



universität
wien

DIPLOMARBEIT/DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Thermodynamische Evaluierung von Propafenon und Verapamil Komplexen mit Cyclodextrinen mittels nITC“

verfasst von / submitted by

Marija Radenkovic

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

Wien, 2020 / Vienna, 2020

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

A 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Gerhard Ecker

Danksagung:

Die Studienzeit ist eine besondere Zeit im Leben, in der man sich auf eine Tätigkeit spezialisiert. Sie ist wegweisend für den weiteren Verlauf des Berufslebens. Die Selbstständigkeit und die Fähigkeit zur Problemlösung werden dabei immer wieder auf die Probe gestellt vor allem bei der Diplomarbeit, die die letzte Stufe auf diesem Weg ist.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Univ.-Prof. Mag. Dr. Gerhard Ecker für die gute Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Darüber hinaus gebührt mein Dank jedem, der durch Korrekturen, Verbesserungsvorschläge und hilfreiche Diskussionen zur Qualität dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester, die mich von Anfang an durch das ganze Studium begleitet haben. Sie waren eine unersetzbare Stütze und haben mir diesen Abschluss ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeiner Teil.....	1
1.1. Die Arzneistoffe.....	1
1.1.1. Verapamil.....	1
1.1.2. Propafenon.....	2
1.2. P-Glykoprotein.....	3
1.2.1. Aufbau und Funktion.....	3
1.2.2. P-Glykoprotein Inhibitoren.....	5
1.3. Cyclodextrine.....	5
1.3.1. Allgemeines über Cyclodextrine.....	5
1.3.2. Komplexbildung.....	7
1.3.3. Propafenon-Komplexe mit β -Cyclodextrin.....	8
1.4. Grundlagen der Thermodynamik.....	8
1.4.1. Thermodynamische Parameter.....	8
1.4.2. Intermolekulare Wechselwirkungen.....	10
1.5. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	11
1.5.1. Aufbau und Funktionsweise.....	11
1.5.2. Auswertung der Daten.....	12
1.5.3. Anwendungsmöglichkeiten der ITC.....	13
1.6. Solvatisierung und Desolvatisierung.....	14
1.6.1. Definition.....	14
1.6.2. Auswirkungen auf die Kinetik.....	15
2. Zielsetzung.....	18
3. Methoden und verwendete Materialien.....	20
3.1. Nano isothermes Titrationskalorimeter (nITC).....	20
3.1.1. Der Kalorimeterblock.....	20
3.1.2. Spritze und Bürette.....	21
3.2. Degassing Station.....	23
3.2.1. Allgemeines.....	23
3.2.2. Praktische Vorgehensweise.....	24
3.3. Experimentaufbau.....	26
3.3.1. Verapamil.....	27
3.3.2. Propafenon.....	33

3.3.3. NanoAnalyse.....	38
4. Ergebnisse und Diskussion.....	39
4.1. Ergebnisse der Verapamil Experimente.....	40
4.2. Ergebnisse der Propafenon Experimente.....	46
4.3. Vergleich der Ergebnisse von Verapamil und Propafenon.....	51
5. Zusammenfassung.....	54
6. Abstract.....	55
7. Literaturverzeichnis.....	56

1. Allgemeiner Teil

1.1. Die Arzneistoffe

1.1.1. Verapamil

Verapamil ist ein Calciumantagonist und wird hauptsächlich als Antiarrhythmikum und Antihypertensivum eingesetzt.

Der Wirkmechanismus beruht darauf, dass L-Typ Calciumkanäle blockiert werden und somit der Calciumeinstrom in die Zellen der glatten Muskulatur und des Herzmuskels verhindert wird. Dadurch ergeben sich die therapeutisch nutzbaren vasodilatatorischen Effekte in der glatten Gefäßmuskulatur.

Calciumkanäle sind sowohl im Sinusknoten, als auch im AV-Knoten verantwortlich für die Weiterleitung des Aktionspotentials. Durch eine Blockade der Calciumkanäle wirkt Verapamil negativ chronotrop (vermindert die Schlagfrequenz), negativ inotrop (vermindert die Kontraktionskraft) und negativ dromotrop (vermindert die Erregungsleitung). [1]

Verapamil wird therapeutisch eingesetzt gegen Hypertonie, Angina pectoris und supraventrikulären Arrhythmien. Die Applikation erfolgt oral als Filmtabletten und Retardtabletten bis zu 360 mg täglich und es ist gut verträglich. [2] [3]

Verapamil ($C_{27}H_{38}N_2O_4$) ist ein Phenylalkylamin und liegt als ein Racemat aus R- und S-Enantiomeren vor. Es ist sowohl in Wasser, als auch in organischen Lösungsmitteln gut löslich und es verteilt sich gut in Lipidmembranen. Üblicherweise wird Verapamil als Verapamilhydrochlorid verabreicht, welches ein weißes, kristallines Pulver ist. Das Molekulargewicht beträgt 491,1 g/mol. [4]

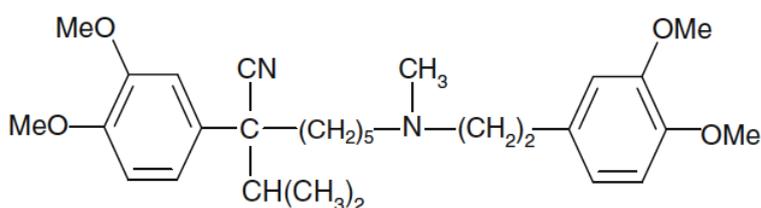


Abb. 1 Struktur von Verapamil [4]

1.1.2. Propafenon

Propafenon gehört zur Gruppe der Klasse 1c Antiarrhythmika. Der Wirkmechanismus ist die Blockade des Na⁺-Kanals im offenen und inaktivierten Zustand. Dadurch wird der schnelle Na⁺-Einstrom verhindert, die Refraktärzeit verlängert und pathologische Erregungen werden unterdrückt. Dieser Arzneistoff kommt in der Therapie gegen Herzrhythmusstörungen, wie Vorhofflimmern zum Einsatz. Propafenon kann jedoch selbst Herzrhythmusstörungen auslösen und kann deshalb nicht bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder koronarer Herzkrankheit eingesetzt werden. [1]

Propafenon wird intravenös und peroral in Form von Filmtabletten verabreicht. Die übliche Tagesdosis ist 300 – 900 mg, es wird zwei- bis dreimal täglich eingenommen. [5]

Propafenon (C₂₁H₂₇NO₃) weist eine amphiphile Struktur auf mit einem aromatischen, lipophilen Teil und einem hydrophilen, aliphatischem Amin. Es hat ein Molekulargewicht von 377,90 g/mol und liegt als weißes, kristallines Pulver vor. Propafenon hat ein chirales Zentrum und besteht aus zwei Enantiomeren. In Arzneimitteln wird es, genauso wie Verapamil, als Propafenonhydrochlorid verabreicht. [6]

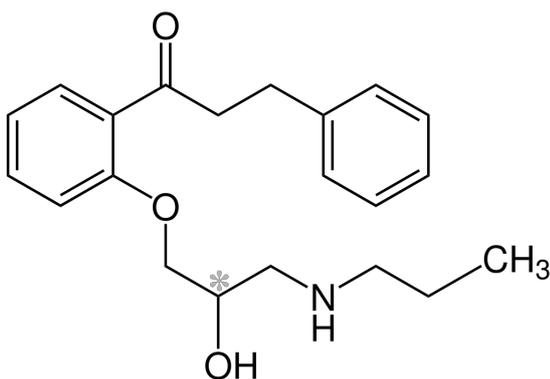


Abb. 2 Struktur von Propafenon [7]

1.2. P-Glykoprotein

1.2.1. Aufbau und Funktion

Das P-Glykoprotein (Pgp) ist ein Transporter, der physiologisch für das Ausschleusen von körperfremden Substanzen, beziehungsweise für die Entgiftung von Zellen verantwortlich ist. Die Substrate des Proteins sind unter anderem Hormone, Lipide oder Peptide und besitzen ein Molekulargewicht zwischen 330 Da bis 4000 Da. Es werden jedoch auch andere Substanzen, wie Chemotherapeutika aus der Zelle gepumpt, was zur „Multi-Drug-Resistance“ (MDR) führt. Dadurch werden Tumorzellen resistent gegenüber Cytostatika, wie zum Beispiel Vinblastin, Doxorubicin oder Paclitaxel. Die Behandlung unterschiedlicher Krebsarten wie Leukämie, Brustkrebs oder Leberzellkarzinomen wird dadurch problematisch. Neben dem P-Glykoprotein gibt es auch zwei weitere Transporter, die MDR auslösen können, ABCG2 und ABCC1. [8] [9]

Das P-Glykoprotein ist ein Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa, das zur Gruppe der ABC-Transporter gehört. ABC-Transporter besitzen eine ATP-Bindungs-Cassette („ATP binding cassette“), die ATP zu ADP hydrolysiert wobei Energie freigesetzt wird. Es ist ein Dimer, dessen Hälften aus 6 Transmembranhelices und 2 Nukleotid-bindenden Domänen bestehen.

Das P-Glykoprotein kann in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Wenn ein Substrat an das Protein bindet, befindet es sich in der „inward-facing“ Konformation. Es wechselt anschließend in die „outward-facing“ Konformation um das Substrat in den Extrazellulärraum zu pumpen.

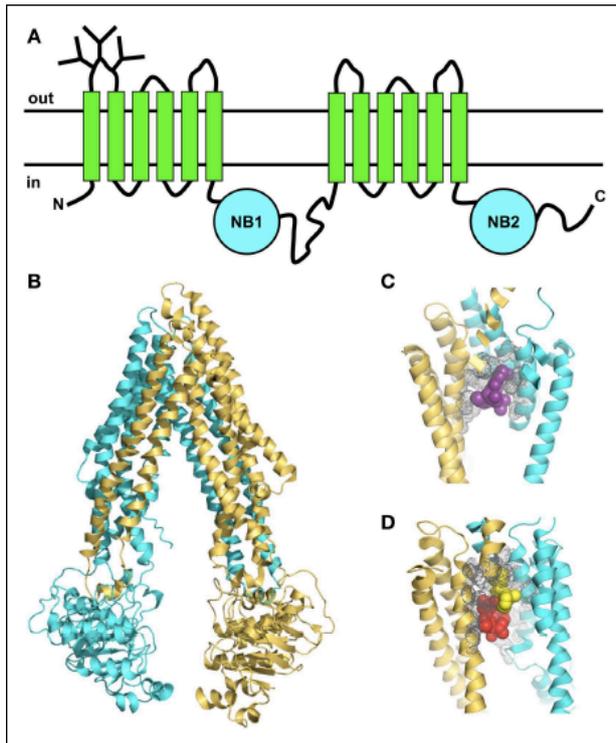


Abb. 3 Röntgenstrukturaufnahme vom P-Glykoprotein [8] Transmembranhelices mit der Nukleotidbindenden Domäne (A) „inward-facing“ Konformation (B) Bindungstasche mit Substrat (C,D)

Der genaue Wirkmechanismus des P-Glykoproteins wird durch zwei Modelle dargestellt. Beim „hydrophobic vacuum cleaner“ Modell diffundiert das Substrat in die Lipiddoppelschicht, bindet dort an den Transporter und wird in den Extrazellulärraum ausgeschleust. Beim „flippase“ Modell wird das Substrat von der inneren in die äußere Schicht der Phospholipiddoppelschicht transloziert und diffundiert nach außen. Die Gemeinsamkeit der beiden Modelle ist, dass das Substrat erstmal in die Phospholipiddoppelschicht eindringen muss und von dort aus an den Transporter bindet. Aus diesem Grund beeinflusst auch die Zusammensetzung und die Fluidität der Phospholipiddoppelschicht die Funktion des P-Glykoproteins. Die meisten Substanzen, die durch das P-Glykoprotein ausgeschleust werden sind lipophil und amphiphil. Sie verteilen sich daher gut in Membranen und ordnen sich anisotrop an. [8] [10]

Die Affinität zum Transporter lässt sich durch die Dissoziationskonstante K_d darstellen, die von zwei Faktoren bestimmt wird. Einerseits von dem Verteilungskoeffizienten K_{lip} und andererseits von der Dissoziationskonstante K_{dlip} .

Der Zusammenhang wird durch folgende Formel dargestellt:

$$K_{dlip} = \frac{K_d}{\left(\frac{V_{lip}}{V} + \frac{1}{K_{lip}}\right)}$$

K_{lip} gibt die Verteilung einer Substanz in der Membran wieder und K_{dlip} die Bindung an den Transporter. Es hat sich herausgestellt, dass beide Faktoren wichtig für die Bindung an das Protein sind, aber K_d stärker von K_{lip} abhängt, d.h. von der Verteilung in der Membran.

