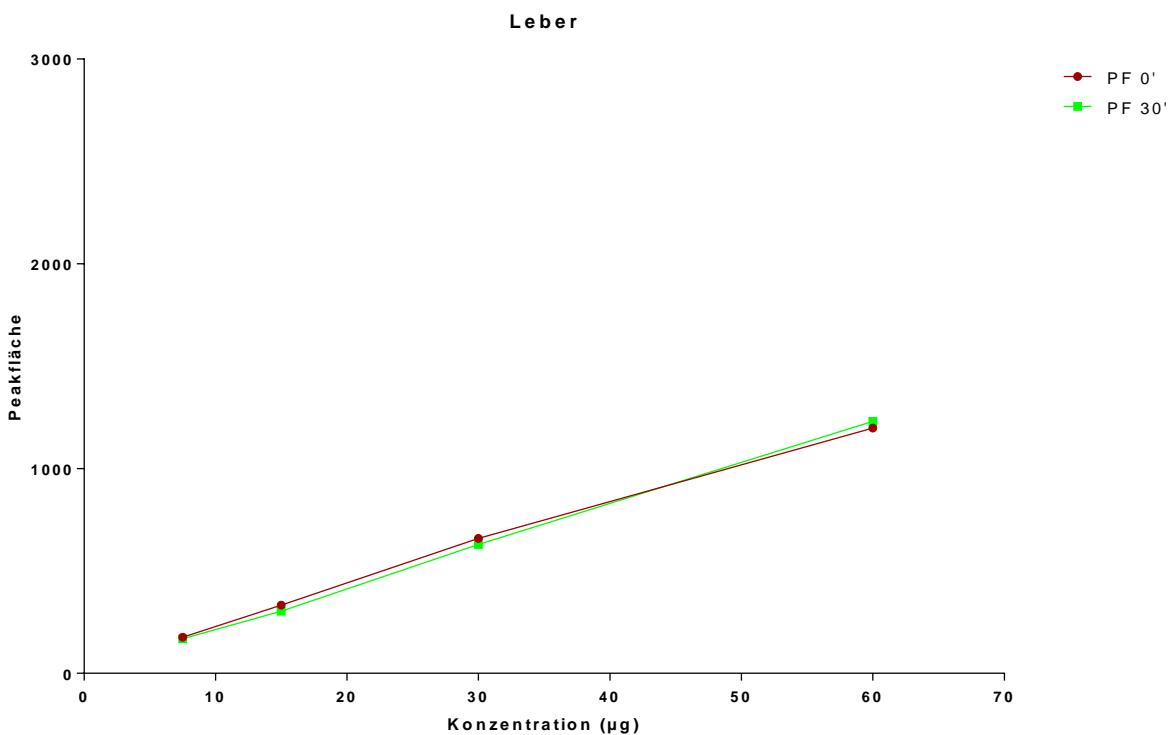


Abbildung 40: Peakflächen Leber in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit

Tabelle 16: Peakflächen Leber

Abnahmezeitpunkt	AUC bei 7,5 µl Selumetinib	AUC bei 15 µl Selumetinib	AUC bei 30 µl Selumetinib	AUC bei 60 µl Selumetinib
0 Minuten	175,8	332,4	658,8	1198,2
30 Minuten	168,9	303,1	629,6	1231,1

Auch in der Leber ist das Ausmaß der Gewebeverteilung von Selumetinib sehr ähnlich, die Unterschiede der Peakflächen nach 0 und nach 30 Minuten sind nur geringfügig. Die Gewebeverteilung selbst scheint abhängig von der Konzentration gleichmäßig zu verlaufen. Verdoppelt man die Dosis, so wird auch die Peakfläche in etwa doppelt so groß.

4.4.4 Peakfläche Lunge zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten

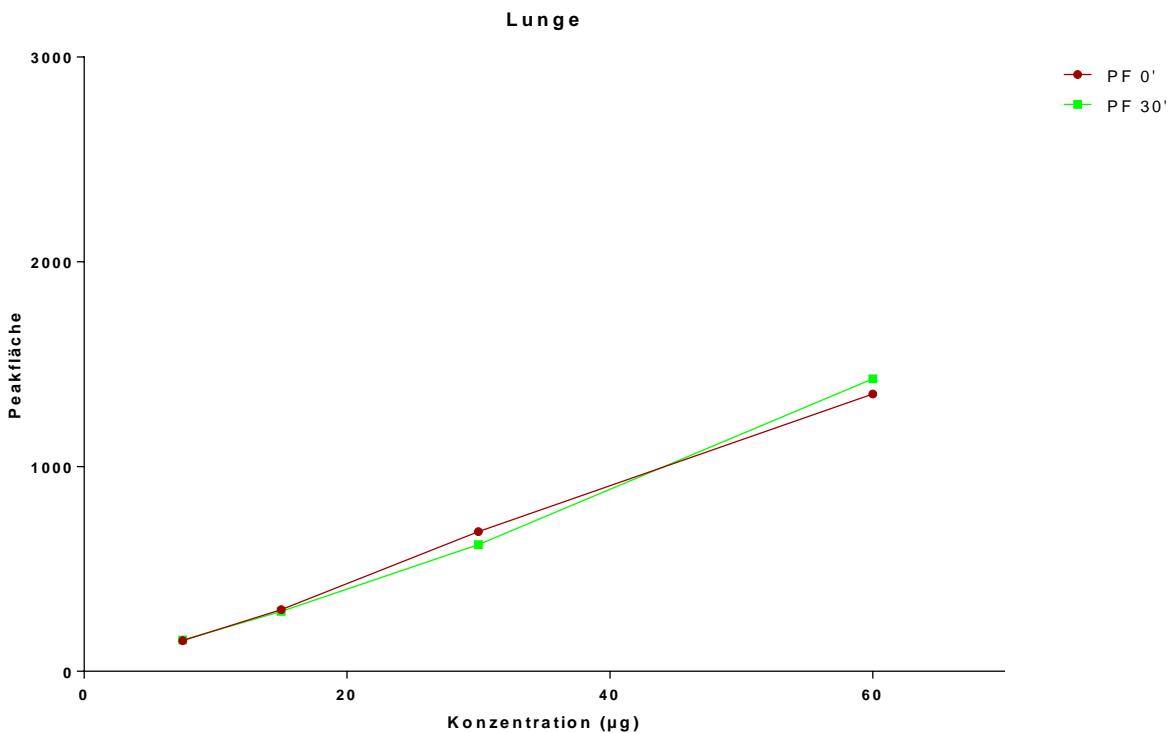


Abbildung 41: Peakflächen Lunge in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit

Tabelle 17: Peakflächen Lunge

Abnahmezeitpunkt	AUC bei 7,5 µl Selumetinib	AUC bei 15 µl Selumetinib	AUC bei 30 µl Selumetinib	AUC bei 60 µl Selumetinib
0 Minuten	149,7	301,5	682,3	1354,9
30 Minuten	153,4	293,1	618,5	1429,0

Der deutlichste Unterschied hier ist, dass bei einer Konzentration von 30 µl die Peakfläche nach 30 Minuten kleiner ist, als bei 0 Minuten, also etwas mehr Selumetinib vom Gewebe gebunden wurde. Dies ist auch bei 15 µl der Fall, jedoch in geringerem Ausmaß. Jedoch ist bei 60 µl die Peakfläche des 30-Minuten-Peaks wieder höher, als jene des 0-Minuten-Peaks, die Unterschiede also wieder nicht signifikant.

4.4.5 Peakfläche Milz zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten

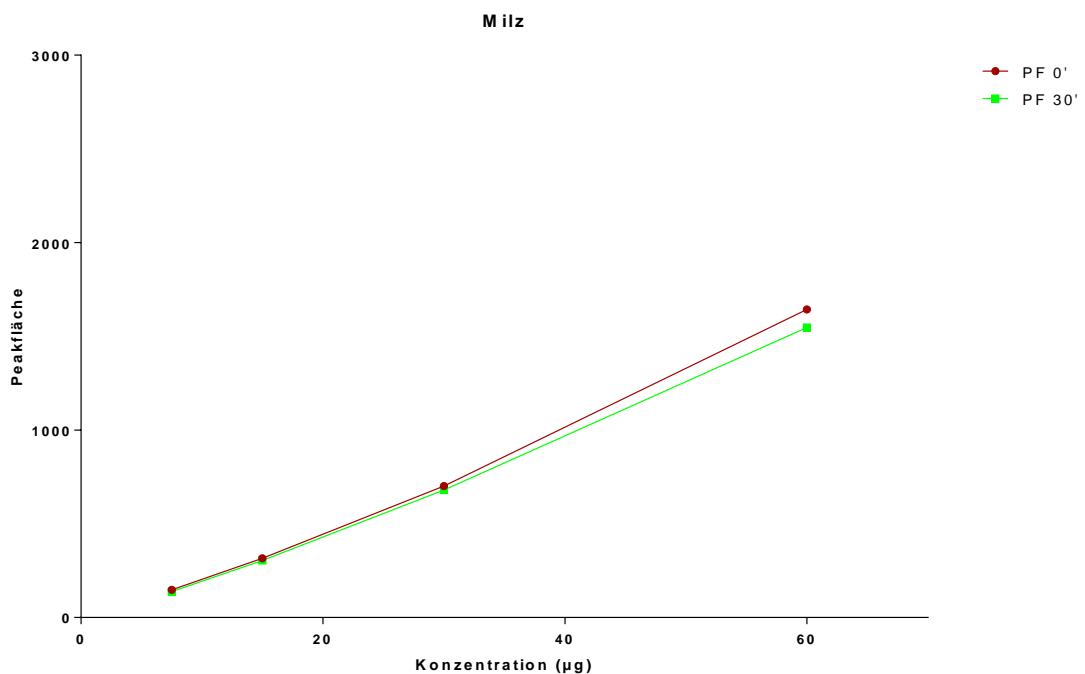


Abbildung 42: Peakflächen Milz in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit

Tabelle 18: Peakflächen Milz

Abnahmezeitpunkt	AUC bei 7,5 µl Selumetinib	AUC bei 15 µl Selumetinib	AUC bei 30 µl Selumetinib	AUC bei 60 µl Selumetinib
0 Minuten	148,1	316,3	701,6	1643,4
30 Minuten	138,1	303,9	680,2	1547,4

Am Anfang verlaufen die Linien nahezu ident, ab einer Konzentration von 30 µl wird die Peakfläche der 30-Minuten-Peaks jedoch kleiner, eine etwas höhere Gewebeverteilung hat also nach 30 Minuten in der Milz stattgefunden.

4.4.6 Peakfläche Niere zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten

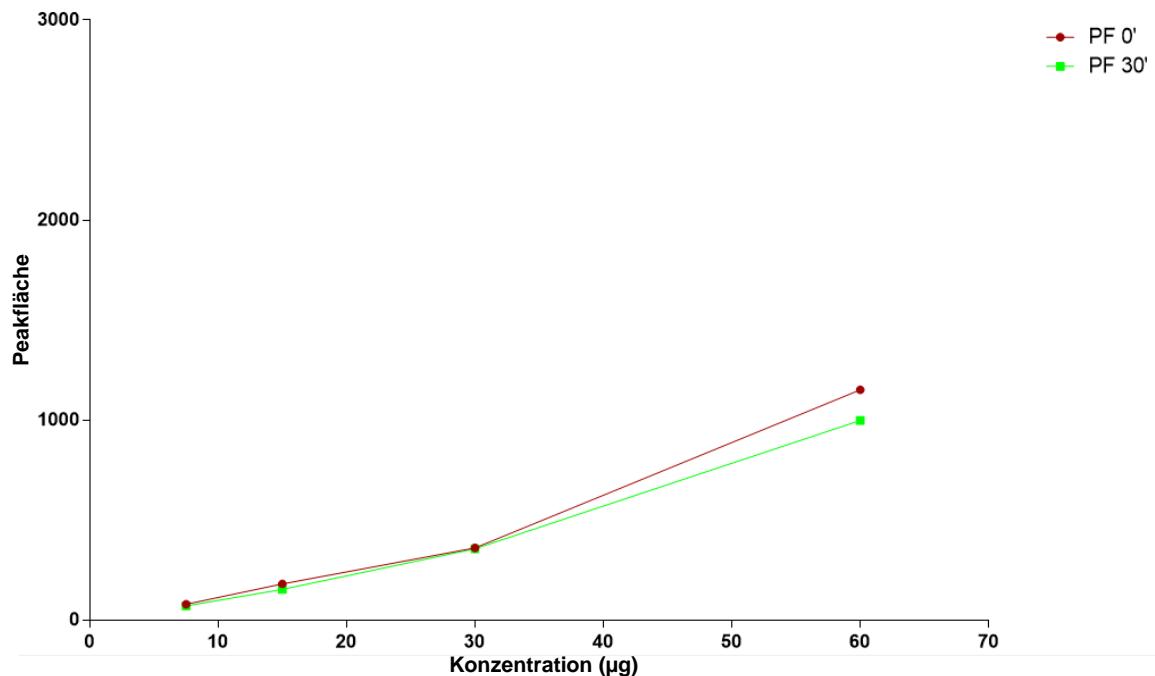


Abbildung 43: Peakflächen Niere in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit

Tabelle 19: Peakflächen Niere

Abnahmezeitpunkt	AUC bei 7,5 μl Selumetinib	AUC bei 15 μl Selumetinib	AUC bei 30 μl Selumetinib	AUC bei 60 μl Selumetinib
0 Minuten	78,6	180,8	360,1	1150,7
30 Minuten	70,0	153,0	356,0	998,0

Nach 30 Minuten ist die Gewebeverteilung in der Niere etwas gestiegen.

4.4.7 Peakfläche Schwarze zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten

Bei den Werten handelt es sich um einen Mittelwert aus zwei Probendurchgängen, da sich die Schwarze nur sehr schwer homogenisieren ließ und die Gefahr bestand, dass die erste Bestimmung dadurch zu ungenau ausgefallen war. Die Werte der beiden Bestimmungen waren einander jedoch sehr ähnlich.

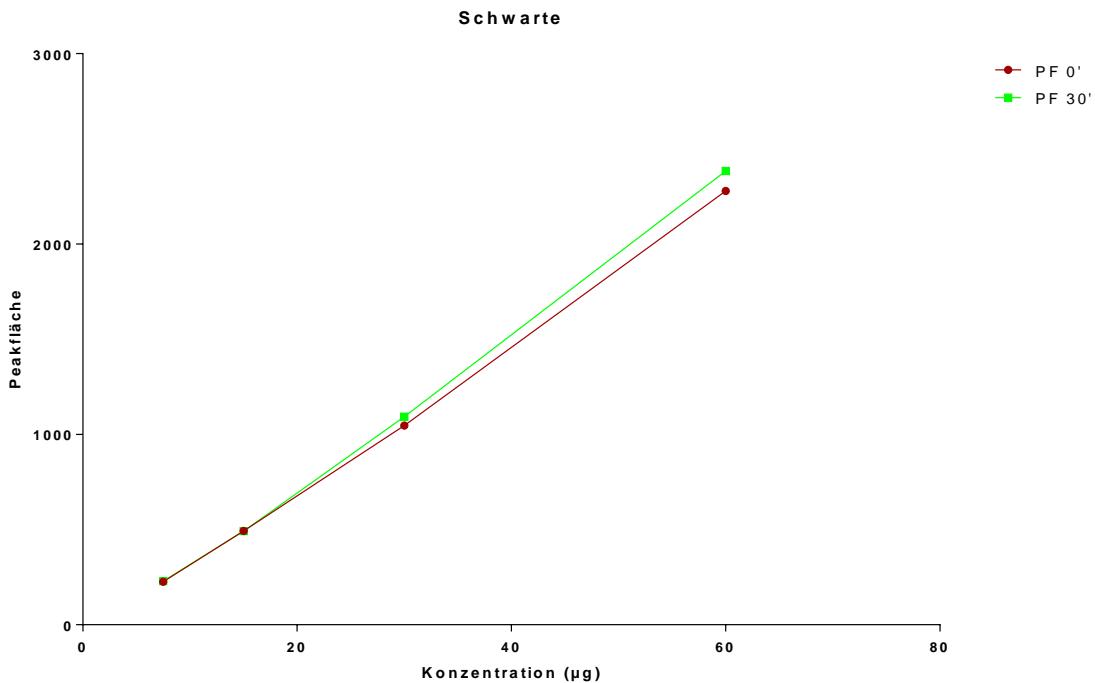


Abbildung 44: Peakflächen Schwarze in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit

Tabelle 20: Peakflächen Schwarze

Abnahmezeitpunkt	AUC bei 7,5 µl Selumetinib	AUC bei 15 µl Selumetinib	AUC bei 30 µl Selumetinib	AUC bei 60 µl Selumetinib
0 Minuten	223,4	485,7	1021,8	2313,4
30 Minuten	221,4	475,0	1040,6	2384,9

Die Peakfläche ist nach 30 Minuten etwas höher, aber nur sehr wenig. Schwarze ist ein sehr lipophiles Gewebe, das aus dem Grund kaum Selumetinib aufnehmen konnte.

4.5 Wiederfindung

Bei den Ergebnis-Werten der Wiederfindung wurden rechnerisch 20% abgezogen, weil der Wert der Peakfläche ohne korpuskulärem Anteil von Interesse war, also das Gewebe wurde abgezogen und so die effektive Peakfläche erhalten. Anschließend wurden die Peakflächen auf Prozent umgerechnet. Die folgenden Tabellen enthalten sowohl die Werte für die Peakflächen, als auch die Prozent-Werte.

4.5.1 Selumetinib in ACN

Die ersten Wiederfindungsversuche wurden durchgeführt, um einmal prinzipiell herauszufinden, in welchem Lösungsmittel mehr Selumetinib wiedergefunden werden konnte und wie gut das Gewebe in den verschiedenen Lösungsmitteln homogenisiert wurde, woraus rückgeschlossen werden konnte, mit Hilfe welchen Lösungsmittels Selumetinib besser in das Gewebe eindringen konnte. Dies war aber auch immer abhängig vom Gewebe selbst, vor allem von seinen hydrophilen und lipophilen Eigenschaften. Daher waren die Wiederfindungsraten in den verschiedenen Gewebetypen zum Teil sehr unterschiedlich.

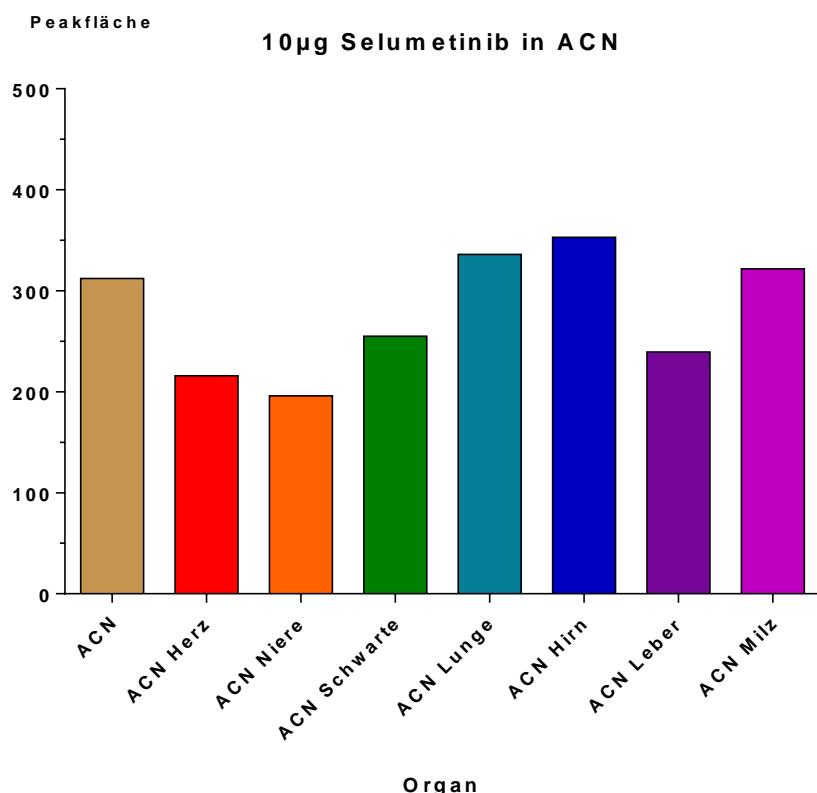


Abbildung 45: Peakflächen-Werte Selumetinib in ACN

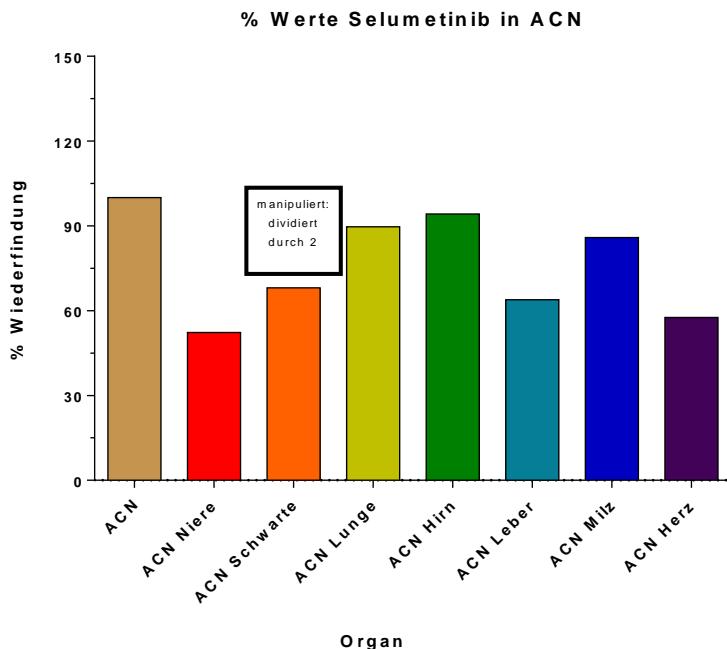


Abbildung 46: Prozent-Werte Selumetinib in ACN

Tabelle 21: Wiederfindung Selumetinib in ACN

Organ	Peakfläche ACN	% Wert ACN
Leerwert ACN (Mittelwert)	312,1	100 %
Niere	196,0	52,3 %
Schwarze	255,0	68,1 %
Lunge	336,0	89,7 %
Hirn	352,9	94,2 %
Leber	239,4	63,9 %
Milz	321,6	85,9 %
Herz	215,9	57,6 %

Besonders die Lunge, das Hirn und die Milz haben hier wenig Selumetinib aufgenommen, daher konnte der Großteil von Selumetinib wiedergefunden werden. Der Wert der Schwarze wurde hier manipuliert, da von einem Fehler bei der Probenaufbereitung ausgegangen und angenommen wurde, dass es sich beim realen Wert, um etwa die Hälfte handelt. Die Schwarze bereitete aufgrund ihrer Lipophilie etwas Probleme bei der Homogenisierung.

Bei Niere und Herz wurde fast die Hälfte Selumetinib aufgenommen. Das Hirn-Gewebe wies die geringste Gewebepermeation auf, hier betrug die Wiederfindung 94,2%.

4.5.2 Selumetinib in PBS

Parallel zur Aufbereitung der Proben mit ACN, wurden auch Proben mit PBS aufbereitet, also 10 µl Selumetinib in 990 µl PBS gelöst, aufbereitet und mittels HPLC ausgewertet.