Ein guter Ansatz um die Wirkung von Chemotherapeutika zu verbessern, wäre eine Modifikation der Struktur um die Lipophilie zu vermindern wurde. Der Arzneistoff würde sich schlechter in der Membran verteilen und kann daher nicht mehr an das P-Glykoprotein binden. [8]

1.2.2. P-Glykoprotein Inhibitoren

Um der MDR entgegenzuwirken sind Pgp-Inhibitoren entwickelt worden. Sowohl Verapamil, als auch Propafenon sind Pgp-Inhibitoren, genauer gesagt „small molecule inhibitors“. Bisher wurden drei Generationen von Pgp-Inhibitoren entwickelt. Zur 1. Generation gehören Medikamente, die ursprünglich andere Indikationen hatten, z. Bsp. Verapamil. Die Gruppe der 2. Generation besteht aus Substanzen der 1. Generation die chemisch modifiziert worden sind, wie z. Bsp. Dexverapamil. Die 3. Generation sind neue Substanzen, mit dem Ziel die Toxizität und die Nebenwirkungen zu verringern. [11]

1.3 Cyclodextrine

1.3.1. Allgemeines über Cyclodextrine

Cyclodextrine (CD) sind ringförmige Oligosaccharide, die in der pharmazeutischen Industrie als Hilfsstoffe eingesetzt werden. Sie bestehen aus mindestens sechs 1,4- α -glykosidisch verbundenen Glucosemolekülen. Cyclodextrine, die weniger als 6

Glucosemoleküle haben, können aus sterischen Gründen nicht gebildet werden. Die natürlichen Cyclodextrine sind das α -, β - und γ -Cyclodextrin, die jeweils aus 6, 7 und 8 Glucose-Einheiten bestehen. Cyclodextrine sind bis zu einer Temperatur von 200°C stabil. [12]

Sie werden durch Fermentierung von Stärke gewonnen. Der Abbau erfolgt durch das bakterielle Enzym Cyclodextrin-Glykosyl-Transferase. Bei der Gewinnung erhält man ein Gemisch aus den drei natürlichen Cyclodextrinen. Den größten Anteil macht das β -Cyclodextrin aus, welches aus 7 Glucosemolekülen besteht und einen Hohlraumdurchmesser von 6-6,5 Å hat. [13]

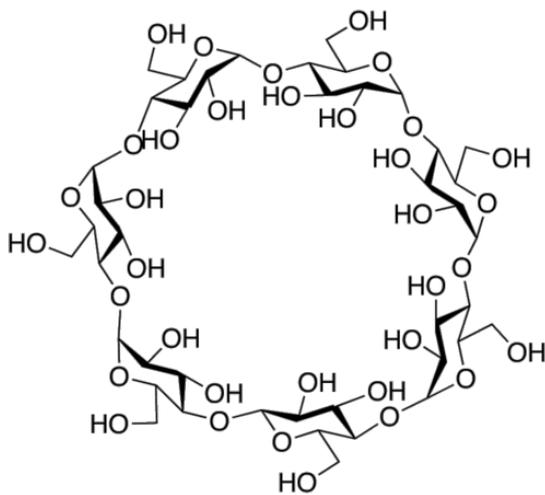


Abb. 4 Struktur von β -Cyclodextrin [14]

Das β -Cyclodextrin ist schlechter wasserlöslich als α - oder γ -CD, da die Hydroxylgruppen an den C2- und C3-Kohlenstoffatomen Wasserstoffbrückenbindungen mit benachbarten Glucosemolekülen bilden. Das verhindert eine Wechselwirkung zwischen den OH-Gruppen und den Wassermolekülen, dadurch wird die Hydratationsenthalpie vermindert. Es ist trotzdem der meistverwendete Vertreter unter den Cyclodextrinen. [15]

Cyclodextrine wurden erstmals 1891 isoliert und im 20. Jahrhundert vom österreichischen Wissenschaftler Franz Scharinger als cyclische Oligomere identifiziert. Sie sind in der Nahrungsmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie zugelassen. Die orale Einnahme ist unbedenklich, weil sie unverändert das Verdauungssystem passieren und ausgeschieden werden. Die Effekte der Cyclodextrine verursachen eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit der Gastmoleküle

durch bessere Wasserlöslichkeit, Schutz des Wirkstoffes vor Oxidation oder Hydrolyse und Neutralisierung von unangenehmen Geschmack oder Geruch. Cyclodextrine erleichtern den Eintritt von Arzneimitteln durch biologische Membranen. Auf Grund der hohen Polarität des Außenmantels können sie selbst nur schwer biologische Membranen durchdringen. Sie entlassen jedoch das Gastmolekül direkt an der Membran und es wird nicht hydratisiert, sondern diffundiert direkt in die Phospholipiddoppelschicht. [12]

1.3.2. Komplexbildung

Die sterische Anordnung der Cyclodextrine ergibt einen Konus, der aus einem lipophilen Hohlraum besteht und einer hydrophilen Außenfläche. Für den lipophilen Charakter an der Innenseite sind das Kohlenstoffgrundgerüst und die glykosidischen Sauerstoffatome verantwortlich und für den hydrophilen Außenmantel primäre Hydroxylgruppen. Wegen dieser Eigenschaften können Cyclodextrine Komplexe mit anderen Molekülen eingehen und werden auch als molekulare Zuckertüten bezeichnet. [10]

Komplexe zwischen Cyclodextrinen und anderen Molekülen entstehen durch intermolekulare Wechselwirkungen. Üblicherweise werden 1:1 Komplexe gebildet. Das Besondere an diesen Komplexen ist, dass die Wechselwirkungen so stark sind, dass sie mit kovalenten Bindungen vergleichbar sind und die Komplexe dadurch sehr stabil sind. Die treibenden Kräfte sind hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen. Ein wichtiger Faktor bei der Komplexbildung ist die Anwesenheit von Wassermolekülen. Am oberen und unteren Rand der Cyclodextrine befinden sich Hydroxylgruppen. Die hydratisierenden Wassermoleküle interagieren mit diesen Hydroxylgruppen und ermöglichen dadurch einem hydrophoben Molekül den Eintritt in den Hohlraum des Cyclodextrins. Dabei werden Wassermoleküle aus dem Hohlraum verdrängt und an das umgebende Wasser abgegeben. Bei der Komplexbildung kommt es zu einer Erhöhung der Entropie, was ein thermodynamisch günstiger Zustand ist. Die treibende Kraft bei diesem Prozess ist somit der Austausch der Wassermoleküle gegen das hydrophobe Gastmolekül.

Cyclodextrinkomplexe können auch dissoziieren. Wenn zu einer CD-Lösung, in der sich bereits Komplexe gebildet haben, größere Mengen an Wasser zugegeben werden, kommt es zur Dissoziation. Ein weiteres Beispiel wäre das Titrieren einer CD-Lösung in Wasser, was im experimentellen Teil näher erklärt wird. Die Wassermoleküle, die den Komplex umgeben, führen zu einer Erhöhung des Konzentrationsgradienten und das Gastmolekül wird entlassen. [12]

1.3.3. Propafenon-Komplexe mit β -Cyclodextrin

Propafenon bildet mit β -Cyclodextrin ausschließlich 1:1 Komplexe.

Röntgenstrukturanalysen und $^1\text{H-NMR}$ Studien haben gezeigt, dass das ganze Molekül für die Komplexbildung zu groß ist und nur der Phenylring gemeinsam mit der Carbonylgruppe in den Hohlraum eingeschlossen wird. Diese Orientierung ist energetisch sehr günstig und wird deswegen bevorzugt. Aus den thermodynamischen Parameter Enthalpie (ΔH), Entropie (ΔS) und Gibbs-Energie (ΔG), die während der Komplexbildung gemessen wurden, lässt sich ableiten, dass der Prozess der Komplexbildung exotherm ist und spontan abläuft. Propafenon-CD Komplexe bilden sich am besten bei einer Temperatur von 303 Kelvin (30°C). Die wichtigsten Wechselwirkungen, die den Komplex zusammenhalten, sind Wasserstoffbrückenbindungen. Die Wasserstoffbrücken entstehen zwischen den H-Atomen der sekundären Hydroxylgruppe, der Methylengruppe der Cyclodextrine und den O-Atomen vom Propafenon. Insgesamt sind es drei Wasserstoffbrückenbindungen, wobei auch Van der Waals-Kräfte zur Stabilität des Komplexes beitragen. [16]

1.4. Grundlagen der Thermodynamik

1.4.1. Thermodynamische Parameter

Die Thermodynamik beschäftigt sich mit chemischer Energetik, beziehungsweise der Berechnung von Energiebilanzen chemischer Reaktionen. Dadurch ist es möglich chemische Reaktionen vorherzusagen und sie zu bewerten. Mit den

thermodynamischen Parametern kann man abschätzen ob chemische Reaktionen überhaupt ablaufen können, in welche Richtung sie ablaufen und die Reaktionsgeschwindigkeit ermitteln. Zu den thermodynamischen Parametern zählen: die Enthalpie, die Entropie und die Gibbs-Energie.

Die Enthalpie ΔH ist das Maß für die Energie eines thermodynamischen Systems und wird in Joule (J) gemessen. Bei konstantem Druck gleicht die Enthalpieänderung der übertragenen Wärmemenge. Deswegen wird die Enthalpie auch als der Wärmeinhalt eines Systems bezeichnet. Sie gibt die Zu- oder Abnahme des Energieinhalts an, d.h. ob eine Reaktion endotherm oder exotherm abläuft. Exotherme Reaktionen führen zu einer Enthalpieabnahme ($\Delta H < 0$) und endotherme Reaktionen zu einer Enthalpiezunahme ($\Delta H > 0$).

Die Entropie ΔS ist das Maß für die Unordnung in einem thermodynamischen System. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit der Spontanität einer Reaktion an. Spontane Prozesse laufen ab, ohne dass Arbeit verrichtet werden muss, im Gegensatz zu nicht spontanen Prozessen, die erzwungen werden müssen. Die Unordnung in einem System nimmt zu, wenn ein spontaner Prozess abläuft, d.h. die Entropie steigt. Die treibende Kraft ist die Brown'sche Molekularbewegung, also das Bestreben der Teilchen sich gleichmäßig im Raum zu verteilen. [17]

Die Gibbs-Energie ΔG , oder auch freie Enthalpie, ist ein Maß für die Triebkraft eines Systems und wird auch in Joule gemessen. Sie gibt an, ob eine Reaktion freiwillig oder unfreiwillig abläuft. Reaktionen, die freiwillig ablaufen werden als exergon bezeichnet ($\Delta G < 0$) und wenn sie unfreiwillig ablaufen als endergon ($\Delta G > 0$). Die Gibbs-Energie lässt sich durch folgende Gleichung darstellen:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Ein weiterer wichtiger Faktor der Thermodynamik ist die Affinitätskonstante K . Sie gibt die Affinität eines Wirkstoffes zu seinem Rezeptor an und beschreibt den Gleichgewichtszustand der Reaktion. Je größer die Affinitätskonstante ($K > 1$) desto höher ist die Affinität zum Rezeptor und das Gleichgewicht ist auf der Produktseite. [18]

$$K = \frac{[\text{Wirkstoff} - \text{Rezeptor} - \text{Komplex}]}{[\text{Wirkstoff}] [\text{Rezeptor}]}$$

1.4.2. Intermolekulare Wechselwirkungen

Cyclodextrin Komplexe mit anderen Molekülen entstehen durch nicht-kovalente, intermolekulare Wechselwirkungen. Die Affinität hängt ab von der Stärke der elektrostatischen Wechselwirkungen und den Wasserstoffbrückenbindungen. Wasserstoffbrückenbindungen sind eine besondere Art von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Das H-Atom ist kovalent an ein elektronegatives Atom (O, N, Halogene, S) gebunden, sodass es eine positive Partialladung erhält. Die Bindung weist eine asymmetrische Elektronenverteilung auf und es entsteht ein Dipol. Es kann daher eine elektrostatische Bindung zu anderen Dipolen oder Ionen aufbauen, die negativ geladen sind. Wasserstoffbrückenbindungen sind essentiell für die Bildung von Cyclodextrin Komplexen mit Wirkstoffen. Außerdem wird auch die Struktur von Proteinen durch Wasserstoffbrücken bestimmt. Die α -Helix und das β -Faltblatt der Sekundärstruktur werden durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Die Bindungen sind ebenso für die sichere Speicherung von Erbinformation und die Struktur der DNA verantwortlich. Die Bindungsenergie von Wasserstoffbrücken beträgt 10-50 kJ/mol. Wasserstoffbrückenbindungen sind somit schwächer als kovalente Bindungen aber stärker als alle anderen intermolekularen Wechselwirkungen. [14]

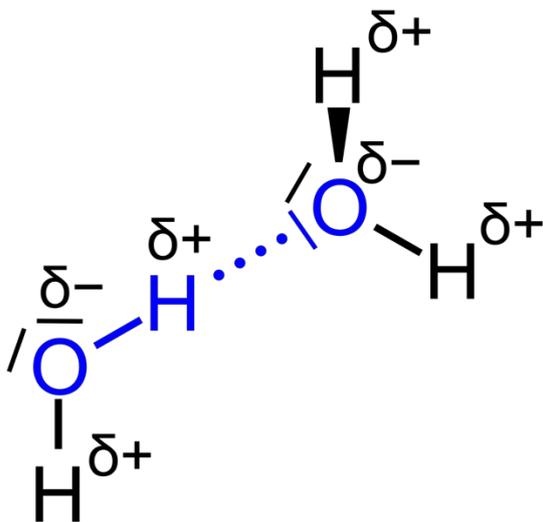


Abb. 5 Wasserstoffbrückenbindung [19]

Van-der-Waals-Kräfte entstehen zwischen apolaren Molekülen, indem vorübergehend eine Ladungsverschiebung stattfindet. Es entsteht ein temporärer Dipol, der einen gegensätzlich orientierten Dipol in einem benachbarten Molekül auslöst. Van-der-Waals-Kräfte sind im Vergleich zu Wasserstoffbrückenbindungen schwach.