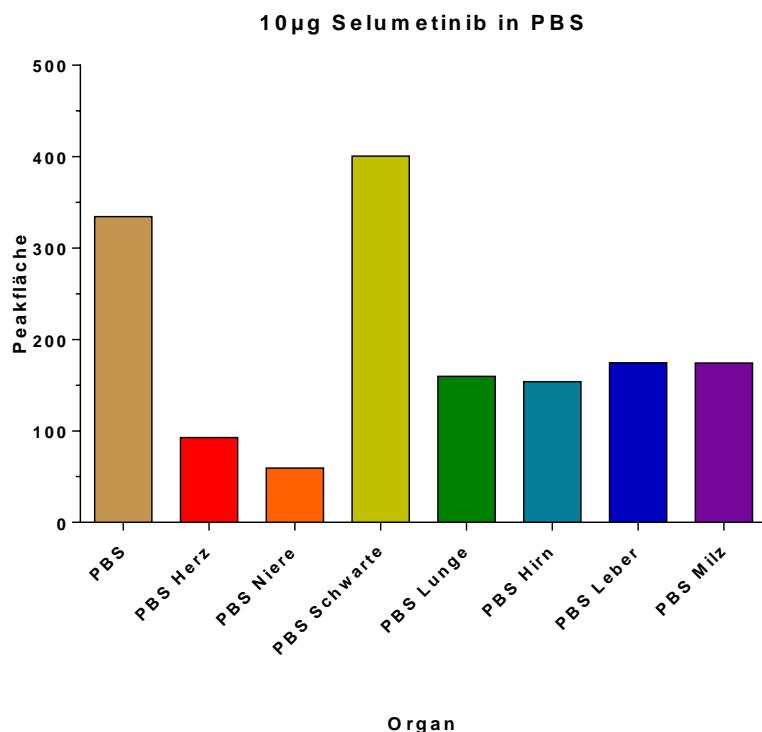


Abbildung 47: Peakflächen-Werte Selumetinib in PBS

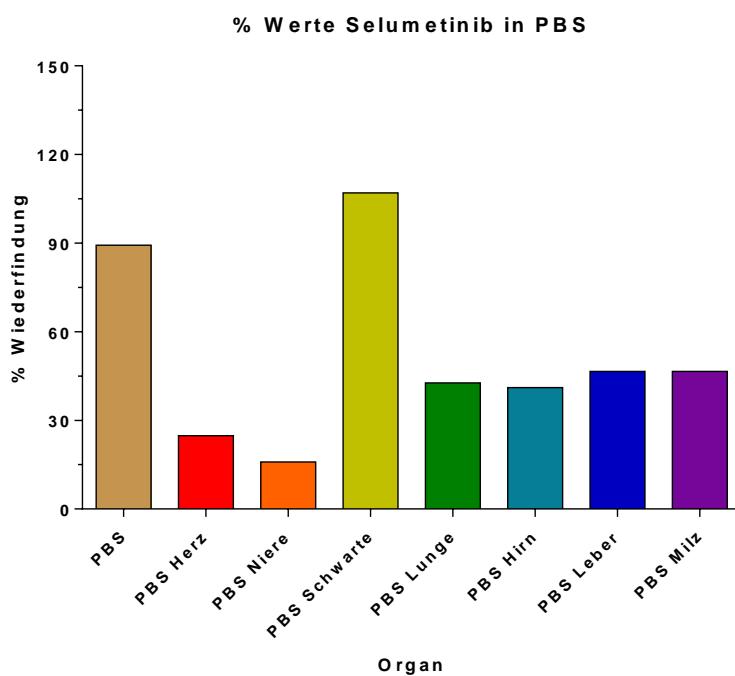


Abbildung 48: Prozent-Werte Selumetinib in PBS

Tabelle 22: Wiederfindung Selumetinib in PBS

Organ	Peakfläche PBS	% Wert PBS
Leerwert PBS (Mittelwert)	334,5	89,3 %
Herz	92,7	24,8 %
Niere	59,4	15,9 %
Schwarte	400,6	107,0 %
Lunge	159,8	42,7 %
Hirn	154,0	41,1 %
Leber	174,6	46,6 %
Milz	174,4	46,6 %

Wird Selumetinib in PBS gelöst, wird es also meist deutlich besser vom Gewebe aufgenommen, wie wenn es in ACN gelöst wurde. Lediglich ins Schwarten-Gewebe konnte kaum Selumetinib penetrieren, dies hängt mit dessen hoher Lipophilie und der hohen Lipophilie von Selumetinib zusammen. PBS scheint auf jeden Fall so gesehen geeigneter als Lösungsmittel zu sein. Das hängt auch damit zusammen, dass in ACN die Proteine sofort ausgefällt wurden und sich das Gewebe in Folge viel weniger gut homogenisieren ließ. Vor allem die Schwarte, aber auch die Niere bereiteten beim Homogenisieren in ACN Probleme.

4.5.3 Selumetinib und Docetaxel 10 µg

In Folge wurde untersucht, ob 10 µg Selumetinib in Kombination mit 10 µg Docetaxel zu einer höheren Gewebepermeation führt, wie wenn der Tyrosin-Kinase-Hemmer alleine verabreicht wird. Eine oben erwähnte Studie konnte feststellen, dass Docetaxel besser wirkt, wenn es in Kombination mit Selumetinib verabreicht wird. Nun galt es herauszufinden, ob dies auch für Selumetinib gilt. Dies wurde anhand von Gewebe von dem Herz, der Lunge, der Milz und der Niere untersucht. Dabei kam es zu folgenden Ergebnissen:

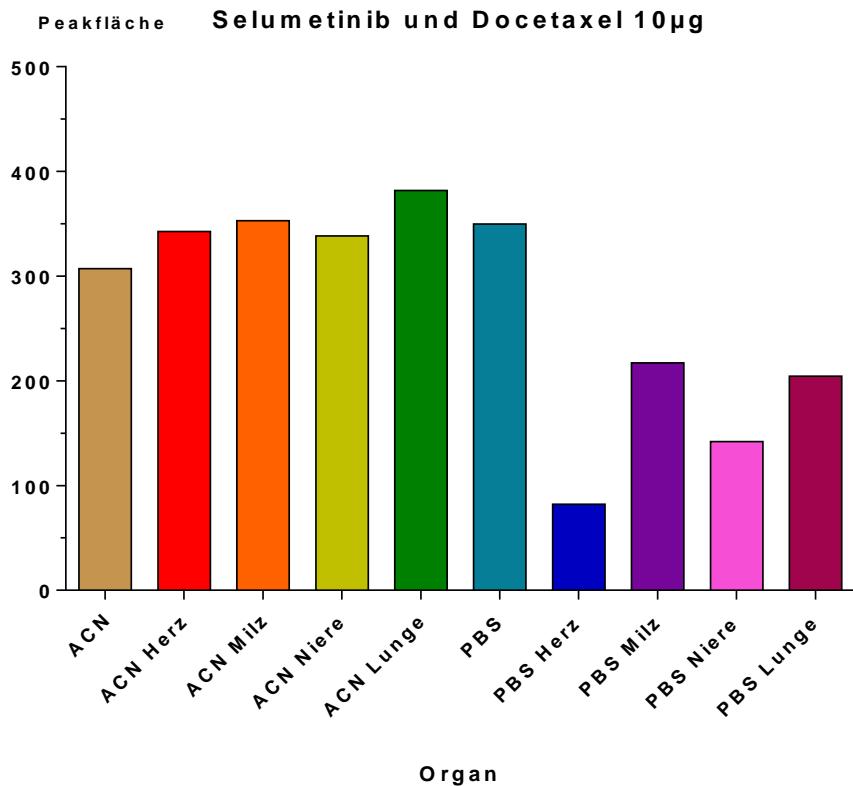


Abbildung 49: Peakflächen-Werte Selumetinib und Docetaxel 10 µg

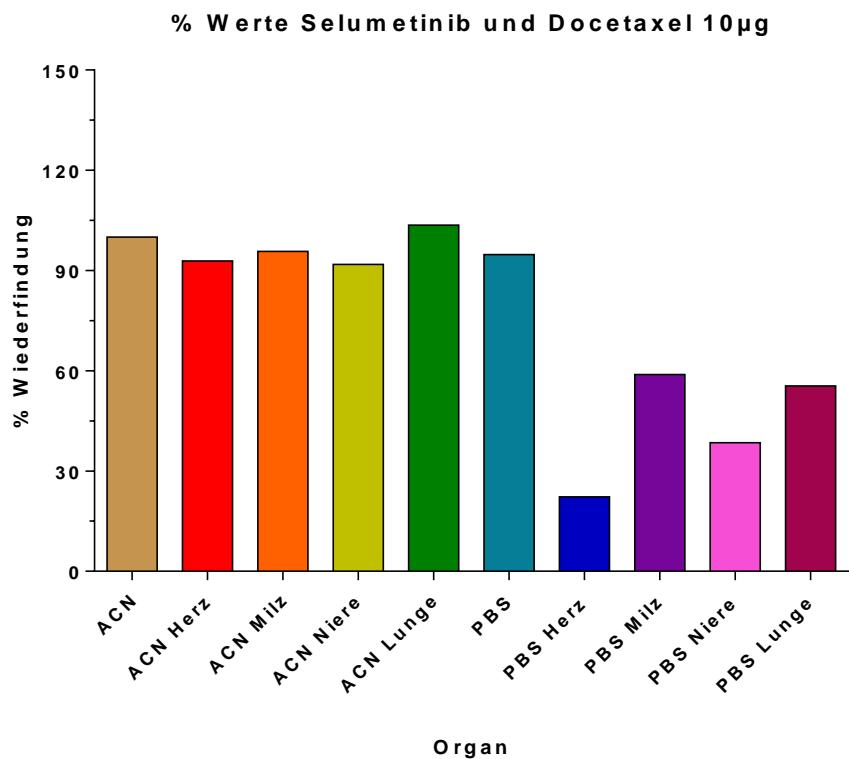


Abbildung 50: Prozent-Werte Selumetinib und Docetaxel 10 µg

Tabelle 23: Wiederfindung 10 µg Selumetinib und 10 µg Docetaxel

Organ	Peakfläche ACN	% Wert ACN	Peakfläche PBS	%-Wert PBS
Leerwert	307,3	100 %	349,7	94,8 %
Herz	342,6	92,9 %	82,3	22,3 %
Milz	353,0	95,7 %	217,1	58,9 %
Niere	338,4	91,8 %	141,9	38,5 %
Lunge	381,9	103,6 %	204,5	55,5 %

Die Wiederfindungswerte im Lösungsmittel ACN sind noch höher geworden, sie liegen alle über 90%. Die Wiederfindung mit dem Lösungsmittel PBS ist wie auch beim Versuch ohne Docetaxel deutlich geringer als mit dem Lösungsmittel ACN. Vor allem das Gewebe vom Herz und der Niere haben recht niedrige Wiederfindungswerte.

Was die Kombination mit Docetaxel betrifft, so penetrierte unter diesen Bedingungen nicht mehr Selumetinib ins Gewebe, wie wenn es alleine verabreicht wurde. So fand nur beim Herz in PBS eine höhere Gewebepermeation von Selumetinib in Kombination mit Docetaxel statt, wie von Selumetinib alleine, jedoch lediglich um 2,5 Prozent. Hingegen wurde Selumetinib ansonsten alleine vermehrter aufgenommen als in Kombination mit Docetaxel, beispielsweise in der Niere mit dem Lösungsmittel PBS wurde um 22,6 Prozent mehr aufgenommen. Auch die ACN-Werte waren mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor alleine niedriger, wie in Kombination mit Docetaxel. Es deutet also hier nichts darauf hin, dass Selumetinib in Kombination mit Docetaxel vermehrt aufgenommen wird, sondern vielmehr, dass das Gegenteil der Fall ist.

4.5.4 Selumetinib und Docetaxel 20 µg

Nun wurde untersucht, ob eine höhere Menge von Docetaxel zu einer verstärkten Aufnahme von Selumetinib führt. Es wurden diesmal wieder 10 µg Selumetinib-Lösung, jedoch 20 µg Docetaxel-Lösung mit Lösungsmittel und Gewebe gemischt, aufbereitet und analysiert. Man gelangte zu folgenden Ergebnissen:

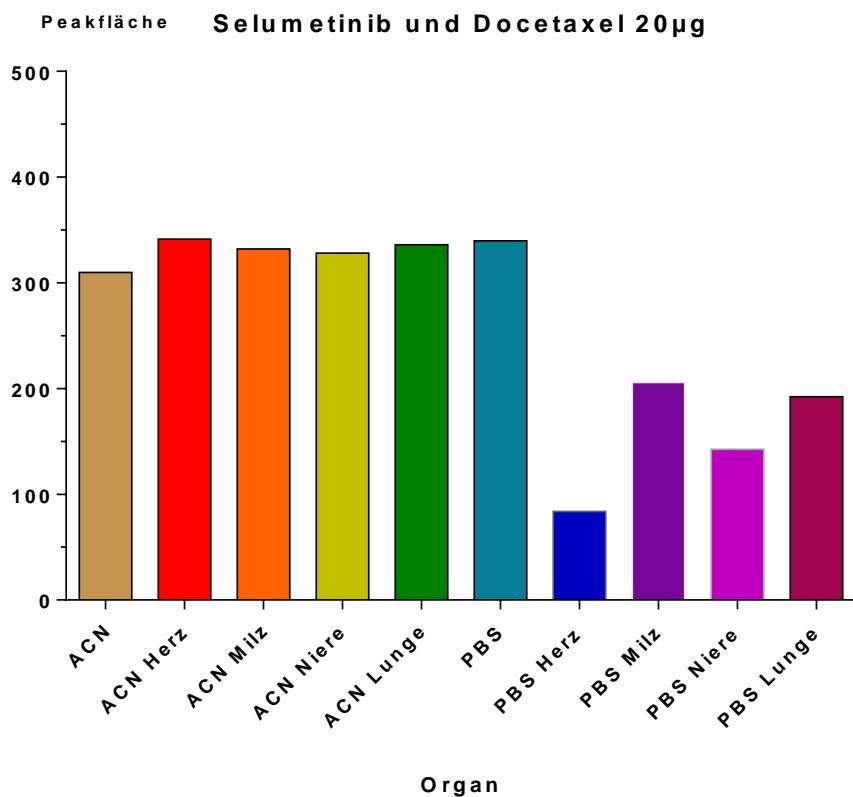


Abbildung 51: Peakflächen-Werte Selumetinib und Docetaxel 20 µg

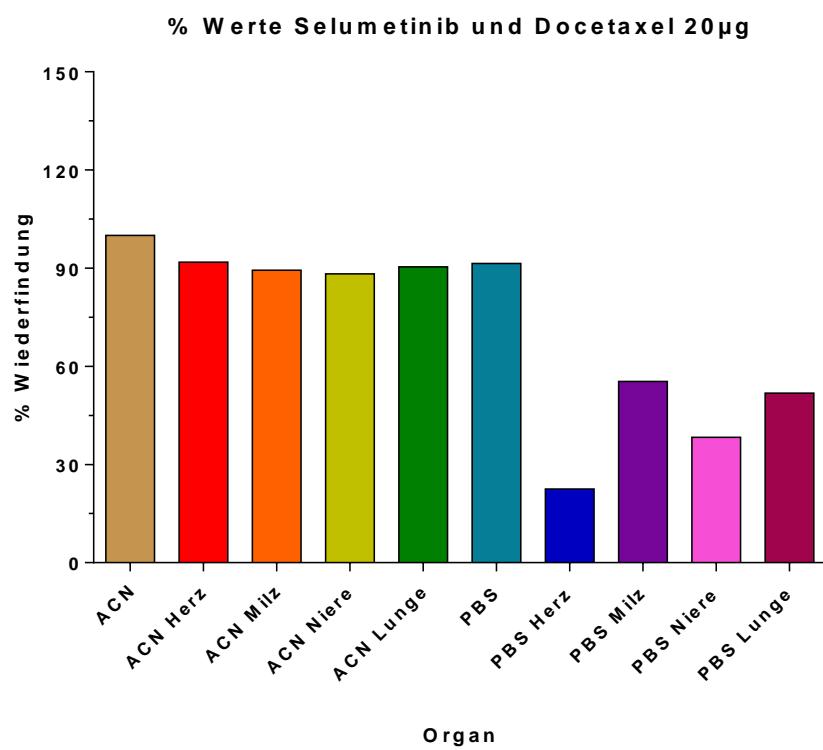


Abbildung 52: Prozent-Werte Selumetinib und Docetaxel 20 µg

Tabelle 24: Wiederfindung Selumetinib und Docetaxel 20 µg

Organ	Peakfläche ACN	% Wert ACN	Peakfläche PBS	%-Wert PBS
Leerwert	309,7	100 %	339,8	91,4%
Herz	341,2	91,8 %	83,7	22,5 %
Milz	332,1	89,4 %	205,8	55,4 %
Niere	328,0	88,3 %	142,5	38,3 %
Lunge	336,1	90,4 %	192,4	51,8 %

Diese Ergebnisse waren den Ergebnissen der Kombination aus 10 µg Selumetinib-Lösung und 10 µg Docetaxel-Lösung sehr ähnlich, jedoch war die Wiederfindung bei 20 µg immer etwas geringer. Erhöht man die Menge von Docetaxel, so wird also anscheinend etwas mehr Selumetinib aufgenommen, als bei niedrigerer Docetaxel-Menge, jedoch beträgt der Unterschied meist nur wenige Prozent.

Vergleicht man diese Versuche mit den Versuchen, wo Selumetinib alleine verwendet wurde, so kommt man zu folgenden Schlüssen: Lediglich beim Herz war es so, dass die Kombination Selumetinib und Docetaxel zu einer um 2,3% erhöhten Aufnahme führte, bei den anderen drei Organen stellte sich heraus, dass bei Verabreichung von Selumetinib alleine die Wiederfindung deutlich geringer ausfällt. Bei ACN waren die Unterschiede bei der Milz und der Lunge sehr gering, beim Herz und bei der Niere stellte sich auch hier heraus, dass die Gabe von Selumetinib allein zu einer geringeren Wiederfindung führte (zum Beispiel Herz-Gewebe: eine Wiederfindung mit Selumetinib alleine von 57,6 Prozent vs. eine Wiederfindung mit Selumetinib und Docetaxel 20 µg von 91,8 Prozent). Auch hier lässt sich also eindeutig feststellen, dass die Kombination von Selumetinib-Lösung mit 20 µg Docetaxel-Lösung zu keiner höheren Gewebepermeation geführt hat.

4.5.5 Selumetinib und Docetaxel 10 µg nach 24 Stunden

Zu guter Letzt war es noch von Interesse, ob die verschiedenen Gewebe mehr Selumetinib in sich aufnehmen, wenn man sie 24 Stunden lang stehen lässt und somit deutlich mehr Zeit für Gewebepermeation der Selumetinib-Lösung gegeben ist. Aus diesem Grund wurden hier die aufbereiteten Proben mit 10 µg Selumetinib-Lösung und 10 µg Docetaxel-Lösung 24 Stunden lang stehen gelassen und dann mittels HPLC-Methode analysiert.

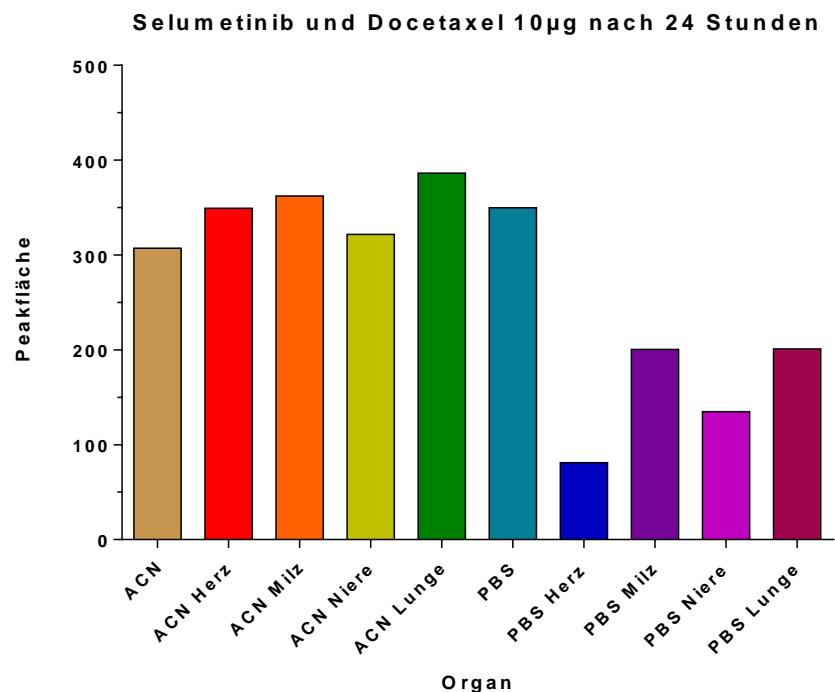


Abbildung 53: Peakflächen-Werte Selumetinib und Docetaxel 10 μ g nach 24 Stunden

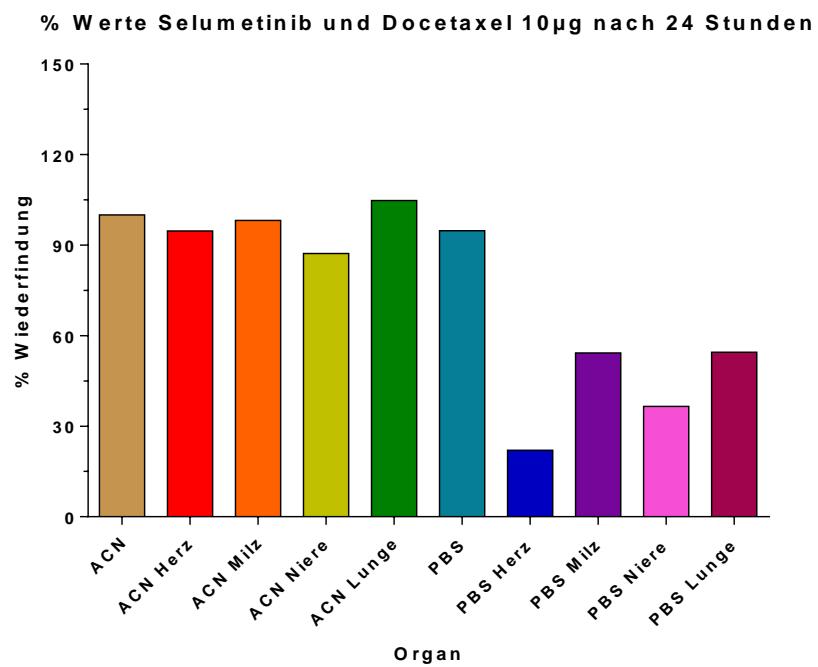


Abbildung 54: Prozent-Werte Selumetinib und Docetaxel 10 μ g nach 24 Stunden

Tabelle 25: Wiederfindung Selumetinib und Docetaxel 10 µg nach 24 Stunden

Organ	Peakfläche ACN	% Wert ACN	Peakfläche PBS	%-Wert PBS
Leerwert	307,3	100	349,7	94,8
Herz	349,2	94,7	81,0	22,0
Milz	362,1	98,2	200,4	54,3
Niere	321,6	87,2	134,8	36,6
Lunge	386,3	104,8	201,1	54,5

Wie immer war auch hier der Wert vom Herz-Gewebe in PBS am auffallendsten, denn hier ist mit 22,0% die geringste Wiederfindung. Jedoch unterscheiden sich die Ergebnisse nur wenig von jenen, die gleich aufbereitet wurden, jedoch keine 24 Stunden gewartet wurde, wobei die Wiederfindung nach 24 Stunden in PBS bei allen vier Organen sowie in ACN beim Nierengewebe etwas niedriger war. Jedoch betragen die Unterschiede hier wenige Prozent, beim Herz-Gewebe in PBS sogar weniger als 1 Prozent. Beim Gewebe von Herz, Milz und Lunge in ACN kam überhaupt heraus, dass die Wiederfindung nach 24 Stunden etwas höher anstatt niedriger geworden war.

Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch hier schlussendlich herauskam, dass weder die Kombination von Selumetinib-Lösung mit 10 µg Docetaxel-Stammlösung noch das 24-stündige Stehenlassen zu einer Erhöhung der Gewebepenetration führt. Bis auf das Herz, wo die Wiederfindungsrate um 2,8 Prozent geringer war, waren im Lösungsmittel PBS die Werte allesamt niedriger, als wenn Selumetinib alleine verabreicht wurde. In ACN waren die Werte, wie erwähnt, meist nach 24 Stunden verändert im Vergleich zu gleich aufbereiteten Proben, die sofort analysiert wurden (beim Herz eine Erhöhung um 1,8%, bei der Milz eine Erhöhung um 2,5%, bei der Niere eine Erniedrigung um 4,6% und bei der Lunge eine Erhöhung um 1,2%), das heißt nach 24 Stunden war sowohl die Gewebepermeation des Herzens, also auch der Milz und der Lunge niedriger geworden. Gleichzeitig waren fast alle Werte weniger niedrig, (bis auf die Werte für das Herz-Gewebe in PBS, welches aber vernachlässigbar ist, da der Unterschied sehr gering war), also die Wiederfindung in Kombination mit Docetaxel fast immer höher, als wenn Selumetinib alleine verabreicht wurde. Das heißt die Aufnahmefähigkeit steigt nicht, wenn man das Homogenisat 24 Stunden lang stehen lässt und es ist fast immer viel effektiver Selumetinib alleine zu verabreichen, egal welches Lösungsmittel man dazu verwendet und egal um welches Gewebe es sich handelt.