Hydrophobe Wechselwirkungen entstehen durch eine räumliche Nachbarschaft von apolaren Molekülen und einer Umverteilung der umgebenden Wassermoleküle. Die Wassermoleküle gehen dabei in einen ungeordneten Zustand über. Der Ligand-Rezeptor-Komplex hat jetzt eine gemeinsame Hydrathülle, sodass insgesamt weniger Wassermoleküle dafür notwendig sind. Es kommt zu einer Zunahme der Entropie, aber eine Abnahme der Gibbs-Energie. Dieser Energiegewinn ist für die Stabilität des Komplexes verantwortlich. Die hydrophoben Wechselwirkungen werden deswegen auch als der Entropieeffekt bezeichnet. Ein bekanntes Beispiel wo hydrophobe Wechselwirkungen zum Einsatz kommen ist die Ausbildung der Phospholipiddoppelschicht. [14]

1.5. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

1.5.1. Aufbau und Funktionsweise

Die Mikrokolorimetrie ist eine Methode der biophysikalischen Chemie um thermodynamische Parameter zu messen. Das Prinzip der Mikrokolorimetrie beruht darauf, dass diese Wärmemenge als eine Temperaturänderung gemessen werden kann. Denn bei jeder chemischen Reaktion wird Energie in Form von Wärme aufgenommen oder abgegeben wird. Es werden hauptsächlich Reaktionen gemessen, die durch nicht kovalente Bindungen entstehen, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen. Da diese Wechselwirkungen sehr schwach sind, werden nur sehr geringe Wärmemengen im Bereich von μCal gemessen. Aus diesem Grund wird diese Methode als „Mikrokolorimetrie“ bezeichnet. Eine wichtige Anwendungsmöglichkeit dieser Messtechnik ist die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). [14]

Ein Mikrokalorimeter besteht aus einer Probenzelle und einer Referenzzelle, wobei beide Zellen thermostatisiert und isoliert sind. Die Referenzzelle enthält Wasser und wird auf eine bestimmte Temperatur aufgeheizt. Die Probenzelle wird feedback-kontrolliert auf die gleiche Temperatur wie die Referenzzelle aufgeheizt. Der konstante Stromfluss, der durch die Referenzzelle fließt wird in Joule gemessen. Die Probenzelle ist an eine rotierende Spritze angeschlossen. Die Spritze wird über eine motorgetriebene Bürette gesteuert und titriert stufenweise gleiche Volumina des Liganden in die Probenzelle ab. Wenn in der Probenzelle eine exotherme Reaktion abläuft und Wärme abgegeben wird, wird der Stromfluss gedrosselt und die Probenzelle ist wärmer als die Referenzzelle. Sobald eine endotherme Reaktion abläuft, wird Wärme aufgenommen und der Heizstrom muss verstärkt werden. Wenn der Heizwiderstand (R) bekannt ist, kann die abgegebene bzw. aufgenommene Energie durch eine Integration von J gegen t in μCal exakt berechnet werden. D.h. die Wärme bzw. Energie, die während einer chemischen Reaktion freigegeben oder benötigt wird, kann über die Stromstärke gemessen werden und wird als positiver oder negativer Peak registriert. [14]

1.5.2. Auswertung der Daten

Nach jeder Injektion kompensiert das Mikrokalorimeter die detektierte Wärmeänderung bis das Signal in seine Ausgangsposition zurückkehrt. Da das Gastmolekül in der Probenzelle immer mehr gesättigt ist, erfolgen weniger Bindungen und die Wärmeänderung nimmt ab. Die Peakflächen werden integriert und gegenüber dem molaren Verhältnis zwischen Ligand und Gastmolekül aufgetragen. Aus dem Bindungsmodell kann die Affinitätskonstante K abgeleitet kann. Das molare Verhältnis im Zentrum ist die Reaktionsstöchiometrie n . [14]

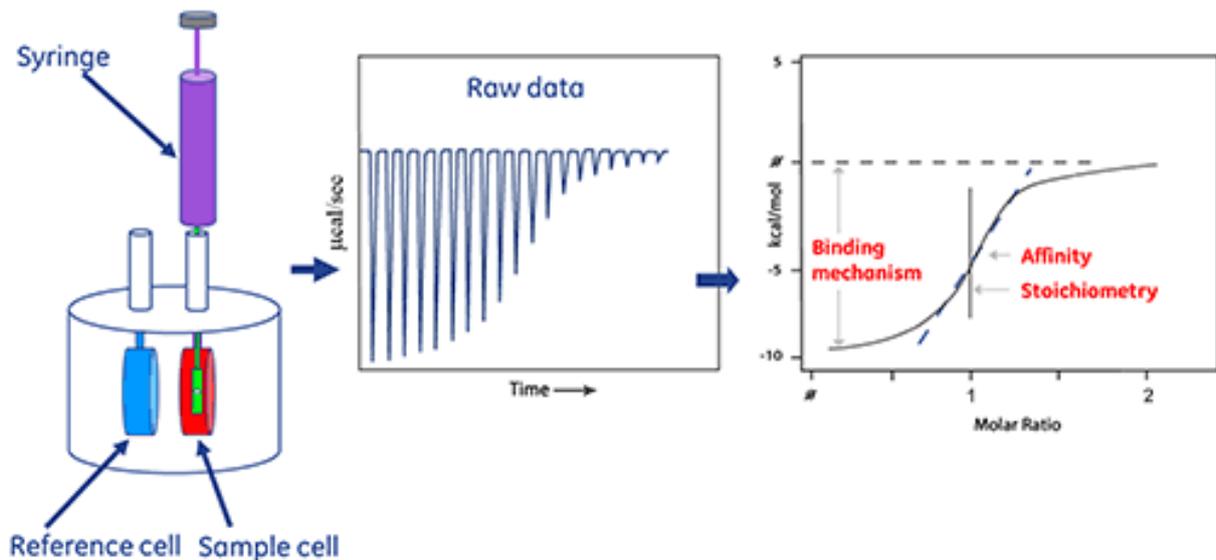


Abb 6. Aufbau eines ITC und die Datenauswertung [20]

Mit der ITC kann man über das Massenwirkungsgesetz die Affinitätskonstante K und die Reaktionsstöchiometrie n bestimmen. Die Enthalpie ΔH wird ebenso direkt gemessen und entspricht der abgegebenen Wärmemenge pro mol des gebundenen Liganden. Die Gibbs-Energie ΔG und die Entropie ΔS können über folgenden Zusammenhang berechnet werden:

$$-RT \ln K_a = \Delta G_b = \Delta H_b - T \Delta S_b$$

$$\Delta S_b = \Delta H_b / T + R \ln K_a$$

Durch die ermittelten ΔH und ΔS Werte kann man Aussagen darüber treffen, ob eine Reaktion enthalpie- oder entropiegetrieben ist. Enthalpie-Effekte bedeuten, dass es sich um Wasserstoffbrücken, Dipol-Dipol oder Van-der-Waals-Kräfte handelt. Entropie-Effekte wiederum deuten auf Hydratation oder Dehydratation hin. Positive ΔS Werte beispielsweise bedeuten, dass ein Ligand Wassermoleküle aus der Bindungstasche verdrängt und dadurch die Entropie steigt. Die Ergebnisse liefern somit ein komplettes thermodynamisches Profil der molekularen Wechselwirkungen. [14]

1.5.3. Anwendungsmöglichkeiten der ITC

Die ersten hochsensiblen ITC-Instrumente wurden vor ungefähr 25 Jahren entwickelt. 1990 wurden ersten Studien über diese Methode veröffentlicht und geben wichtige Einblicke in dieses Fachgebiet. Im Fokus der Forschung liegen Makromoleküle biologischen Ursprungs. Über 80% der Studien befassen sich mit Makromolekülen wie Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate. Dabei werden Interaktionen und Bindungsaffinitäten zwischen Ligand und dem Target ermittelt. Beispiele dafür sind Wechselwirkungen zwischen einem Enzym und seinem Substrat oder einem Antibiotikum und der Zellmembran.

Röntgenstrukturanalysen von Proteinen ermöglichen die Darstellung von Bindungstaschen und Proteinkomplexen gemeinsam mit deren Liganden. Außerdem kann sogar die Umverteilung von Wassermolekülen um eine Bindungstasche dargestellt werden. In Kombination mit den thermodynamischen Parametern, die mittels der ITC erfasst werden, kann man genaue Aussagen über Bindungsaffinitäten und Wechselwirkungen treffen. [21] [22]

ITC wird zusammenfassend für folgende Aufgabenbereiche eingesetzt:

- Charakterisierung des Wirkmechanismus
- Messung von Enzymkinetik
- Bestimmung der Bindungsaffinität
- Messung thermodynamischer Parameter
- Bestimmung der Polarität einer Bindungstasche
- Bestimmung von IC50 und EC50 Werten

1.6. Solvatisierung und Desolvatisierung

1.6.1. Definition

Als Solvatisierung bezeichnet man die Assoziation von Lösungsmittelmolekülen um einen gelösten Stoff. Dabei treten unterschiedliche Wechselwirkungen auf, wie Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Die gelösten Moleküle bekommen eine Solvathülle und sind in der Lösung stabilisiert. Während der Solvatisierung entsteht Energie, die sogenannte

Solvatationsenthalpie. Wenn das Lösungsmittel Wasser ist, spricht man auch von Hydratation.

Wenn Liganden an ihre Rezeptoren binden sind normalerweise beide von einer Hydrathülle umgeben. Es befinden sich sowohl in der Bindungstasche des Proteins Wassermoleküle als auch auf der Oberfläche des Liganden. Wenn ein Ligand an einem Protein bindet, muss er seine Hydrathülle durchdringen. Es werden Wassermoleküle aus der Bindungstasche des Proteins verdrängt und von der Oberfläche des Liganden abgestreift. Diesen Vorgang nennt man Desolvatisierung. Sobald die Wassermoleküle aus der Bindungstasche entfernt wurden, bilden sich intermolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, die den Komplex zusammenhalten. Die Wassermoleküle ordnen sich anschließend wieder um den Komplex, sodass der Ligand und das Protein nun eine gemeinsame Hydrathülle haben.

Während der Desolvatisierung kommt es zu energetischen Veränderungen. Sowohl die Enthalpie ΔH als auch die Entropie ΔS können dabei gemessen werden. Eine geeignete Methode dafür ist die isotherme Titrationskalorimetrie. Je nachdem ob sich die ΔH oder ΔS Werte verändern, kann man feststellen ob eine Reaktion enthalpie- oder entropiegetrieben ist. Es ist somit möglich den Prozess der Solvatisierung und Desolvatisierung genau zu definieren, indem alle thermodynamischen Parameter gemessen und interpretiert werden. Darüber hinaus kann über die Bindungskonstante K die Affinität zum Rezeptor bestimmt werden. [17]

1.6.2. Auswirkungen auf die Kinetik

Ein weiteres wichtiges Feld der biophysikalischen Chemie ist die Bestimmung der Kinetik. Dabei werden Reaktionsgeschwindigkeiten zwischen Molekülen und deren Rezeptoren ermittelt. Die Geschwindigkeit, mit der ein Arzneistoff an einen Rezeptor bindet ist die on-Kinetik und ist durch die Assoziationskonstante k_{on} definiert. Die off-Kinetik bzw. die Dissoziationskonstante k_{off} ist die Geschwindigkeit, mit der ein Arzneistoff-Rezeptorkomplex zerfällt. Die Zeit, in der der Arzneistoff-Rezeptorkomplex besteht, wird als „residence-time“ bezeichnet. Die „residence-time“ wird somit von den Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} bestimmt. Die Kinetik von Arzneistoffen ist daher wichtig, weil die Bioverfügbarkeit und

Verweildauer im systemischen Kreislauf davon abhängen. Abgesehen davon gibt es noch weitere Parameter, die die Wirkung in vivo beeinflussen, wie zum Beispiel die Eliminationsrate des Arzneistoffs, die Menge des Targets, das zur Verfügung steht oder das Konzentrationsprofil des Wirkstoffs im Plasma.

In einer Studie wurde mittels thermodynamischer Parameter die on- und off- Kinetik unterschiedlicher Liganden am Hitzeschockprotein 90 (Hsp 90) ermittelt. Das Hsp 90 wurde von K4DD ausgesucht, weil es ein gutes Beispiel dafür ist, wie wichtig die Kinetik für die Effektivität eines Arzneistoffs in vivo ist. Das Ziel war, die on-Kinetik von Inhibitoren unterschiedlicher Polarität zu bestimmen.

K4DD steht für Kinetics for Drug Discovery. Es handelt sich dabei um ein Gemeinschaftsprojekt, das von sechs europäischen Ländern 2012 gegründet wurde. Im Mittelpunkt dieses Projekts steht die Erforschung der Reaktionskinetik unterschiedlicher Substanzen und welche Faktoren die Kinetik beeinflussen. Darüber hinaus ist ein weiteres Ziel die „residence-time“ von Arzneistoffen zu ermitteln und zu optimieren. Dabei werden unterschiedliche experimentelle Methoden, wie ITC, SPR oder X-ray mit Moleküldynamik-Simulationen am Computer kombiniert. [23] Wenn Liganden an ihre Rezeptoren binden, kann die dafür benötigte Energie genau gemessen werden. Es muss dabei eine gewisse Energiebarriere überwunden werden. Die Energie wird als freie Energie ΔG_{on} gemessen. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird von der Assoziationskonstante k_{on} bestimmt. Sobald sich ein Komplex gebildet hat muss wieder eine Energiebarriere überwunden werden damit der Ligand dissoziieren kann. Die Freie Energie wird als ΔG_{off} angegeben und von ihr hängt die Geschwindigkeitskonstante k_{off} für die Rückreaktion ab. Sowohl die on- als auch die off-Kinetik sind wichtig für die Effektivität eines Arzneistoffes in vivo.