4.5.6 Selumetinib und Docetaxel 20 µg nach 24 Stunden

Auch die Kombination von 10 µg Selumetinib-Lösung und der doppelt so hohen Dosis Docetaxel-Lösung wurde auf den 24 Stunden-Wert hin untersucht. Dabei erhielt man die folgenden Werte:

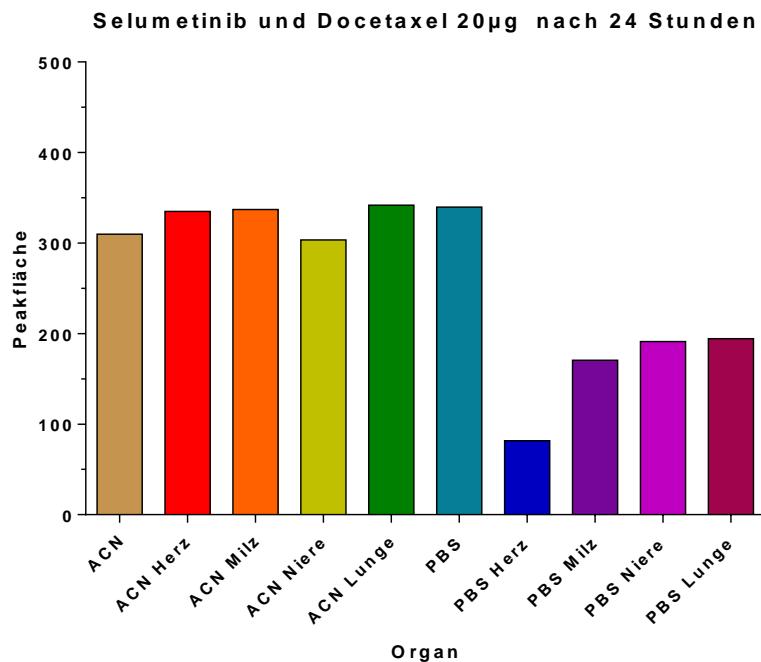


Abbildung 55: Peakflächen-Werte Selumetinib und Docetaxel 20 µg nach 24 Stunden

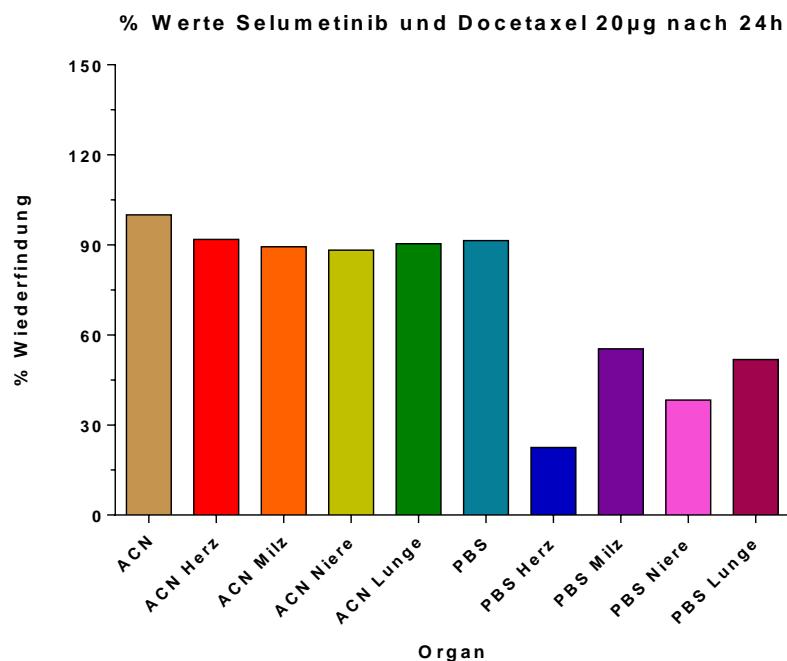


Abbildung 56: Prozent-Werte Selumetinib und Docetaxel 20 µg nach 24 Stunden

Tabelle 26: Wiederfindung Selumetinib und Docetaxel 20 µg nach 24 Stunden

Organ	Peakfläche ACN	% Wert ACN	Peakfläche PBS	% Wert PBS
Leerwert	309,7	100 %	339,8	91,4 %
Herz	334,9	90,1 %	81,7	22,0 %
Milz	337,1	90,7 %	170,7	45,9 %
Niere	303,5	81,7 %	191,3	51,5 %
Lunge	341,9	92,0 %	194,5	52,3 %

Es stellte sich also heraus, dass die Werte sich sowohl in ACN, als auch in PBS zum Teil etwas verringerten, genauso oft jedoch auch erhöhten, nachdem man die Homogenisate 24 Stunden lang stehen gelassen hatte. Die Unterschiede betragen aber immer nur wenige Prozent oder sogar unter einem Prozent. Lediglich beim Nierengewebe in PBS betrug der Unterschied 13,2 Prozent zugunsten des Homogenisats, das sofort untersucht worden war. Bei diesem Vergleich konnte also festgestellt werden, dass das 24-stündige Stehenlassen zu keiner oder nur einer sehr geringfügigen Erhöhung der Gewebepermeation führt, jedoch auch, wie beispielsweise im Falle des Nierengewebes, eine Erniedrigung der Gewebepermeation mit sich bringen kann. Es scheint keine Vorteile zu bringen, wenn man die Proben 24 Stunden lang stehen lässt.

Und auch hier ist es wieder so, dass es meist deutlich effektiver zu sein scheint, wenn Selumetinib alleine verabreicht wird. So wird Selumetinib mit dem Lösungsmittel PBS im Herz zwar um 2,8% weniger aufgenommen, jedoch in der Milz um 0,7% mehr, in der Niere um 35,6% mehr und in der Lunge um 9,6 % mehr. In ACN war bei allen vier Organen die Wiederfindungsrate niedriger, wenn Selumetinib alleine und ohne 24 Stunden zu warten, verabreicht wurde:

- Herz: 32,5 % weniger Wiederfindung
- Milz: 4,8 % weniger Wiederfindung
- Niere: 29,4 % weniger Wiederfindung
- Lunge: 2,3 % weniger Wiederfindung

Es wird dadurch deutlich, dass vor allem beim Herz und bei der Niere große Unterschiede zu entdecken sind, die auch bei den anderen Vergleichen in ähnlicher Form vorliegen. Das heißt hier wäre es wirklich kein Vorteil, wenn man Selumetinib mit Docetaxel kombiniert, egal ob

man es mit 10 µg oder 20 µg Docetaxel kombiniert. Falls man es dennoch tut, so kommt es durch 24-stündiges Stehenlassen bei Herz und Niere zu kleinen Verbesserungen.

Alles in allem deuten die Ergebnisse klar darauf hin, dass die Wiederfindung von Selumetinib sowohl in ACN also auch in PBS am niedrigsten ist, wenn Selumetinib alleine verabreicht ist und sowohl die Kombination mit Docetaxel als auch das 24-stündige Stehenlassen, in der Regel zu keinerlei Erhöhung der Gewebepermeation, sondern oft sogar zu deutlicher Erniedrigung dieser führen.

4.6 Hepatozyten

Bei diesem Versuch mit Hepatozyten von Ratten gab es insgesamt vier Ansätze und zwar mit 10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM. Dabei ergaben sich folgende Werte für die Peakflächen:

Tabelle 27: Hepatozyten Peakflächen-Werte

Inkubationszeit	Peakfläche Selumetinib 10 µM	Peakfläche Selumetinib 50 µM	Peakfläche Selumetinib 100 µM	Peakfläche Selumetinib 200 µM
0 min	374,7	2245,4	3511,9	7065,3
15 min	365,4	1853,1	3429,6	7051,6
30 min	99,2	1874,1	3371,7	7289,9
60 min	350,9	1713,4	3636,2	7044,0
120 min	306,3	1615,3	3024,9	6546,6
180 min	244,8	1333,9	3372,8	6620,2
240 min	209,8	1605,9	3168,2	7171,0
300 min	174,6	1168,9	3209,5	7503,2
1440 min	30,5	1043,2	3200,7	7077,2

Im Folgenden sind die Chromatogramme des 10 µM-Ansatzes beispielhaft dargestellt. Man kann hier gut sehen, wie sich mit der Zeit links und rechts vom Selumetinib-Peak Metabolite bilden.

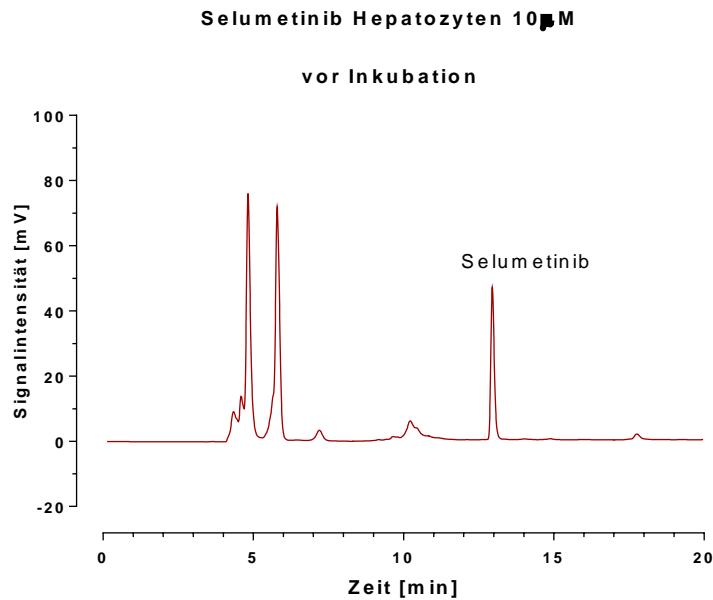


Abbildung 57: Hepatozyten mit 10 μ M Selumetinib nach 0 Minuten

Hier sieht man deutlich den Selumetinib-Peak, jedoch haben sich noch keine Metabolite gebildet. Die erste Probenentnahme erfolgt vor der Inkubation, also nach 0 Minuten. Die Substanzen hatten also noch wenig Möglichkeit miteinander zu reagieren. Am Beginn sieht man einen Doppel-Peak, dies stellt den Standard-Peak dar.

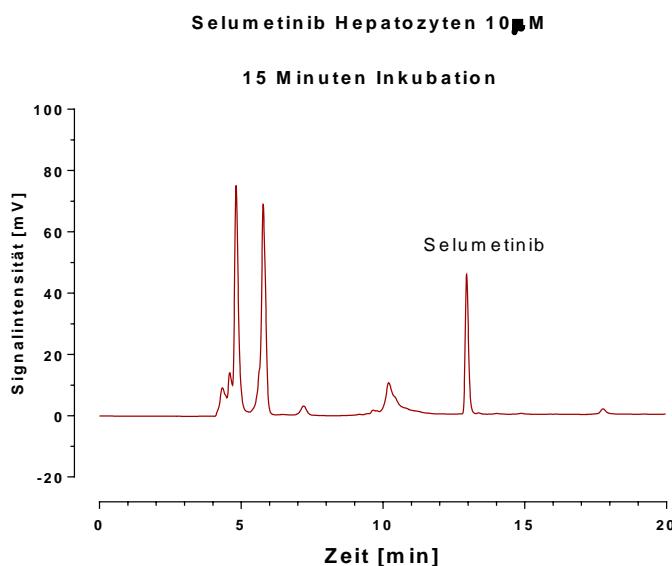


Abbildung 58: Hepatozyten mit 10 μ M Selumetinib nach 15 Minuten

Hier hat sich noch nicht allzu viel verändert, der Selumetinib-Peak sieht noch sehr ähnlich aus, wie vor der Inkubation, er ist lediglich geringfügig kleiner geworden, die AUC hat sich also in den 15 Minuten der Inkubation etwas verringert.

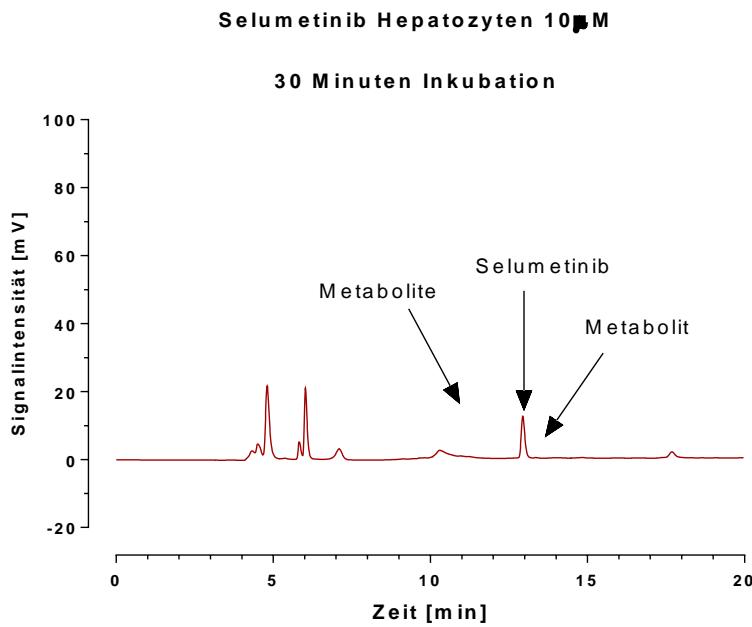


Abbildung 59: Hepatozyten mit 10 μ M Selumetinib nach 30 Minuten

Nach 30 Minuten ist die AUC des Selumetinib-Peaks schon deutlich kleiner geworden, zudem lassen sich nun schon in Ansätzen kleine Metabolite erkennen.