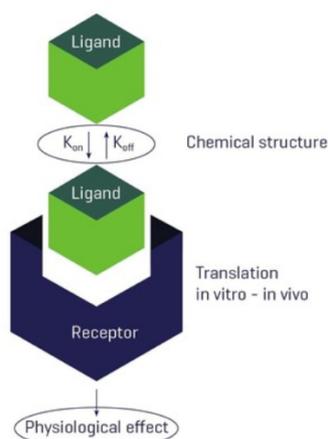


Abb. 7 On- und Off-Kinetik eines Liganden am Rezeptor [24]

Röntgenstrukturanalysen von Proteinen und Liganden wurden auch hier herangezogen, um die genaue Struktur ausfindig zu machen und die Polarität von Bindungstaschen zu bestimmen.

Die Inhibitoren des Hsp90 wurden so modifiziert, dass Reste mit unterschiedlicher Polarität eingeführt wurden. Es hat sich herausgestellt, dass die Desolvatisierung eine wichtige Rolle bei der on- und off- Kinetik spielt. Die Desolvatisierungsenergie wird als freie Energie ΔG_{desolv} gemessen. Je polarer die eingeführten Reste waren, desto höher war die Desolvatisierungsenergie. Dadurch wurde k_{on} also die on-Kinetik deutlich herabgesetzt. Wenn ein Ligand sehr polar ist und die Bindungstasche hydrophob spielt die Desolvatisierung eine sehr große Rolle. Denn die Wassermoleküle müssen erstmal abgestreift werden, damit der Ligand in die Bindungstasche hineindringen kann. Ebenso müssen aus der Bindungstasche Wassermoleküle verdrängt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass polare Liganden zu einer enthalpischen Energiebarriere bzw. einer Erhöhung der Desolvatisierungsenergie führen. Dadurch wird die On-Kinetik verlangsamt und die Assoziation erschwert, vor allem wenn die Bindungstasche hydrophob ist. Dieser Prozess ist durch chemische Modifikation steuerbar und kann zur Leitsubstanzoptimierung beitragen. [25]

Eine andere Studie beschäftigte sich mit der Ermittlung der Bindungsaffinitäten und Wechselwirkungen zwischen Phosphorverbindungen und Thermolysin. Dabei stand die Desolvatisierung der Bindungstasche im Mittelpunkt. Um den genauen Wirkmechanismus und alle Wechselwirkungen, die stattfinden zu untersuchen, ist es notwendig mehrere unterschiedliche Methoden zu kombinieren. Deswegen wurden auch hier kristallographische Röntgenstrukturaufnahmen herangezogen von Komplexen zwischen unterschiedlichen Inhibitoren und dem Thermolysin. Das Besondere an dieser Arbeit ist, dass auch isotherme Titrationskalorimetrie angewendet wurde, um die thermodynamischen Parameter zu ermitteln.

Desolvatisierung ist immer Voraussetzung für die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor in einer wässrigen Umgebung. Das Verdrängen der Wassermoleküle aus der Bindungstasche in das umgebende Wasser ist der hydrophobe Effekt. Wenn Wassermoleküle aus der Bindungstasche entfernt werden, führt das in diesem Fall nur zu einer geringen Veränderung der Entropie, weil sie bereits der Bindungstasche in einem ungeordneten Zustand sind. Sobald sie die Bindungstasche verlassen,

bilden sie Wasserstoffbrücken zu anderen Wassermolekülen, die sie umgeben, sodass dieser Prozess insgesamt energetisch günstiger ist. D.h. die Entropie steigt an aber die Verdrängung der Wassermoleküle an das umgebende Wasser ergibt einen enthalpisch günstigen Zustand, sodass dieser Effekt überwiegt. Es kommt zu einer sogenannten Enthalpie-Entropie Kompensation. Außerdem tragen auch Van-der-Waals-Kräfte zur Stabilität des Komplexes bei.

Die Röntgenstrukturaufnahmen zeigen, dass in der Bindungstasche des Thermolysins drei Wassermoleküle enthalten sind. Sobald sich ein Komplex gebildet hat, werden alle drei Wassermoleküle aus der Bindungstasche entfernt. Es erfolgt also eine Desolvatisierung, damit der Ligand binden kann. Dieser Vorgang spiegelt sich auch in den thermodynamischen Parametern wider. Der enthalpische Beitrag ΔH der Gibbs-Energie ΔG kann mittels ITC direkt gemessen werden. Die Dissoziationskonstante K wird auch direkt bestimmt und aus der Gleichung kann die Entropie ΔS berechnet werden (s.o.).

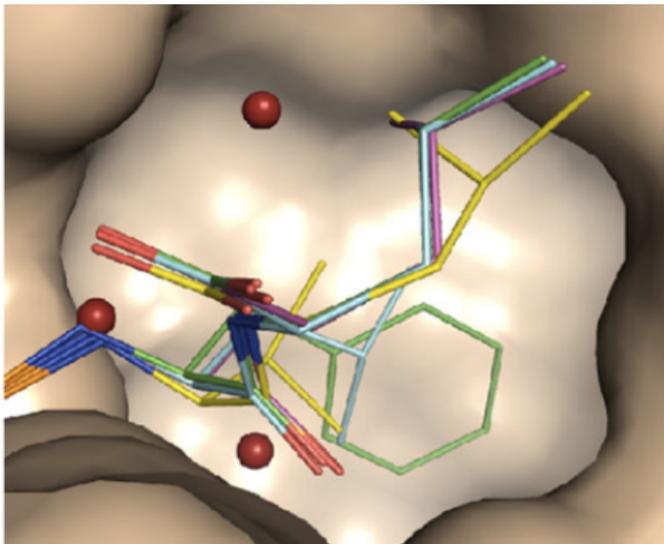


Abb. 8 Wassermoleküle in der Bindungstasche des Thermolysins [26]

ΔG hängt sowohl von ΔH als auch von ΔS ab. Je nachdem was den höheren und energetisch günstigeren Beitrag leistet, wirkt sich das auf ΔG aus. Man kann somit mittels ITC enthalpie- und entropiegetriebenen Reaktionen messen. [26]

2. Zielsetzung

Eine erfolgreiche Behandlung der Multi-Drug-Resistance wäre ein großer Fortschritt in der Forschung. MDR entsteht indem Chemotherapeutika über das P-Glykoprotein aus Tumorzellen ausgeschleust werden. Das P-Glykoprotein ist ein Effluxtransporter, der seine Substrate aus der Zellmembran in den extrazellulären Raum transportiert. Tumorzellen werden dadurch resistent. Viele Cytostatika, wie zum Beispiel Vinblastin, Doxorubicin oder Paclitaxel werden somit unwirksam. Die Behandlung unterschiedlicher Krebsarten wie Brustkrebs oder Leberzellkarzinom wird dadurch sehr problematisch. Physiologisch ist das P-Glykoprotein für die Entgiftung der Zellen verantwortlich.

Verapamil und Propafenon sind P-Glykoprotein-Inhibitoren. Sie sind in der Lage das P-Glykoprotein zu blockieren, sodass Zytostatika nicht mehr aus der Zelle gepumpt werden. Sie können also zur Behandlung gegen die MDR eingesetzt werden.

Vorangehende Untersuchungen sowie Moleküldynamik-Simulationen legen nahe, dass der inhibitorische Effekt von Propafenon-Analoga am P-Glykoprotein u.U. durch ein langsames Abdissoziieren vom open-to-out State des Transporters dominiert wird. Dies sollte durch mikrokalorimetrische Methoden messbar sein. Da die Herstellung der dafür notwendigen Protein-Nanodiscs sowie die Etablierung einer Messmethode für eine Diplomarbeit als zu aufwendig erachtet wurde, war das Ziel dieser Arbeit, Cyclodextrine als Modellsystem für ITC Messungen zu etablieren. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Solvatisierungs- und Desolvatisierungsenergie von Cyclodextrin-Komplexen mit Verapamil und Propafenon zu messen. Die Methode, die angewendet wurde, war isotherme Titrationskalorimetrie. Mittels nITC kann man thermodynamische Parameter wie Enthalpie ΔH , Entropie ΔS und die Bindungskonstante K bestimmen. Indem diese Parameter gemessen und interpretiert werden, kann man ableiten, ob eine Reaktion entropie- oder enthalpiegetrieben ist und welche Wechselwirkungen während der Komplexbildung entstehen. Man kann unter anderem auch die On- und Off-Kinetik bestimmen. Die Kinetik hängt ab von der Desolvatisierung. In wässrigen Lösungen spielt die Desolvatisierung bzw. die Solvatisierung immer eine große Rolle. Insgesamt erhält man ein thermodynamisches Profil der Cyclodextrin-Komplexe mit den Arzneistoffen. Als Vorlage für den Experimentaufbau und die Durchführung wurde eine Arbeit von David Landy und Eleonore Bertaut von der Université Lille – Nord-de-France

verwendet. Dort wurden Versuche durchgeführt mit unterschiedlichen Cyclodextrinen, unter anderem auch mit β -Cyclodextrin. Der verwendete Arzneistoff war jedoch Ibuprofen. In dieser Arbeit sind Verapamil und Propafenon verwendet worden. [27]

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Etablierung der Methode. Es wurden erste Pilotexperimente durchgeführt. Als Modellsystem wurden Verapamil mit β -Cyclodextrin verwendet und Propafenon mit β -Cyclodextrin. Es sind einerseits Titrations-Experimente durchgeführt worden, um die Assoziation also die Komplexbildung zu bestimmen. Andererseits wurden Release-Experimente durchgeführt um die Dissoziation von den Komplexen zu bestimmen.

Über Cyclodextrin-Komplexe mit Verapamil oder Propafenon sind nur wenige Studien durchgeführt worden. Besonders interessant dabei ist die Beobachtung der Komplexbildung mittels nITC, weil bisher keine beziehungsweise nur sehr wenige Daten vorliegen.

3. Methoden und verwendete Materialien

3.1. Nano Isothermes Titrationskalorimeter (nITC)

3.1.1. Der Kalorimeterblock

Isotherme Titrationskalorimetrie eignet sich sehr gut um thermodynamische Parameter von Reaktionen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde ein Nano Isothermes Titrationskalorimeter Low Volume (nITC LV) von TA Instruments verwendet.

Ein Isothermes Titrationskalorimeter besteht aus einem Kalorimeterblock in dem sich zwei Reaktionszellen befinden. Eine Zelle ist die Referenzzelle, die andere eine Probenzelle. Die Reaktionszellen sind durch eine vakuumdichte Kammer vor Schwankungen der Raumtemperatur isoliert. Im Kalorimeterblock befindet sich ein thermoelektrischer Generator der Temperaturunterschiede zwischen der Referenzzelle und der Probenzelle wahrnimmt. Wenn ein Temperaturunterschied wahrgenommen wird, wird die Energie, die nötig ist diesen Unterschied wieder auszugleichen als Peak aufgenommen. Die Stromstärke wird als eine Funktion der Zeit registriert. Das Titrationskalorimeter ist an einen Computer angeschlossen und wird so gesteuert. Das verwendete Programm ist ITC-Run.

Die Vorteile von einem Nano ITC Low Volume sind, dass weniger Probenvolumen notwendig ist, wodurch sich die Titrationszeit um die Hälfte verkürzt. Die Empfindlichkeit ist doppelt so hoch im Vergleich zu einem Nano ITC Standard Volume und man erhält genaue und reproduzierbare Ergebnisse.

Die Referenzzelle und die Probenzelle haben ein Volumen von 190 μl , da es sich hier um ein Nano ITC Low Volume handelt. Sie bestehen aus Gold und sind nur durch eine schmale Platinröhre zugänglich. In der Referenzzelle befindet sich während der Experimente immer eine Referenznadel um die gleichen Bedingungen nachzuahmen wie in der Probenzelle. [28]



Abb. 9 Nano ITC Low Volume

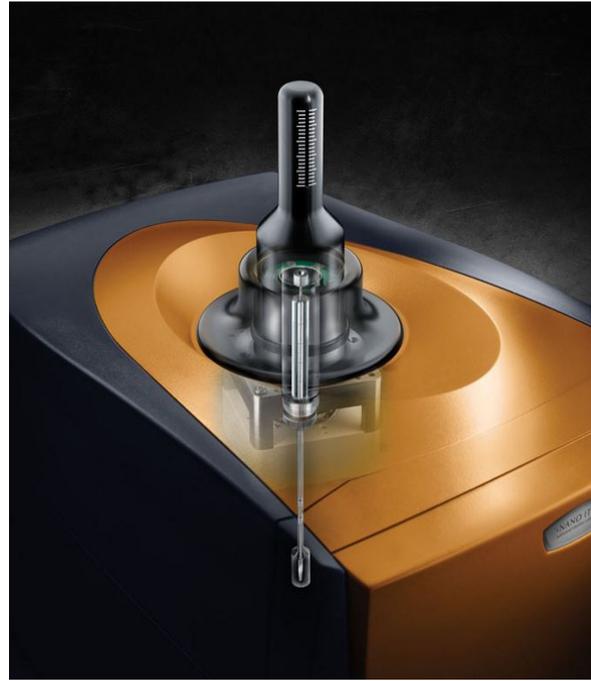


Abb. 10 Detailansicht vom Nano ITC LV [29]

3.1.2. Spritze und Bürette

Das Nano ITC Low Volume beinhaltet eine 50 μl Spritze. Die Spritze wird mit der Probe befüllt und fungiert in der Probenzelle als Rührer. Die Spritze hat einen gewundenen Paddel, der die Lösung in die Probenzelle titriert und rührt. Sie ist perfekt ausbalanciert damit immer gleichmäßig gerührt wird. Die Spritze ist an eine motorgetriebene Bürette fixiert. Mit dem Programm ITC-Run kann man das Injektionsvolumen, die Rührgeschwindigkeit, und das Injektionsintervall einstellen. Je nach Einstellung werden immer gleiche Volumina in gleichen Abständen in die Probenzelle titriert. Beim Befüllen der Spritze ist es wichtig zwischen Stempel und Flüssigkeit eine kleine Luftblase zu lassen.

Die Bürette hat eine Skala mit einem Indikator, der die Position der Spritze anzeigt. Der Indikator ist immer auf der Startposition bevor man die Spritze installiert. Die Spritze wird in den Schaft der Bürette hineingeschraubt. Die Bürette wird gemeinsam mit der Spritze in das Kalorimeter eingesetzt. [24]



Abb. 11 Spritze mit Bürette



Abb. 12 Probenzelle und Referenzzelle

Tab. 1 Technische Spezifikationen des nITC LV [24]

Dimensionen	Tiefe 53 cm Breite 35 cm Höhe 28 cm
Gewicht	17 kg
Temperaturbereich	2 bis 80 °C
Temperaturstabilität	0,0002 bis 25 °C
Kleinste messbare Wärme	0,05 µJ
Maximal messbare Wärme	5.000 µJ
Basislinienstabilität	0,02 µW/h
Rauschpegel	0,0014 µWatt
Ansprechzeit	11 Sekunden
Zellenvolumen	190 µL
Probenvolumen	300 bis 700 µL
Zellkonfiguration	Zylindrisch, fest eingebaut
Zellmaterial	24 K Gold
Volumen der Injektionsspritzen	50 µL
Injektionsintervall	Mind. 150 sec
Rührgeschwindigkeit	150 bis 400 rpm

3.2. Degassing Station

3.2.1. Allgemeines

Die Degassing Station wird für die Probenvorbereitung der Experimente verwendet. Sie besteht aus einer Degassing-Kammer und ist an Vakuum angeschlossen. Während eines Experiments werden die Proben in den Reaktionszellen aufgeheizt. Dabei kann es passieren, dass sich Luftblasen bilden. Luftblasen führen dazu, dass die Thermogramme verrauscht sind und die Ergebnisse verfälscht werden. Deswegen müssen vor jedem einzelnen Experiment alle Proben entgast werden. Die Entgasung der Proben dauert 15 bis 30 Minuten.

Auf dem Touchscreen kann man das Setup für die Probenvorbereitung einstellen. Die Proben können bereits in der Degassing Station aufgeheizt werden, der Temperaturbereich ist 0 bis 80°C. Außerdem hat die Degassing Station auch eine Rührfunktion mit einer Rührgeschwindigkeit von 120 bis 1500 rpm. Mittels einem Magnetrührstäbchen können die Proben in der Degassing-Kammer homogenisiert werden.

Mit einem speziellen Reinigungsadapter, der an die Degassing Station angeschlossen werden kann, kann man die Reaktionszellen reinigen. Die Degassing Station saugt die Proben aus den Zellen.

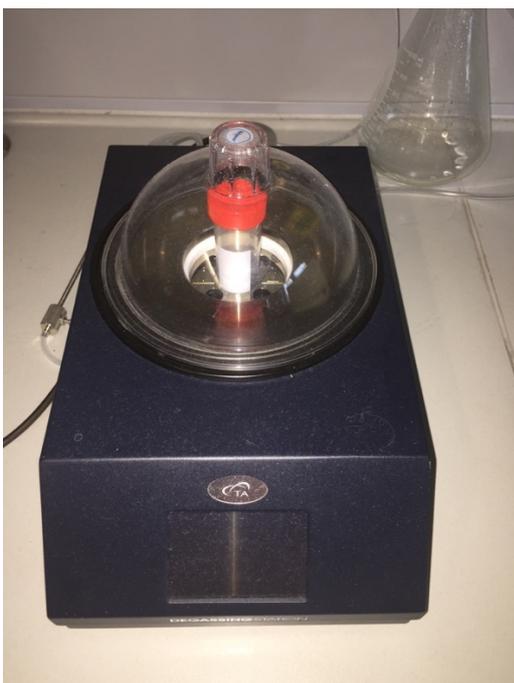


Abb. 13 Degassing Station

3.2.2. Praktische Vorgehensweise

Die ersten Experimente, die am Nano ITC durchgeführt worden sind, waren Testversuche mit einem ITC Test-Kit. Das Test-Kit beinhaltet folgende Lösungen:

- 15 mL Deionisiertes Wasser
- 3 mL Calcium in 10 mM MES-Puffer, pH 6 (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)
- 8 mL EDTA in 10 mM MES-Puffer, pH 6

Das Test-Kit eignet sich einerseits für „water into water“ Experimente um die Temperaturkontrolle zu validieren und um festzustellen wo das Detektionslimit des Kalorimeters liegt. Andererseits kann man mit dem Ca²⁺/EDTA-Set Titrationsversuche durchführen und damit prüfen ob die Spritze richtig kalibriert. Man kann auch das effektive Volumen der Probenzelle bestimmen. [28]

Tab. 2 ITCRun-Setup

Number of injections	20
Injection volume	2,5 µL
Injection interval	200 sec
Stirrer speed	350
Temperature	25°C
Auto Equilibrate	On
Expected Heats	Medium
Timeout	1800 sec
Initial Baseline	200 sec
Syringe concentration	Calcium in 10 mM MES-Puffer
Cell concentration	EDTA in 10 mM MES-Puffer

15 mL deionisiertes Wasser wird für 30 Minuten bei 25°C in der Degassing Station entgast. Die Referenzzelle wird dreimal mit 300 µL deionisiertem Wasser mit einer Spritze gespült. Danach wird sie mit 300 µL deionisiertem Wasser luftblasenfrei befüllt. Um Luftblasen zu vermeiden, rührt man mit der Spritze in der Referenzzelle kurz um.

Die Calciumlösung und die EDTA Lösung werden ebenso für 30 Minuten in der Degassing Station bei 25°C entgast. Die Probenzelle wird dreimal mit 300 µL EDTA-Lösung gespült und danach mit 300 µL der gleichen Lösung luftblasenfrei befüllt. Die Spritze wird dreimal mit 50 µL Calciumlösung gespült. Sie wird dann mit 50 µL Calciumlösung befüllt. Zwischen dem Stempel der Spritze und der Lösung muss eine kleine Luftblase übriggelassen werden. Die Spritze wird in die Bürette montiert. Wenn Probenüberschuss aus der Spritze gepresst wird muss er abgewischt werden. Die Spritze wird dann in das nITC montiert und das Experiment wird am Computer gestartet.

Auf den folgenden Thermogrammen ist der Unterschied zwischen einem Experiment mit und ohne Entgasung deutlich zu sehen. Beide Experimente sind unter gleichen Bedingungen durchgeführt worden. Trotzdem ist das eine Thermogramm (Abb. 12) sehr verrauscht, weil die Probe nicht entgast worden ist und es in der Reaktionszelle zur Luftblasenbildung gekommen ist. Im Gegensatz dazu sieht man am zweiten Thermogramm (Abb. 13) deutliche Peaks, die nicht verrauscht sind.

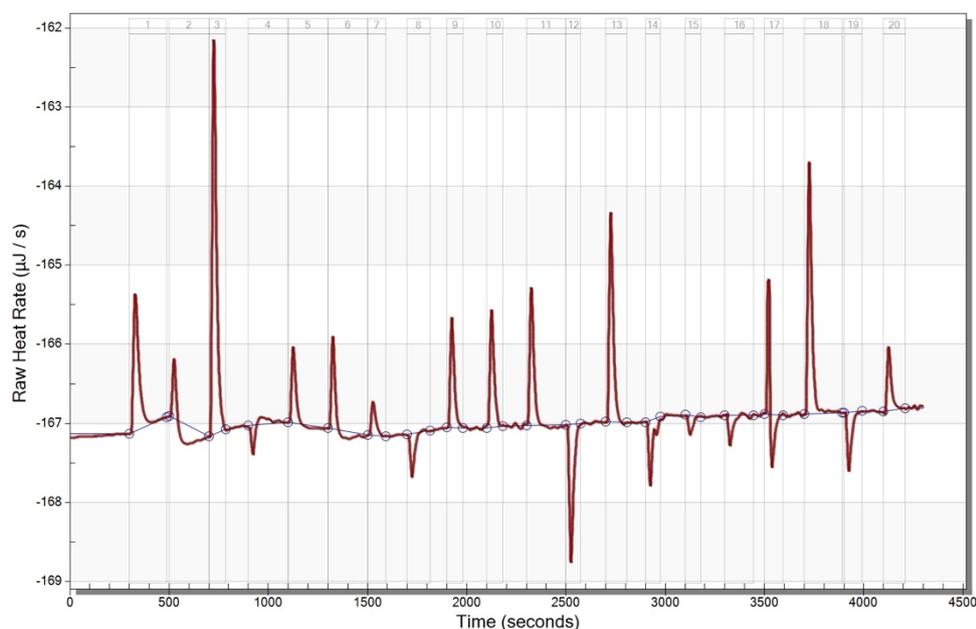


Abb. 14 Titration_Ca-EDTA ohne Entgasung

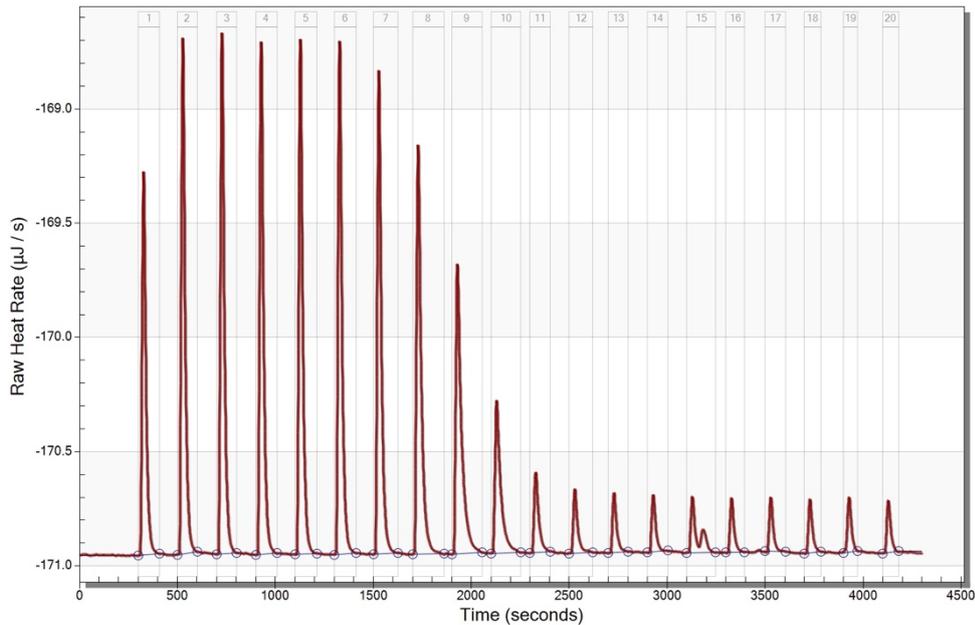


Abb. 15 Titration_Ca-EDTA mit Entgasung

3.3. Experimentaufbau

Für beide Arzneistoffe wurden drei Arten von Experimenten durchgeführt:

- Blank-Experimente
- Titration-Experimente
- Release-Experimente

Es sind jeweils immer alle drei Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen und Konzentrationen durchgeführt worden. Das Ziel war es die Bindungskonstante und die Enthalpie, die bei der Komplexbildung entsteht zu messen.

Beim Blank-Experiment ist in der Spritze das β -Cyclodextrin (β -CD) und in der Probenzelle Wasser. Blank-Experimente müssen immer von allen Experimenten abgezogen werden. Dabei wird die Wärme, die bei der Verdünnung entsteht abgezogen, also die Reibungsenergie.

Es erfolgt eine Titration von β -CD in deionisiertes Wasser. Der Titrant ist immer in der Spritze und der Titrand in der Probenzelle. Die β -Cyclodextrin Lösung muss vor jedem Experiment frisch hergestellt werden. Allgemein gilt für alle Experimente, dass das Verhältnis der Konzentrationen 1:10 sein muss. Die β -Cyclodextrin Lösung ist

immer 10-mal höher dosiert als die Lösungen der Arzneistoffe. β -Cyclodextrin Lösungen dürfen jedoch nicht zu hoch dosiert sein, weil es sonst zur Selbstaggregation kommt.

Bei einem Titration-Experiment ist das β -Cyclodextrin in der Spritze und der Arzneistoff in der Probenzelle. Cyclodextrine fördern die Löslichkeit von hydrophoben Gastmolekülen. Aus diesem Grund sind Titrations-Experimente so aufgebaut, dass in der Spritze das Cyclodextrin ist und in der Probenzelle das Gastmolekül bzw. der Arzneistoff. Bei Titration-Experimenten wird die Komplexbildung zwischen dem Cyclodextrin und dem Gastmolekül ermittelt. Wenn sich immer mehr und mehr Komplexe bilden, sinkt die Konzentration des Arzneistoffs in der Probenzelle bis sich keine weiteren Komplexe bilden und keine Wärme mehr gemessen werden kann.

Release-Experimente sind Verdünnungsexperimente. In diesem Fall sind sowohl das Gastmolekül als auch das Cyclodextrin als Komplex in der Spritze. Es wird eine Lösung hergestellt, in der beide Komponenten enthalten sind. In der Probenzelle befindet sich nur Wasser. Sobald die Probe in die Zelle injiziert wird, kommt es zu einer Verdünnung der Lösung. Bei Release-Experimenten wird die Dissoziation der Komplexe ermittelt. [25]

3.3.1. Verapamil

- Experimente mit einer 10 mM β -Cyclodextrin Lösung bei 25°C:

Blank

Herstellung der β -Cyclodextrin-Lösung:

Für jeden Experimentdurchlauf wurden 40 mL einer β -Cyclodextrin Lösung hergestellt. Verwendet wurde Kleptose/Beta Cyclodextrine Ref. 504190 – Roquette. Das Molekulargewicht von β -CD beträgt 1135 g/mol.