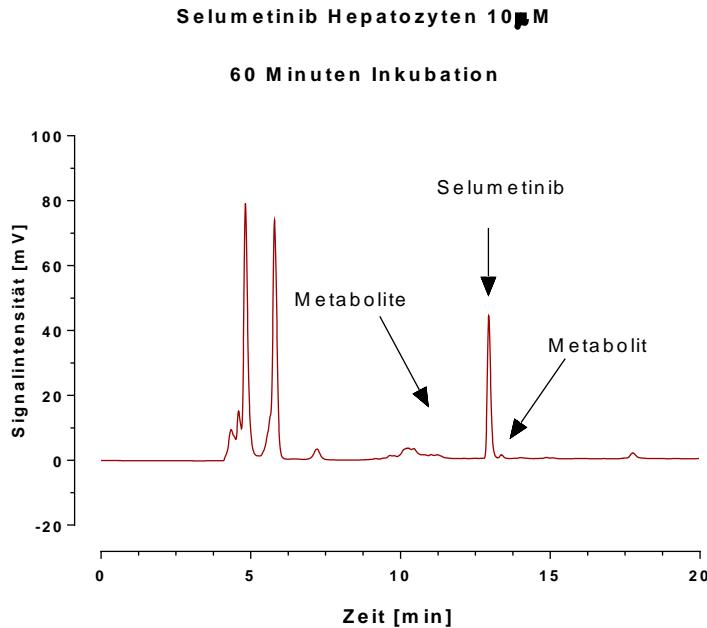


Abbildung 60: Hepatozyten mit 10 μ M Selumetinib nach 60 Minuten

Der Selumetinib-Peak ist wieder größer geworden, deutlich und scharf, die Metabolite links und rechts lassen sich nun schon besser erkennen.

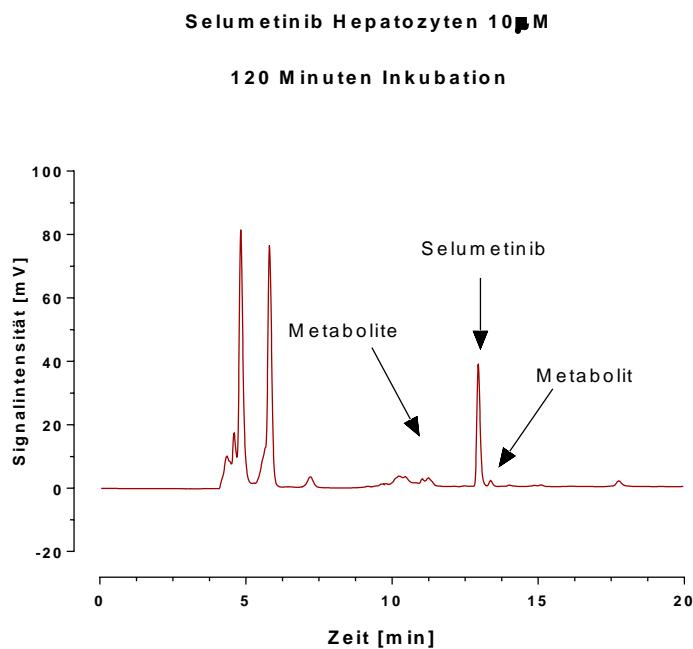


Abbildung 61: Hepatozyten mit 10 μ M Selumetinib nach 120 Minuten

Die Signalintensität des Selumetinib-Peaks hat wieder abgenommen, die Metabolite sind gut erkennbar.

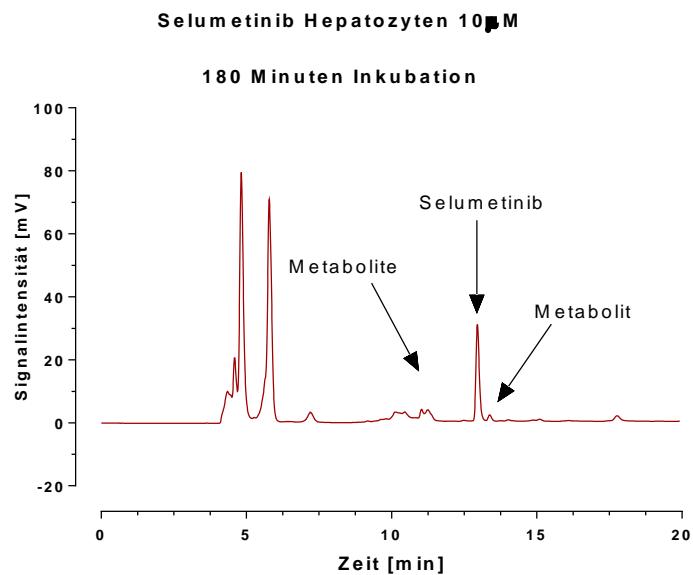


Abbildung 62: Hepatozyten mit 10 μ M Selumetinib nach 180 Minuten

Wieder sieht man hier bei knapp 13 Minuten den noch etwas kleiner gewordenen Selumetinib-Peak mit seinen Metaboliten.

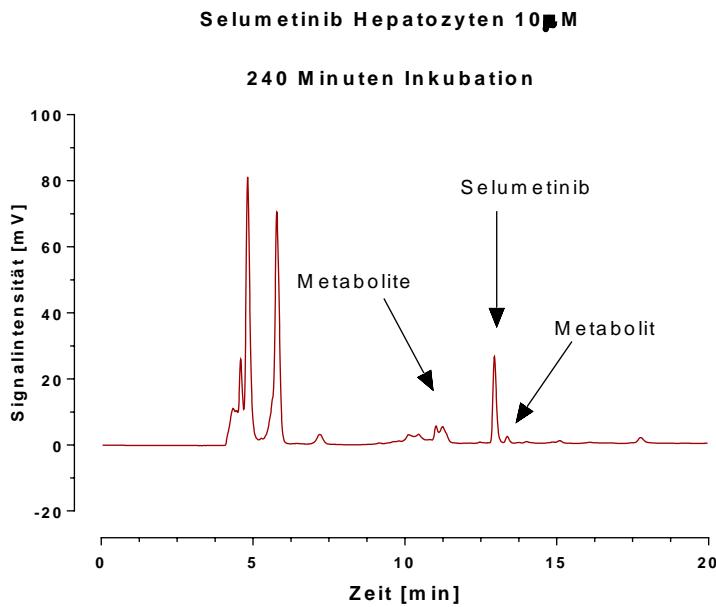


Abbildung 63: Hepatozyten mit 10 μ M Selumetinib nach 240 Minuten

Die AUC ist auf 209,8 hinunter gegangen, die Metabolisierung schreitet fort. Der Standard-Doppelpeak ist nach wie vor gut erkennbar.

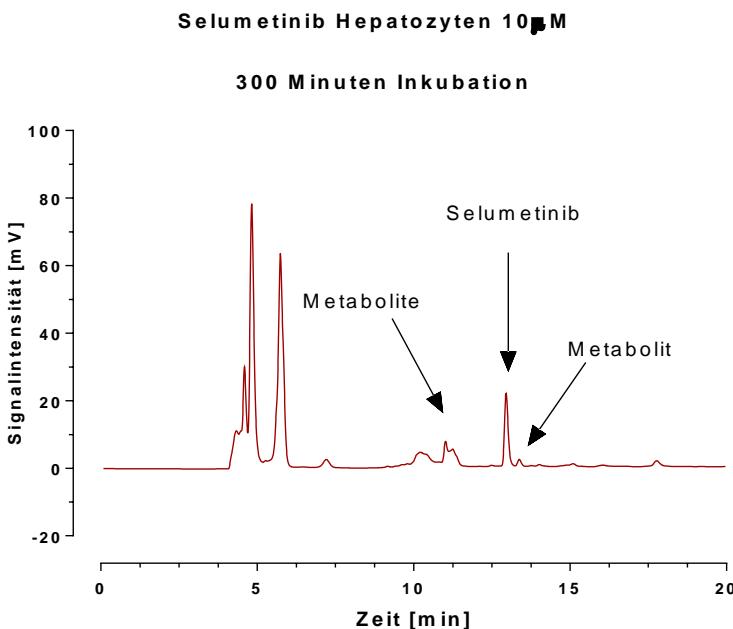


Abbildung 64: Hepatozyten mit 10 μ M Selumetinib nach 300 Minuten

Die Metabolisierung ist gut voran geschritten. Die AUC von Selumetinib beträgt nur mehr 174,6.

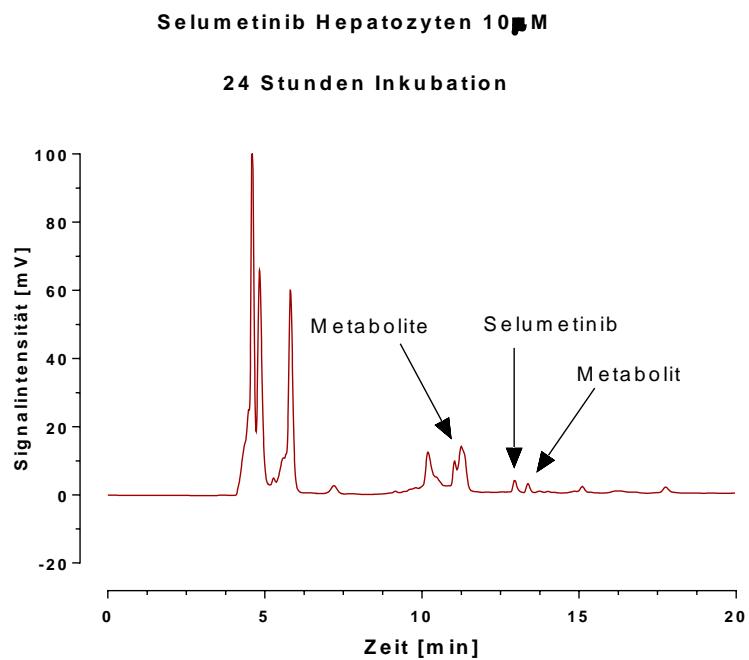


Abbildung 65: Hepatozyten mit 10 μ M Selumetinib nach 24 Stunden

Nach 24 Stunden ist Selumetinib fast vollständig metabolisiert.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden verschiedenste präklinische Untersuchungen mit dem Tyrosin-Kinase-Hemmer Selumetinib durchgeführt.

Die Proben wurden jeweils mittels der selektiven und empfindlichen HPLC-Methode analysiert. Um diese auf die passenden Wellenlängen einzustellen, wurden zu Beginn Versuche am UV-Spektrophotometer durchgeführt, so wurde die Wellenlänge von Selumetinib eruiert. Diese lag bei einer Wellenlänge von ungefähr 290 λ . In Folge wurde das HPLC-Gerät mit dem daran angeschlossenen Computer entsprechend eingestellt und war dann bereit zur Analyse der vorbereiteten Proben. Es erstellte Chromatogramme, auf denen der Selumetinib-Peak immer nach knapp 13 Minuten erschien. Zudem konnten dabei auch Metabolite von Selumetinib entdeckt werden.

Anhand von sieben verschiedenen Organen (Herz, Hirn, Leber, Lunge, Milz, Niere, Schwarte) wurden Versuche zur Gewebeverteilung sowie zur Wiederfindung des Tyrosin-Kinase-Inhibitors durchgeführt.