- für die Herstellung von 40 mL einer 10 mM Lösung (0,0004 mol) sind 0,454 g β -CD notwendig

Die Lösungen wurden in einem 50ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen hergestellt. Das β -Cyclodextrin wurde auf einer Analysenwaage eingewogen. Dann

wurde mit deionisiertem Wasser auf 40 mL aufgefüllt. Um das β -Cyclodextrin vollständig zu lösen muss man es für 15 Minuten mit einem Ultraschallbad behandeln.

Die β -CD Lösung und das deionisierte Wasser werden direkt vor der Messung für 30 Minuten bei folgenden Einstellungen entgast: 800 rpm – 25°C – 645mm Hg.

Die Referenzzelle wird einmal wöchentlich mit entgastem deionisiertem Wasser gespült und mit 300 μ L Wasser befüllt.

Die Probenzelle wird dreimal mit 300 μ L entgastem deionisiertem Wasser gespült.

Danach wird sie mit 300 μ L entgastem deionisiertem Wasser luftblasenfrei befüllt.

Die Spritze wird dreimal mit 50 μ L entgaster β -CD Lösung gespült und danach mit 50 μ L β -CD Lösung befüllt. Zwischen dem Stempel der Spritze und der Flüssigkeit lässt man eine kleine Luftblase. Die Einstellungen am nITC waren folgende:

Tab. 3 Einstellungen für das Blank-Experiment - Verapamil

Method	Incremental titration
Number of injections	11
Injection volume	3.7 μ L (3.68 μ L) 1. Injection: 1 μ L (0.95 μ L)
Injection interval	150 sec
Stirrer speed	350
Temperature	25°C
Auto Equilibrate	On
Expected Heats	Medium
Timeout	1800 sec
Initial Baseline	200 sec
Syringe concentration (β -CD-1)	9.943 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

Als Methode wurde „incremental titration“ gewählt d.h. eine stufenweise Titration mit 11 Injektionen. Die erste Injektion hat immer ein kleineres Volumen als die restlichen Injektionen. In der Spritze befindet sich die 10 mM β -Cyclodextrin Lösung und in der Probenzelle Wasser.

Titration

Herstellung der Lösungen:

Die β -Cyclodextrin-Lösung wurde jeweils vom dazugehörigen Blank-Experiment verwendet. Die β -CD-Lösung wurde bei allen Titration-Experimenten mit der Spritze injiziert und ist somit der Titrant. Bei jedem Experimentdurchlauf wird zuerst der Blank gemessen und daraufhin die restlichen Experimente. Die Lösung wird vor dem Experiment für 30 Minuten entgast mit folgenden Einstellungen: 800 rpm – 25°C – 635 mm Hg.

Herstellung der Verapamil-Lösung:

Für die Herstellung der Verapamil-Lösung wurden 0,02 g Verapamil in 50 mL deionisiertem Wasser in einem Erlenmeyerkolben aufgelöst. Anschließend wurde die Lösung für 15 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Damit sich das Verapamil vollständig auflöst, wurde die Lösung für 24h auf einer Magnetrührplatte bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung in ein 50 mL CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen mit einem 0,45 μ m Filter filtriert. Es wurde (\pm)-Verapamil-Hydrochlorid von der Firma SIGMA verwendet. Das Molekulargewicht beträgt 491,06 g/mol. Die Lösung wurde vor dem Experiment für 30 Minuten entgast mit folgenden Einstellungen: 800 rpm – 25°C – 635 mm Hg.

Die Probenzelle wird dreimal mit 300 μ L entgastem Verapamil-Lösung gespült.

Danach wird sie mit 300 μ L entgaster Verapamil-Lösung luftblasenfrei befüllt.

Die Spritze wird dreimal mit 50 μ L entgaster β -CD Lösung gespült und danach mit 50 μ L β -CD Lösung befüllt. Lösungsüberschuss am Paddel der Spritze wird immer abgewischt damit der erste Peak nicht verfälscht wird.

Tab. 4 Einstellungen für das Titration-Experiment - Verapamil

Number of injections	11
Injection volume	3.7 μ L (3.68 μ L) 1. Injection: 1 μ L (0.95 μ L)
Injection interval	150 sec
Stirrer speed	350
Temperature	25°C
Auto Equilibrate	On

Expected Heats	Medium
Timeout	1800 sec
Initial Baseline	200 sec
Syringe concentration (β -CD-1)	9,943 mM
Cell concentration (Verapamil)	0.858 mM

Release

Beim Release-Experiment wird eine Lösung mit β -Cyclodextrin in Kombination mit Verapamil hergestellt. Der Komplex bildet sich bereits in dieser Lösung. Die Lösung wird in deionisiertes Wasser in der Probenzelle titriert.

Herstellung der Lösung:

Es werden 0,02 g Verapamil Hydrochlorid in einem Erlenmeyerkolben eingewogen. Zum Auflösen wird die 10 mM β -Cyclodextrin Lösung verwendet, die für die Blank Messung genutzt wurde. Das Verapamil wird mit 20 mL β -Cyclodextrin Lösung aufgelöst. Die Lösung wird für 15 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Damit sich das Verapamil vollständig löst, wird die Lösung für 24 Stunden auf einer Magnetrührplatte bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird anschließend in ein 50 mL CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen mit einem 0,45 μ m Filter filtriert.

Die Lösung und das deionisierte Wasser werden direkt vor der Messung für 30 Minuten bei folgenden Einstellungen entgast: 800 rpm – 25°C – 645mm Hg.

Die Probenzelle wird dreimal mit 300 μ L entgastem deionisiertem Wasser gespült. Danach wird sie mit 300 μ L entgastem deionisiertem Wasser luftblasenfrei befüllt. Die Spritze wird dreimal mit 50 μ L entgaster β -CD/Verapamil Lösung gespült und danach mit 50 μ L Lösung befüllt.

Tab. 5 Einstellungen für das Release-Experiment - Verapamil

Number of injections	11
Injection volume	3.7 μ L (3.68 μ L) 1. Injection: 1 μ L (0.95 μ L)
Injection interval	150 sec

Stirrer speed	350
Temperature	25°C
Auto Equilibrate	On
Expected Heats	Medium
Timeout	1800 sec
Initial Baseline	200 sec
Syringe concentration (β -CD-1 + Verapamil)	β -CD: 9.943 mM Verapamil: 2.045 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

- Experimente mit einer 15 mM β -Cyclodextrin Lösung bei 25°C:

Blank

Herstellung der β -Cyclodextrin-Lösung:

Für jeden Experimentdurchlauf wurden 40 mL einer β -Cyclodextrin Lösung hergestellt. Verwendet wurde Kleptose/Beta Cyclodextrine Ref. 504190 – Roquette. Das Molekulargewicht von β -CD beträgt 1135 g/mol.

- für die Herstellung von 40 mL einer 15 mM Lösung (0,0006 mol) sind 0,681 g β -CD notwendig

Die Lösungen wurden in einem 50ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen hergestellt. Das β -Cyclodextrin wurde auf einer Analysenwaage eingewogen. Dann wurde mit deionisiertem Wasser auf 40 mL aufgefüllt. Es wurde für 15 Minuten mit einem Ultraschallbad behandeln.

Die Durchführung des Experiments ist analog zum vorherigen Experiment. Es wurde ebenso bei 25 °C gemessen.

Die Konzentrationen dieser Messung sind folgende:

Syringe concentration (β -CD-1)	15.405 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

Titration:

Syringe concentration (β -CD-1)	15.405 mM
Cell concentration (Verapamil)	0.823 mM

Release

Syringe concentration (β -CD-1 / Verapamil)	15.405 mM / 2.030 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

- Experimente mit einer 15 mM β -Cyclodextrin Lösung bei 30°C und bei 37°C:

Die Lösungen wurden analog zu den Experimenten die bei 25°C durchgeführt worden sind hergestellt. Die Einstellungen am ITC-Run für die Experimente sind ebenfalls übernommen worden. Die einzige Änderung dabei war die Temperatur. Alle drei Experimente, Blank, Titration und Release sind bei einer Temperatur von 30°C und 37°C durchgeführt worden. Die Proben wurden bereits in der Degassing station auf 30°C bzw. 37°C erwärmt.

Das Ziel dabei war es die Komplexbildung bei unterschiedlichen Temperaturen zu beobachten. Wenn Änderungen in den thermodynamischen Parametern gemessen werden, kann man davon ableiten welchen Einfluss die Temperaturänderung auf die Komplexbildung hat. 37°C wurden gewählt um die Komplexbildung bei Körpertemperatur zu ermitteln.

Konzentrationen der Lösungen bei 30°C mit 15 mM β -CD:

Titration:

Syringe concentration (β -CD-1):	14.944 mM
Cell concentration (Verapamil):	0.822 mM

Release:

Syringe concentration (β -CD-1 / Verapamil)	14.944 mM / 2.034 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

Konzentrationen der Lösungen bei 37°C mit 15 mM β -CD:

Titration:

Syringe concentration (β -CD-1)	14.944 mM
Cell concentration (Verapamil)	0.854 mM

Release:

Syringe concentration (β -CD-1 / Verapamil)	14.944 mM / 2.045 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

3.3.2. Propafenon

- Experimente mit einer 10 mM β -Cyclodextrin Lösung bei 25°C:

Blank

Herstellung der β -Cyclodextrin-Lösung:

Die β -Cyclodextrin Lösung wurde genauso wie für die Verapamil-Experimente hergestellt.

- für die Herstellung von 40 mL einer 10 mM Lösung (0,0004 mol) sind 0,454 g β -CD notwendig

Es wurde Kleptose/Beta Cyclodextrine Ref. 504190 – Roquette verwendet.

Die β -CD Lösung und das deionisierte Wasser werden direkt vor der Messung für 30 Minuten bei folgenden Einstellungen entgast: 800 rpm – 25°C – 665mm Hg.

Die Probenzelle wird mit 300 μ L entgastem deionisiertem Wasser luftblasenfrei befüllt.

Die Spritze wird mit 50 μ L β -CD Lösung befüllt.

Tab. 6 Einstellungen für das Blank-Experiment - Propafenon

Number of injections	11
Injection volume	3.7 μ L (3.68 μ L) 1. Injection: 1 μ L (0.95 μ L)
Injection interval	150 sec
Stirrer speed	350
Temperature	25°C
Auto Equilibrate	On
Expected Heats	Medium
Timeout	1800 sec
Initial Baseline	200 sec
Syringe concentration (β -CD-2)	10.007 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

Titration

Die β -Cyclodextrin Lösung für die Spritze wurde vom dazugehörigen Blank-Experiment verwendet.

Herstellung der Propafenon-Lösung:

Um die Propafenon Lösung herzustellen wurde Propafenon Hydrochlorid von der Firma SIGMA verwendet. Das Molekulargewicht beträgt 377,90 g/mol. Für die Herstellung der Lösung wurde 0,02 g Propafenon Hydrochlorid in 50 mL deionisiertem Wasser aufgelöst. Anschließend wurde es in einem Ultraschallbad für 15 Minuten gelöst. Dann wurde es für 24 Stunden auf einer Magnetrührplatte bei Raumtemperatur gelöst. Danach wird die Lösung durch ein 0,45 μ m Filter in ein 50 mL CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen filtriert. Vor dem Experiment wird die Lösung für 30 Minuten entgast: 800 rpm – 25°C – 635 mm Hg.

Die Probenzelle wurde mit 300 μ L Propafenon-Lösung befüllt. Die Spritze wurde mit 50 μ L β -Cyclodextrin Lösung befüllt.

Tab. 7 Einstellungen für das Titration-Experiment - Propafenon

Number of injections	11
Injection volume	3.7 μ L (3.68 μ L) 1. Injection: 1 μ L (0.95 μ L)
Injection interval	150 sec
Stirrer speed	350
Temperature	25°C
Auto Equilibrate	On
Expected Heats	Medium
Timeout	1800 sec
Initial Baseline	200 sec
Syringe concentration (β -CD-2)	10.007 mM
Cell concentration (Propafenone)	1.161 mM

Release

Herstellung der Lösung:

Es werden 0,02 g Propafenon Hydrochlorid in einem Erlenmeyerkolben eingewogen. Zum Auflösen werden 20 mL von der 10 mM β -Cyclodextrin Lösung verwendet, die für die Blank Messung genutzt wurde. Die Lösung wird für 15 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Da Propafenon schlecht wasserlöslich ist, wird die Lösung für 24 Stunden auf einer Magnetrührplatte bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird anschließend in ein 50 mL CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen mit einem 0,45 μ m Filter filtriert.

Die Probenzelle wird mit 300 μ L entgastem deionisiertem Wasser befüllt. Die Spritze wird mit 50 μ L entgaster β -CD/Propafenon Lösung befüllt.

Tab. 8 Einstellungen für das Release-Experiment - Propafenon

Number of injections	11
Injection volume	3.7 μ L (3.68 μ L) 1. Injection: 1 μ L (0.95 μ L)
Injection interval	150 sec
Stirrer speed	350
Temperature	25°C
Auto Equilibrate	On
Expected Heats	Medium
Timeout	1800 sec
Initial Baseline	200 sec
Syringe concentration (β -CD-2 + Propafenone)	10.007 mM 2.726 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

- Experimente mit einer 15 mM β -Cyclodextrin Lösung bei 25°C:

Blank

Herstellung der β -Cyclodextrin-Lösung:

Die Propafenon Experimente wurden ebenso mit einer 15 mM β -Cyclodextrin Lösung durchgeführt. Verwendet wurde Kleptose/Beta Cyclodextrine Ref. 504190 – Roquette.