Was die Gewebeverteilung betrifft, so sind hier nochmal überblicksmäßig die Werte für die Peakflächen (AUC) nach 0 und nach 30 Minuten zusammengefasst:

Tabelle 28: Gewebeverteilung nach 0 und 30 Min bei unterschiedlichen Konzentrationen

Organ und Abnahmezeitpunkt	AUC bei 7,5 μ l	AUC bei 15 μ l	AUC bei 30 μ l	AUC bei 60 μ l
Herz 0 Minuten	100,6	203,3	445,0	887,0
Herz 30 Minuten	97,4	213,8	411,4	891,1
Hirn 0 Minuten	155,2	275,1	612,5	749,8
Hirn 30 Minuten	203,3	319,6	514,0	777,6
Leber 0 Minuten	175,8	332,4	658,8	1198,2
Leber 30 Minuten	168,9	303,1	629,6	1231,1
Lunge 0 Minuten	149,7	301,5	682,3	1354,9
Lunge 30 Minuten	153,4	293,1	618,5	1429,0
Milz 0 Minuten	148,1	316,3	701,6	1643,4
Milz 30 Minuten	138,1	303,9	680,2	1547,4
Niere 0 Minuten	78,6	180,8	360,1	1150,7
Niere 30 Minuten	70,0	153,0	356,0	998,0
Schwarte 0 Minuten	223,4	485,7	1021,8	2313,4
Schwarte 30 Minuten	221,4	475,0	1040,6	2384,9

Bei Inkubation von 7,5 µl Selumetinib-Stammlösung bzw. 30 µl Selumetinib-Stammlösung scheint sich Selumetinib, ähnlich wie bei der Wiederfindungsrate, vor allem im Herz und in der Niere gut zu verteilen, die Peakflächen sind hier verhältnismäßig klein. Der Unterschied zwischen 0 und 30 Minuten ist nicht sehr groß, Selumetinib scheint also recht schnell vom Gewebe aufgenommen zu werden. Hohe Werte erzielte erwartungsgemäß die Schwarze (aufgrund ihrer Lipophilie), hier fand bei allen Konzentrationen kaum eine Gewebeverteilung statt. Bei höherer Inkubation von 30 µl Selumetinib-Stammlösung bzw. 60 µl Selumetinib-Stammlösung fällt wieder auf, dass besonders im Herz viel Selumetinib aufgenommen und verteilt worden ist, auch das Hirn-Gewebe hatte hier recht niedrige Peakflächen und scheint daher eine dementsprechend hohe Gewebeverteilung zu haben. Hingegen waren bei diesen Konzentrationen nicht nur die Werte für die Schwarze, sondern auch jene für die Milz und Lunge recht hoch. Hier ist also keine große Gewebeverteilung feststellbar.

Bei der Wiederfindung stellte sich heraus, dass diese in ACN am niedrigsten bei der Niere (52,3 Prozent), beim Herz (57,6 Prozent) und bei der Leber (63,9 Prozent) ist, das heißt etwas weniger als die Hälfte der Selumetinib-Lösung ins Gewebe penetriert ist. In PBS konnten noch deutlich niedrigere Wiederfindungswerte gemessen werden, insbesondere bei der Niere (15,9 Prozent) sowie beim Herz (24,8 Prozent), aber auch alle anderen Gewebe-Arten außer der Schwarze, lagen unter 50 Prozent. Mit PBS ist die Gewebepermeation von Selumetinib recht hoch. Wiederfindungsversuche, bei denen Selumetinib mit Docetaxel kombiniert wurden, ergaben, dass es in diesem Falle nicht zielführend ist, die beiden Substanzen miteinander zu kombinieren, da die Wiederfindung mit Selumetinib alleine fast immer geringer war. Auch das 24-stündige Stehenlassen der Selumetinib-Docetaxel-Mischungen führte nur zu unwesentlichen Verbesserungen und die Gewebepermeation war fast immer deutlich geringer, als wenn der Tyrosin-Kinase-Hemmer alleine verabreicht und sofort analysiert wurde.

Die mit Hilfe von Transil-Kits durchgeführten Versuche zur Plasmaproteinbindung sowie zur mikrosomalen Bindung ergaben eine recht hohe Plasmaproteinbindung und eine noch höhere mikrosomale Bindung, bei Well 7 war hier Selumetinib fast schon komplett gebunden.

Beim Hepatozyten-Versuch konnte man gut die Metabolisierung von Selumetinib beobachten und mit der Zeit wurden Peaks sichtbar, welche Metabolite darstellen. Zudem konnte beobachtet werden, inwieweit Selumetinib in den verschiedenen Konzentrationen von der Leber aufgenommen und metabolisiert wird. Bei geringer Menge des Tyrosin-Kinase-Hemmers ist eine sehr hohe Metabolisierung beobachtbar.

6 Summary

This thesis focuses on various different preclinical investigations concerning the tyrosine kinase inhibitor selumetinib.

The prepared samples were analyzed with the selective and sensitive HPLC method. In order to configure it to the matching wavelength, exploratory samples were analyzed with the UV-spectrophotometer, which revealed a wavelength of selumetinib at ca. 290 λ . After the exploratory wavelength analysis, the HPLC-machine and the connected computer were configured for analyzing the different samples. Chromatograms were made in which the selumetinib-peak always became visible after nearly 13 minutes. Sometimes metabolites of selumetinib were found.

For seven different organs (heart, brain, liver, lung, spleen, kidney, pork rind) experiments were performed in order to analyze tissue distribution and perform recovery tests for selumetinib.

Concerning the tissue distribution, a summary of the AUC results after 0 and after 30 minutes is shown in the table below:

Table 29: Tissue distribution after 0 und 30 minutes with different concentrations

Organ and time	AUC 7,5 μ l	AUC 15 μ l	AUC 30 μ l	AUC 60 μ l
Heart 0 min	100,6	203,3	445,0	887,0
Heart 30 min	97,4	213,8	411,4	891,1
Brain 0 min	155,2	275,1	612,5	749,8
Brain 30 min	203,3	319,6	514,0	777,6
Liver 0 min	175,8	332,4	658,8	1198,2
Liver 30 min	168,9	303,1	629,6	1231,1
Lung 0 min	149,7	301,5	682,3	1354,9
Lung 30 min	153,4	293,1	618,5	1429,0
Spleen 0 min	148,1	316,3	701,6	1643,4
Spleen 30 min	138,1	303,9	680,2	1547,4
Kidney 0 min	78,6	180,8	360,1	1150,7
Kidney 30 min	70,0	153,0	356,0	998,0
Pork rind 0 min	223,4	485,7	1021,8	2313,4
Pork rind 30 min	221,4	475,0	1040,6	2384,9

In concentrations with 7,5 µl selumetinib-solution or 30 µl selumetinib-solution, selumetinib distributes particularly well in the heart and in the liver. Similar to the recovery rate, the AUCs for these concentrations are quite small, i.e. the level of absorption is high. The difference between 0 and 30 minutes is relatively small, in other words, selumetinib is quite quickly absorbed by the tissue. As expected, the pork rind showed high AUCs, likely due to the high lipophilicity - in all concentrations only a small amount of tissue distribution occurred. With higher concentrations of selumetinib-solutions (30 or 60 µl) it can be seen that the distribution in the heart tissue was high and AUCs were low, the same applies to the brain tissue. However, in these two concentrations the results for pork rind, for the spleen and for the lung tissue were rather high and hence distribution in the tissue was low.

In the recovery tests, results showed, that the recovery in ACN was the lowest in the kidney (53,3%), in the heart (57,6%) and in the liver (63,9%), where slightly less than half of the selumetinib was absorbed into the tissue. In PBS recovery results were much lower than in ACN, especially in the kidney (15,9%) and in the heart (24,8%), but also the results from all other tissue types besides the pork rind were below 50%. These findings show high selumetinib intake in the various tissues using PBS as a solution.

Recovery tests for combined selumetinib and docetaxel samples showed no improvement based on the addition docetaxel to the selumetinib solution. The recovery result from selumetinib samples was better than the combined samples in most cases. A delay of 24 hours before analysis of the selumetinib-docetaxel-sample led to marginal improvements, but results were still worse than the results of selumetinib alone without delay in analysis.

Transil-kits were used to perform experiments with regards to plasmaprotein binding as well as microsomal binding. Results showed high plasmaprotein binding and even higher microsomal binding (selumetinib was already almost completely bound in Well 7).

Last but not least a hepatocyte experiment was performed to observe metabolism. Peaks indicating the metabolites became visible after a while. Furthermore, the intake and metabolism of selumetinib in the liver in the different concentrations could be observed. In lower concentrations of the tyrosine kinase inhibitor, a high level of metabolism was found.

7 Conclusio

In der vorliegenden Diplomarbeit zeigten die Ergebnisse zur Wiederfindung, dass insbesondere im Lösungsmittel PBS, in den verschiedenen Gewebearten, vor allem in Herz und Niere, niedrige Wiederfindungsraten gegeben sind, also viel Selumetinib ins Gewebe penetriert ist. Weiters konnte widerlegt werden, dass die Kombination mit Docetaxel sowie das 24-stündige Einwirken lassen, zu einer geringeren Wiederfindung führt. Weitere Versuche hierzu wären sicherlich von Interesse, um herauszufinden, ob tatsächlich Selumetinib alleine auch therapeutisch besser wirkt als in Kombination mit Docetaxel. Studien bei denen Docetaxel mit Selumetinib kombiniert wurden, konnten immerhin beweisen, dass es für das Zytostatika Docetaxel durchaus von Vorteil ist, wenn es mit Selumetinib kombiniert wird und es dadurch besser wirksam ist [7].

Die Gewebeverteilung ergab vor allem bei niedriger Selumetinib-Menge und wieder insbesondere in Herz und Niere hohe Gewebeverteilungswerte, die wiederum von der Zeit nur wenig abhängig waren.

Sowohl die mikrosomale Bindung führte zu sehr hohen Bindungsraten, als auch die Plasmaproteinbindung war ebenfalls recht hoch, was den Schluss nahe legt, dass die Dosis wahrscheinlich deutlich erhöht werden müsste, da ja nur der freie Wirkstoffanteil therapeutisch wirksam sein kann.

Im Hinblick auf die Bindung sollte bei der Verabreichung von Selumetinib auch geachtet werden, dass eine zu hohe Dosis, gerade in Geweben wie dem Herz, die eine hohe Gewebeverteilung aufwiesen, auch schädigend wirken kann. Daher ist es in diesem Fall besonders wichtig zu wissen, wie hoch die Dosis sein darf, um einen therapeutischen, nicht jedoch einen toxischen Effekt zu erzielen.

Zudem konnte erstmals die Metabolisierung von Selumetinib mit Hilfe der Hepatozyten beobachtet werden in Abhängigkeit von Inkubationszeit und der verabreichten Menge. Hier wären weitere Versuche von Interesse, um der Frage nach zu gehen, wie diese Abbauprodukte entstehen und dabei auch die enzymatische Aktivität genauer zu durchleuchten.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Müller-Esterl Werner: Biochemie, 2. Auflage, 2011, Akademischer Verlag. S. 400-408, 509, 542
- [2] <http://www.news-medical.net/news/20131022/AstraZeneca-begins-selumetinib-Phase-3-clinical-trial-in-NSCLC-patients.aspx>, letzter Zugriff am 11.07.2015
- [3] Farley John, Brady Williams E., Vathipadiekal Vinod, Lankes Heather A., Coleman Robert, Morgan Mark, Mannel Robert, Yamada S. Diane, Mutch David, Rodgers Williams H., Birrer Michael, Gershenson David M.: A Phase II trial of selumetinib in women with recurrent low grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: A gynecologic oncology group trial, 2013, *the lancet oncology* , Volume 14, Nr. 2, S.134-140
- [4] https://web.archive.org/web/20120115032449/http://www.uk-essen.de/augenklinik/ah_melanom.html, letzter Zugriff am 11.07.2015
- [5] Werning Claus (Hrsg.): Medizin für Apotheker. Ein Handbuch mit Grundwissen für die Praxis. 3. Auflage, 2008, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, S.60 ff
- [6] Mutschler Ernst, Geisslinger Gerd, Kroemer Heyo K., Menzel Sabine, Ruth Peter: Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie, 10. Ausgabe, 2013, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, S.99 ff
- [7] Jänne Pasi A, Shaw Alice T., Pereira José Rodrigues, Jeannin Gaelle, Vansteenkiste Johan, Barrios Carlos, Franke Fabio Andre, Grinsted Lynda, Zazulina Victoria, Smith Paul, Smith Ian, Crinò Lucio: Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small lung cancer: a randomized, multicenter, placebo-controlled, phase 2 study, 2013, *the lance oncology*, Volume 14, Nr. 1, S.38-47
- [8] Ho Alan L., Grewal Ravinder K., Leboeuf Rebecca, Sherman Eric, Pfister David G., Deandreas Desiree, Pentlow Keith S., Zanzonico Pat B., Haque Sofia, Gavane Somali, Ghossein Ronald A., Ricarte-Filho Julio C., Domínguez José M., Shen Ronglai, Tuttle Michael, Larson Steve M., Fagin James A.: Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer, 2013, *The New England Journal of Medicine*, S.623-632