- für die Herstellung von 40 mL einer 15 mM Lösung (0,0006 mol) sind 0,681 g β -CD notwendig

Die Einstellungen für das ITC-Run wurden vom vorherigen Experiment mit 10 mM übernommen. Es wurde ebenso bei 25 °C gemessen.

Die Konzentrationen dieser Messung sind folgende:

Syringe concentration (β -CD-2)	15.115 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

Titration:

Syringe concentration (β -CD-2)	15.115 mM
Cell concentration (Propafenon)	1.112 mM

Release

Syringe concentration (β -CD-1 / Propafenon)	15.115 mM / 2.692 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

- Experimente mit einer 15 mM β -Cyclodextrin Lösung bei 30°C und bei 37°C:

Um Unterschiede in der Komplexbildung zu beobachten wurden auch mit Propafenon Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt.

Konzentrationen der Lösungen bei 30°C mit 15 mM β -CD:

Titration:

Syringe concentration (β -CD-2):	15.033 mM
Cell concentration (Propafenon):	1.058 mM

Release:

Syringe concentration (β -CD-2 / Propafenon)	15.033 mM / 3.050 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

Konzentrationen der Lösungen bei 37°C mit 15 mM β -CD:

Titration:

Syringe concentration (β -CD-2)	15.144 mM
Cell concentration (Propafenon)	1.109 mM

Release:

Syringe concentration (β -CD-2 / Propafenon)	15.144 mM / 2.739 mM
Cell concentration (water)	0.001 mM

3.3.3. NanoAnalyze

Für das Fitting der Daten wurde die Software NanoAnalyze verwendet. Die Flächen aller Peaks werden dabei integriert.

Für das Fitting werden in dem Programm die rohen Thermogramme aufgerufen. Zuerst überprüft man ob alle Peaks deutlich sind und legt fest welche Flächen genau integriert werden sollen. Man erstellt dabei auch eine neue baseline.

Die Konzentrationen der Lösungen müssen genau angegeben werden. Der Blank wird über dieses Programm von den Titration- und Release-Experimenten abgezogen.

Für das Fitting vom Blank wurde das Modell „Blank (constant)“ gewählt. Für die Titration-Experimente wurde das Modell „Independent“ gewählt und für das Fitting der Release-Experimente das Modell „Dimer Dissociation“.

Man erhält schließlich die Isotherme mit allen thermodynamischen Parametern, wie Enthalpie ΔH , Entropie ΔS , die Bindungskonstante K_d und die Stöchiometrie n . [30]

4. Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Reaktionen zwischen β -Cyclodextrin und den Arzneistoffen Verapamil und Propafenon zu beobachten. Es wurden unterschiedliche Experimente mit dem nITC durchgeführt. Mit dieser Methode kann man die Wärme beziehungsweise die Energie, die bei der Reaktion entsteht oder benötigt wird, messen. Wie bereits bekannt ist, bilden Cyclodextrine mit unterschiedlichen Molekülen Komplexe, was zu einer verbesserten Löslichkeit dieser Substanzen führt. Um festzustellen wie die Reaktion zwischen dem β -Cyclodextrin und den Arzneistoffen abläuft wurden zwei Arten an Experimenten durchgeführt. Einerseits wurden Titration-Experimente durchgeführt, um die Komplexbildung zu untersuchen. Andererseits wurden Release-Experimente durchgeführt, um zu beobachten, ob es zu einer Dissoziation des Komplexes kommt. Dabei wurden die thermodynamischen Parameter Enthalpie ΔH , Entropie ΔS , die Bindungskonstante K_d und die Reaktionsstöchiometrie n gemessen. Dadurch kann man ableiten, ob eine Reaktion entropie- oder enthalpiegetrieben ist und welche Wechselwirkungen während der Komplexbildung entstehen.

Die Experimente wurden bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Es wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der β -Cyclodextrin Lösung gearbeitet. Alle Experimente sowohl mit Propafenon, als auch mit Verapamil wurden bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt.

4.1. Ergebnisse der Verapamil Experimente

Die ersten Experimente wurden mit einer 10 mM β -Cyclodextrin Lösung durchgeführt. Die Konzentration des Verapamils betrug dabei 1 mM (0,858 mM) um ein Verhältnis von 1:10 zu erreichen. Das β -Cyclodextrin muss immer höher dosiert sein als das Gastmolekül. Das β -Cyclodextrin befindet sich immer in der Spritze, weil es zur Löslichkeitsverbesserung des Arzneistoffs führt und schrittweise dem Arzneistoff zugesetzt wird. Die Konzentration des β -Cyclodextrin darf nicht zu hoch sein, da es sonst zur Selbstaggregation kommt.

Die Temperatur betrug 25°C und es erfolgten 11 Injektionen.

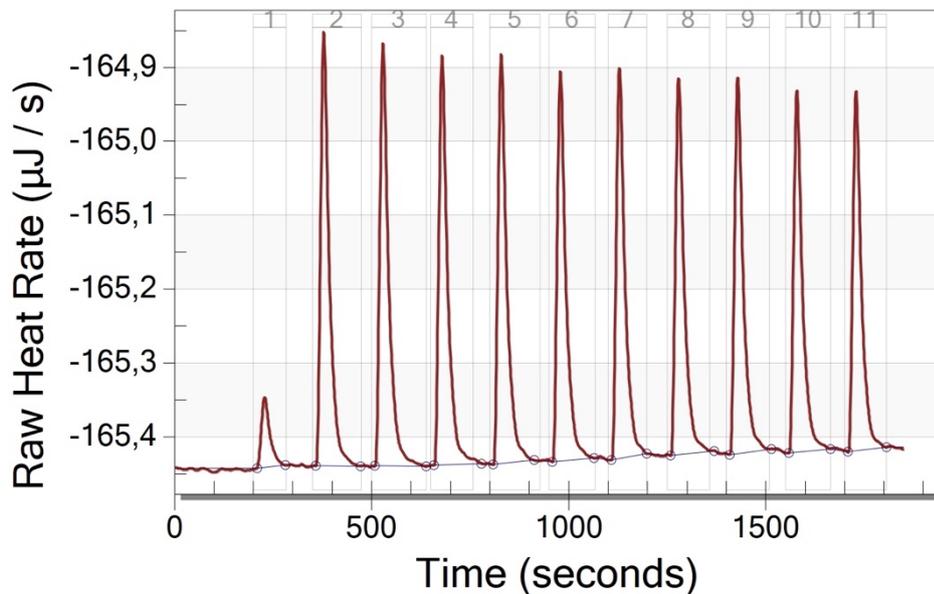


Abb. 16 Titration von 10 mM β -CD in Verapamil 25°C

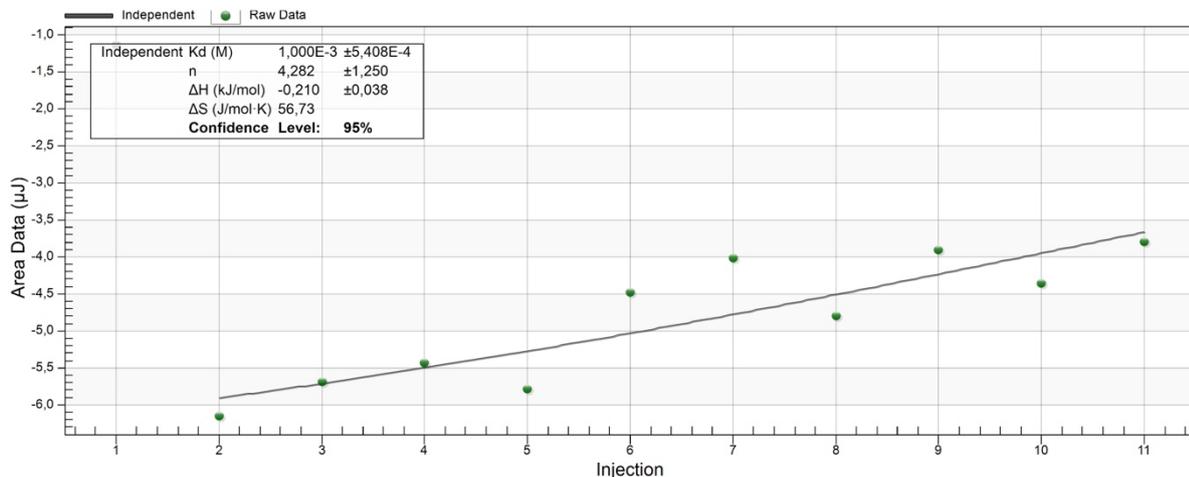


Abb. 17 Titration von 10 mM β -CD in Verapamil 25°C

Das Thermogramm zeigt, dass die Reaktion exotherm ist. Mit dem Programm ITC-Run wurde eingestellt, dass Peaks, die nach oben ausschlagen, exotherme Reaktionen darstellen. Wenn sie nach unten ausschlagen, ist die Reaktion endotherm. Das Thermogramm zeigt ein typisches Titration-Experiment. Die Injektion von β -Cyclodextrin in die Verapamil Lösung führt zur Komplexbildung und das wiederum zu einer Freisetzung von Wärme. Da die Konzentration von freien Verapamil Molekülen in der Probenzelle sinkt, sinkt auch die freigesetzte Wärmemenge und es bilden sich weniger Komplexe, somit werden die Peaks immer kleiner.

Das rohe Thermogramm wurde mit dem Programm NanoAnalyze ausgewertet. Für das Fitting wurde das Modell „Independent“ verwendet. ΔH hat einen negativen Wert von $-0,210$ kJ/mol und zeigt ebenso, dass die Reaktion exotherm ist. Exotherme Reaktionen führen zu einer Enthalpieabnahme ($\Delta H < 0$) und endotherme Reaktionen zu einer Enthalpiezunahme ($\Delta H > 0$).

Das Release-Experiment wurde ebenso bei 25°C durchgeführt. Die Spritze ist mit 10 mM β -Cyclodextrin Lösung und Verapamil befüllt.

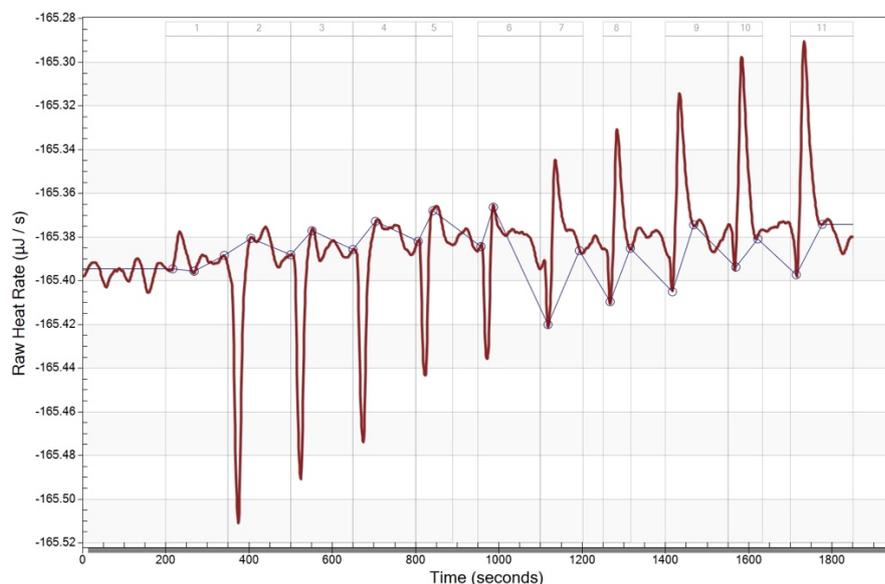


Abb. 18 Titration von 10 mM β -CD und Verapamil in Wasser 25°C

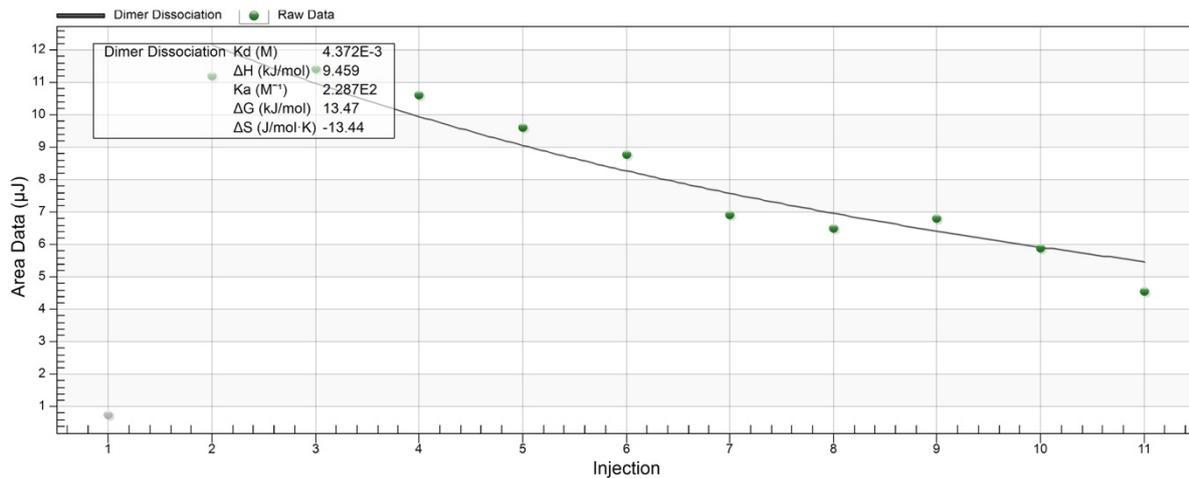


Abb. 19 Titration von 10 mM β -CD und Verapamil in Wasser 25°C

Beim Release-Experiment bildet sich der Komplex bereits in der Spritze und wird in reines Wasser titriert. Auf diesem Thermogramm ist die Reaktion zuerst endotherm und dann exotherm. ΔH ist jedoch positiv und hat einen Wert von 9,459 kJ/mol was bedeutet, dass die Reaktion insgesamt endotherm ist.