- [9] Carvajal Richard D., Sosman Jeffrey A., Quevedo Jorge Fernando, Milhem Mohammed M., Joshua Anthony M., Kudchadkar Ragini R., Linette Gerald P., Gejewski Thomas F., Lutzky Jose, Lawson David H., Lao Christopher D., Flynn Patrick J., Albertini Mark R., Sato Takami, Lewis Karl, Doyle Austin, Ancell Kristin, Panageas Katherine S., Bluth Mark, Hedvat Cyrus, Erinjeri Joseph, Ambrosini Grazia, Marr Brian, Abramson David H., Dickson Mark Andrew, Wolchok Jedd D., Chapman Paul B., Schwartz Gary K.: Effect of Selumetinib vs Chemotherapy on Progression-Free Survival in Uveal Melanoma: A Randomized Clinical Trial, 2014, The Journal of the American Medical Association, Volume 311, Nummer 23, S. 2397-2405
- [10] Koolman Jan, Röhm Klaus-Heinrich: Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4.Auflage, 2009, Thieme Verlag, S. 366
- [11] Müller-Tidow Carsten, Krug Utz, Brunnberg Uta, Berdel Wolfgang E., Serve Hubert: Tyrosinkinasen als Ziele neuer onkologischer Therapien, Aussichten und Probleme, 2007, Deutsches Ärzteblatt, S. 1-7
- [12] <http://www.chemietek.com/products.aspx?pid=50>, letzter Zugriff am 11.07.2015
- [13] Holt S.V., Logié A., Odedra R., Heier A., Heaton S.P., Alferez A., Davies B.R., Wilkinson R.W., Smith P.D.: The MEK1/2 inhibitor, selumetinib (AZD6244; ARRY-142886), enhances anti-tumour efficacy when combined with conventional chemotherapeutic agents in human tumour xenograft models, 2012, British journal of cancer, S. 858-866
- [14] Leijen Suzanne, Soetekouw Patricia M. M., Jeffry Evans T.R., Nicolson Marianne, Schellens Jan H. M., Learoyd Maria, Grinsted Lynda, Zazulina Victoria, Pwint Thinn, Middleton Mark: A phase I, open-label, randomized crossover study to assess the effect of dosing of the MEK 1/2 inhibitor Selumetinib (AZD6244; ARRY-142866) in the presence and absence of food in patients with advanced solid tumors, 2011, cancer chemotherapy and pharmacology, Springer, S. 1619–1628.
- [15] Xiaoling Li Ming Hu: Oral Bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications, 2011, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S.158-162
- [16] King Tekoa L., Brucker Mary C.: Pharmacology for Women's Health, 2010, Jones & Bartlett Pub, S.33-34
- [17] Pacifici Gian Maria, Viani Antonella: Methods of determining plasma and tissue binding of drugs, 1992, Clinical pharmacokinetics, Volume 23, Adis, S. 449-468
- [18] Kwon Younggil: Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists, 2001, Springer, S.118-119

- [19] Paulsen Friedrich, Waschke Jens: Sobotta. Atlas der Anatomie des Menschen. Innere Organe. 23. Auflage, Urbarn & Fischer, 2010, S. 2 ff, S.106, S.129
- [20] Tonner Peter, Hein Lutz: Pharmakotherapie in der Anästhesie und Intensivmedizin. Grundlagen und klinische Konzepte, 2011, Springer, S. 186 ff
- [21] Fritsch Helga, Kühnel Wolfgang: Taschenatlas Anatomie. Innere Organe, 11. Auflage, Verlag: Thieme, 2013, S.10
- [22] Cole Theodor: Wörterbuch der Biologie. Dictionary of Biology. 4. Auflage, 2014, Springer, S.250
- [23] Heiss, Rudolf (Hrsg.): Lebensmitteltechnologie. Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung, 6.Auflage, 2003, Springer Verlag, S. 64
- [24] User Guide TransilXL Transil PPB Binding Kit, Part No. TMP- 0212-2096, Version 2, Revision 00, Sovicell, S. 2 ff
- [25] User Guide TransilXL Microsomal Binding Kit, Part No. TMP- 0120-2096 , Version 2, Revision 00, Sovicell S. 2 ff
- [26] Reichenbächer Manfred, Popp Jürgen: Strukturanalytik organischer und anorganischer Verbindungen: Ein Übungsbuch, 2007, Science & Business Media, Springer, S. 119

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Selumetinib	3
Abbildung 2: Schwarze und Sezierbesteck	7
Abbildung 3: HPLC-Anlage	14
Abbildung 4: Heizplatte	15
Abbildung 5: Sezierbesteck	16
Abbildung 6: UV-Spektrogramm Abbildung 7: UV-Spektrophotometer-Gerät	17
Abbildung 8: Anordnung der Wells auf der Platte	18
Abbildung 9: 8 Wells mit ansteigender Menge von Silikat-Kügelchen	18
Abbildung 10: Plate Shaker	20
Abbildung 11: Zentrifuge mit Well-Platten	20
Abbildung 12: Platte mit Wells und Decapper	21
Abbildung 13: Einwiegen von Gewebe auf der Präzisionswaage	21
Abbildung 14: Minilys zum Homogenisieren	23
Abbildung 15: Homogenisierungsröhrchen in verschiedenen Stärken	23
Abbildung 16: Vortexmixer	24
Abbildung 17: Zentrifuge für Eppendorf-Gefäße und Homogenisierungsröhrchen	24
Abbildung 18: HPLC-Fläschchen und Mikro-Vial mit Wellenlinie als Markierung sowie Cap zum Verschließen	25
Abbildung 19: Autosampler mit eingeordneten HPLC-Fläschchen	28
Abbildung 20: Wasserbad	30
Abbildung 21: Williams Medium E	30
Abbildung 22: Recovery Medium	30
Abbildung 23: Laminar Air Flow Werkbank	31
Abbildung 24: UV-Spektrogramm Selumetinib in ACN	34
Abbildung 25: UV-Spektrogramm Selumetinib in PBS	35
Abbildung 26: Chromatogramm Gewebeverteilung Herz	36
Abbildung 27: Chromatogramm Gewebeverteilung Hirn	37
Abbildung 28: Chromatogramm Gewebeverteilung Leber	37
Abbildung 29: Chromatogramm Gewebeverteilung Lunge	38
Abbildung 30: Chromatogramm Gewebeverteilung Milz	38
Abbildung 31: Chromatogramm Gewebeverteilung Niere	39
Abbildung 32: Chromatogramm Gewebeverteilung Schwarze	39
Abbildung 33: Chromatogramm Selumetinib in ACN	40
Abbildung 34: Chromatogramm Selumetinib in PBS	40

Abbildung 35: Chromatogramm Selumetinib-Peaks in ACN und PBS übereinander gelegt	41
Abbildung 36: Mikrosomale Bindung von drei verschiedenen Wells.....	42
Abbildung 37: PPB von drei verschiedenen Wells.....	43
Abbildung 38: Peakflächen Herz in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit.....	44
Abbildung 39: Peakflächen Hirn in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit.....	45
Abbildung 40: Peakflächen Leber in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit	46
Abbildung 41: Peakflächen Lunge in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit	47
Abbildung 42: Peakflächen Milz in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit.....	48
Abbildung 43: Peakflächen Niere in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit.....	49
Abbildung 44: Peakflächen Schwarze in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit	50
Abbildung 45: Peakflächen-Werte Selumetinib in ACN	51
Abbildung 46: Prozent-Werte Selumetinib in ACN	52
Abbildung 47: Peakflächen-Werte Selumetinib in PBS.....	53
Abbildung 48: Prozent-Werte Selumetinib in PBS.....	53
Abbildung 49: Peakflächen-Werte Selumetinib und Docetaxel 10 µg	55
Abbildung 50: Prozent-Werte Selumetinib und Docetaxel 10 µg	55
Abbildung 51: Peakflächen-Werte Selumetinib und Docetaxel 20 µg	57
Abbildung 52: Prozent-Werte Selumetinib und Docetaxel 20 µg	57
Abbildung 53: Peakflächen-Werte Selumetinib und Docetaxel 10 µg nach 24 Stunden	59
Abbildung 54: Prozent-Werte Selumetinib und Docetaxel 10 µg nach 24 Stunden.....	59
Abbildung 55: Peakflächen-Werte Selumetinib und Docetaxel 20 µg nach 24 Stunden	61
Abbildung 56: Prozent-Werte Selumetinib und Docetaxel 20 µg nach 24 Stunden.....	61
Abbildung 57: Hepatozyten mit 10 µM Selumetinib nach 0 Minuten	64
Abbildung 58: Hepatozyten mit 10 µM Selumetinib nach 15 Minuten	64
Abbildung 59: Hepatozyten mit 10 µM Selumetinib nach 30 Minuten	65
Abbildung 60: Hepatozyten mit 10 µM Selumetinib nach 60 Minuten	65
Abbildung 61: Hepatozyten mit 10 µM Selumetinib nach 120 Minuten	66
Abbildung 62: Hepatozyten mit 10 µM Selumetinib nach 180 Minuten	66
Abbildung 63: Hepatozyten mit 10 µM Selumetinib nach 240 Minuten	67
Abbildung 64: Hepatozyten mit 10 µM Selumetinib nach 300 Minuten	67
Abbildung 65: Hepatozyten mit 10 µM Selumetinib nach 24 Stunden	68

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für die Probenaufbereitungen notwendige Chemikalien.....	10
Tabelle 2: Für die Probenaufbereitungen benötigte Organe.....	11
Tabelle 3: Geräte und Materialien zur Herstellung des Eluenten.....	11
Tabelle 4: Geräte und Materialien für die Probenherstellung.....	12
Tabelle 5: Wichtige Bestandteile der HPLC-Anlage	13
Tabelle 6: Menge Selumetinib-Lösung pro Probe	22
Tabelle 7: Gewebeproben und entsprechende Homogenisierungsröhrchen	22
Tabelle 8: Zusammensetzung.....	27
Tabelle 9: Zusammensetzung der Leerwert-Proben mit ACN und PBS	27
Tabelle 10: Wiederfindung mit 10 µl Selumetinib und 10 µl Docetaxel	29
Tabelle 11: Wiederfindung mit 10 µl Selumetinib und 20 µl Docetaxel	29
Tabelle 12: Mikrosomale Bindung in den 8 Wells.....	42
Tabelle 13: PPB in den 8 Wells.....	43
Tabelle 14: Peakflächen Herz	44
Tabelle 15: Peakflächen Hirn	45
Tabelle 16: Peakflächen Leber	46
Tabelle 17: Peakflächen Lunge.....	47
Tabelle 18: Peakflächen Milz	48
Tabelle 19: Peakflächen Niere	49
Tabelle 20: Peakflächen Schwarze.....	50
Tabelle 21: Wiederfindung Selumetinib in ACN.....	52
Tabelle 22: Wiederfindung Selumetinib in PBS	54
Tabelle 23: Wiederfindung 10 µg Selumetinib und 10 µg Docetaxel	56
Tabelle 24: Wiederfindung Selumetinib und Docetaxel 20 µg	58
Tabelle 25: Wiederfindung Selumetinib und Docetaxel 10 µg nach 24 Stunden.....	60
Tabelle 26: Wiederfindung Selumetinib und Docetaxel 20 µg nach 24 Stunden.....	62
Tabelle 27: Hepatozyten Peakflächen-Werte	63
Tabelle 28: Gewebeverteilung nach 0 und 30 Min bei unterschiedlichen Konzentrationen... <td>69</td>	69
Table 29: Tissue distribution after 0 und 30 minutes with different concentrations	71

11. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
bzw.	beziehungsweise
CYP	Cytochrom P450
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high-performance liquid chromatography)
Hrsg.	Herausgeber
M	Mol
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	Kinase der MAP-Kinase (Mitogen-activated protein kinase kinase)
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (Non-small-cell lung carcinoma)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)
PDGF-R	Platelet-derived growth factor receptor
PPB	Plasmaproteinbindung
UV	Ultraviolettstrahlung
λ	Wellenlänge (Lambda)
μ	Mikro (10^{-6})

12. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Nora M'Vila

Berufserfahrung

April 2007 – Oktober 2008: Volksschullehrerin

Ferialjobs:

Februar 2013 Apotheke Donauzentrum, Wien

August 2013: Stadtapotheke, Bregenz

Ausbildung

Seit März 2009: Studium der Pharmazie an der Universität Wien

2005 – 2008: Studium „Bildungsmanagement und Schulentwicklung“ an der Universität Osnabrück, abgeschlossen als Master of Arts

2002-2005: Pädagogische Akademie des Bundes Wien, abgeschlossen als Dipl.-Pädagogin

1997 – 2001: Bundesgymnasium Gallusstraße, Bregenz

1993 – 1997: Privatgymnasium Sacré Coeur Riedenburg, Bregenz

Spezielle Kenntnisse

Sprachen: Englisch (fließend), Niederländisch (fließend), Französisch (Basiskenntnisse)

Ausbildung zur Peer-Mentorin