Die Konzentration des β -Cyclodextrins wurde auf 15 mM erhöht. Um festzustellen, ob eine Änderung der Konzentration relevant ist, wurden alle weiteren Parameter und Einstellungen von den vorherigen Experimenten übernommen.

Das Titration-Experiment ergab ähnliche Ergebnisse wie das Experiment mit der 10 mM β -Cyclodextrin Lösung. Die Reaktion ist exotherm und ΔH hat einen Wert von -0,101 kJ/mol.

Das Release Experiment weist jedoch einen deutlichen Unterschied auf.

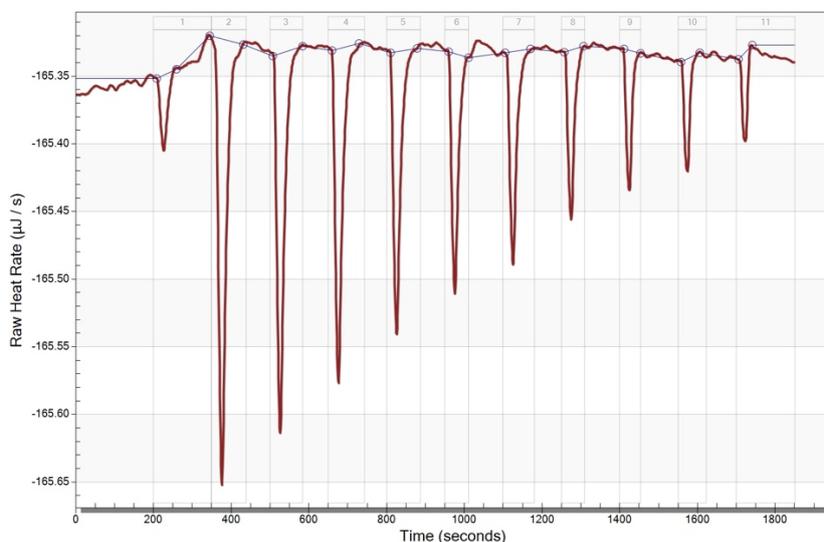


Abb. 20 Titration von 15 mM β -CD und Verapamil in Wasser 25°C

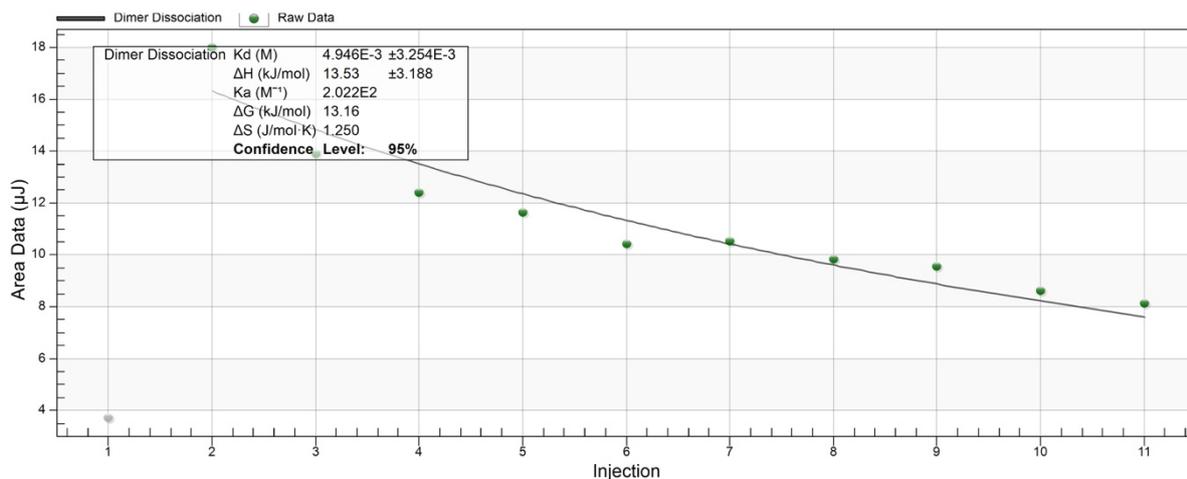


Abb. 21 Titration von 15 mM β -CD und Verapamil in Wasser 25°C

Die Injektion von der β -Cyclodextrin und Verapamil Mischung in reines Wasser führt zu einer Verdünnung dieser Lösung in der Probenzelle. Der Komplex, der sich in der Lösung gebildet hat, dissoziiert. Die Reaktion ist endotherm, d.h. Energie muss für diese Reaktion zugeführt werden. Release Experimente stellen immer die Dissoziation von Komplexen dar. Da die Konzentration der Komponenten in der Probenzelle immer mehr zunimmt, dissoziieren immer weniger Komplexe und die Peaks im Thermogramm werden kleiner.

Das Release-Experiment funktioniert mit einer 15 mM Lösung besser als mit einer 10 mM Lösung. Die Peaks sind alle endotherm und gehen alle von der Baseline aus. Der Grund dafür ist möglicherweise, dass sich die Komplexe besser mit einer höher dosierten β -Cyclodextrin Lösung bilden. Die 10 mM Lösung ist zu niedrig dosiert, sodass sich keine oder nur wenige Komplexe bilden und deswegen auch nicht dissoziieren. ΔH hat einen Wert von 13,53 kJ/mol.

Die Temperatur wurde ebenso verändert, um den Einfluss der Temperatur auf die Reaktionen bzw. Komplexbildung zu beobachten. Nachdem sich herausgestellt hat, dass sowohl das Titration-Experiment, als auch das Release-Experiment mit einer Konzentration von 15 mM zu besseren Ergebnissen führen, wurde mit dieser Konzentration weitergearbeitet. Bei den folgenden Experimenten wurde nur die Temperatur verändert, alle anderen Parameter blieben unverändert.

Sowohl das Titration-Experiment, als auch das Release-Experiment wurden bei einer Temperatur von 30°C ausgeführt. Die Lösungen wurden bereits bei 30°C entgast um sie optimal für das Experiment vorzubereiten.

Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den Experimenten bei 25°C. Das Titration-Experiment ist exotherm und ΔH beträgt -0,221 kJ/mol.

Das Release Experiment ist endotherm und ΔH weist einen Wert von 10,90 kJ/mol auf.

Die Experimente wurden ebenso bei 37°C durchgeführt. Man wollte untersuchen wie die Reaktionen bei Körpertemperatur ablaufen, was besonders interessant ist. Die Lösungen wurden auch hier bereits bei 37°C entgast. Alle weiteren Einstellungen wurden übernommen.

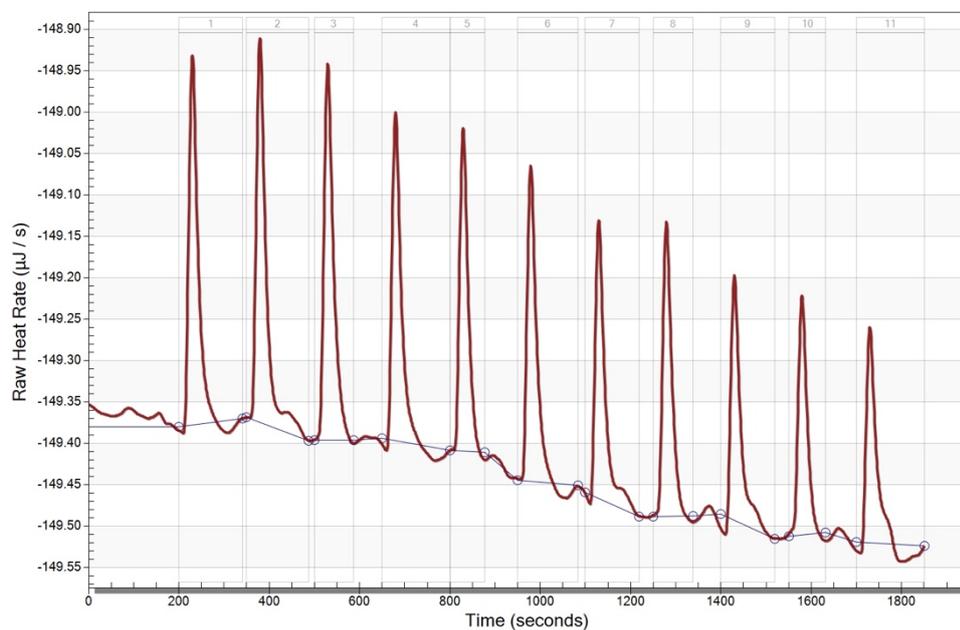


Abb. 22 Titration von 15 mM β -CD in Verapamil 37°C

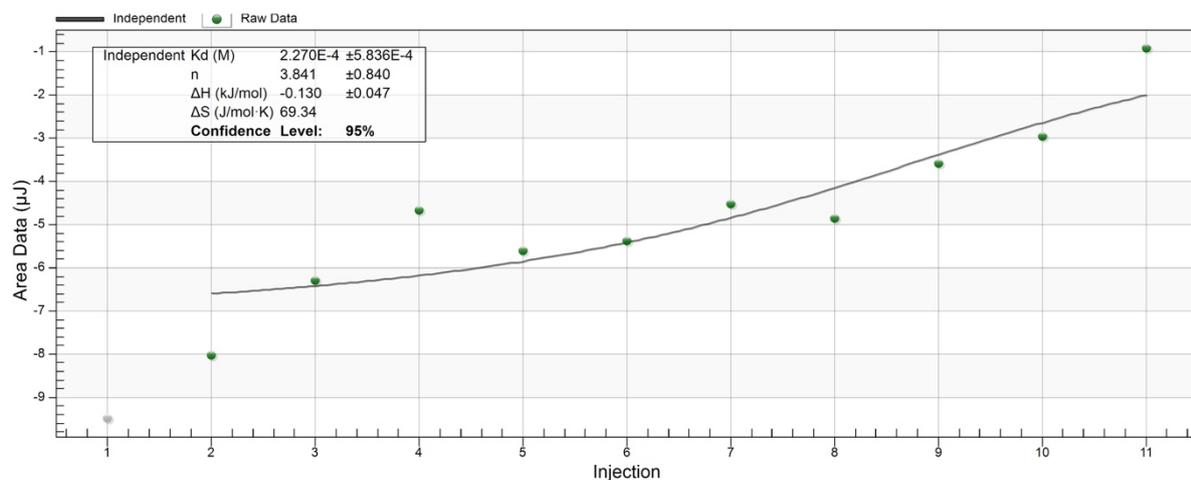


Abb. 23 Titration von 15 mM β -CD in Verapamil 37°C

Das Titration-Experiment und das Release-Experiment weisen keine auffallenden Unterschiede auf im Vergleich zu den anderen Experimenten. Das Titration-Experiment ist exotherm und ΔH beträgt $-0,13 \text{ kJ/mol}$. Die Baseline ist in diesem Fall schief. Ursachen dafür können unterschiedlichen Ursprungs sein wie Verunreinigungen oder Einflüsse von außen.

Das folgende Release-Experiment ist endotherm und ΔH beträgt $18,56 \text{ kJ/mol}$.

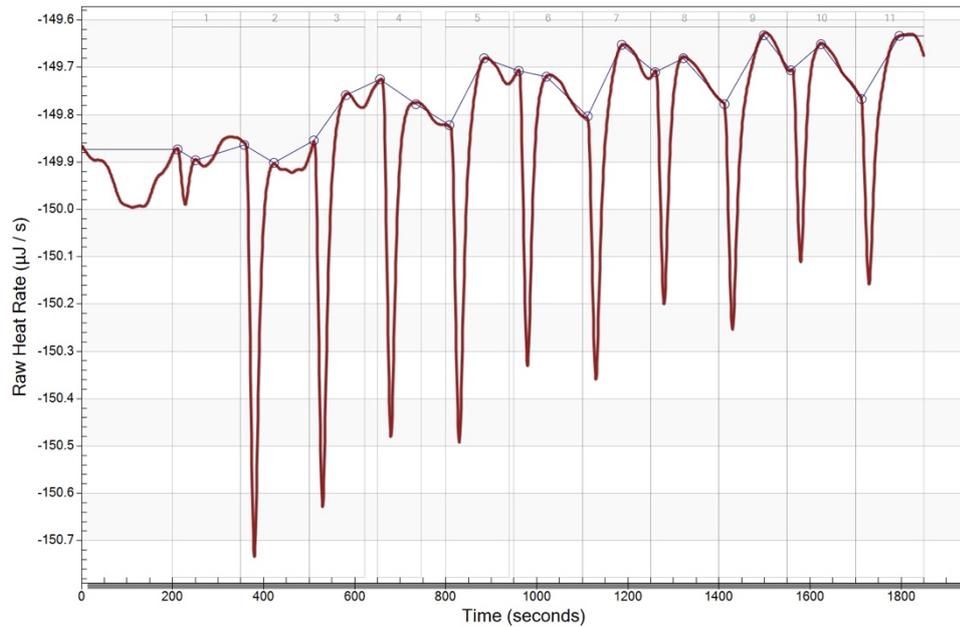


Abb. 24 Titration von 15 mM β -CD und Verapamil in Wasser 37°C

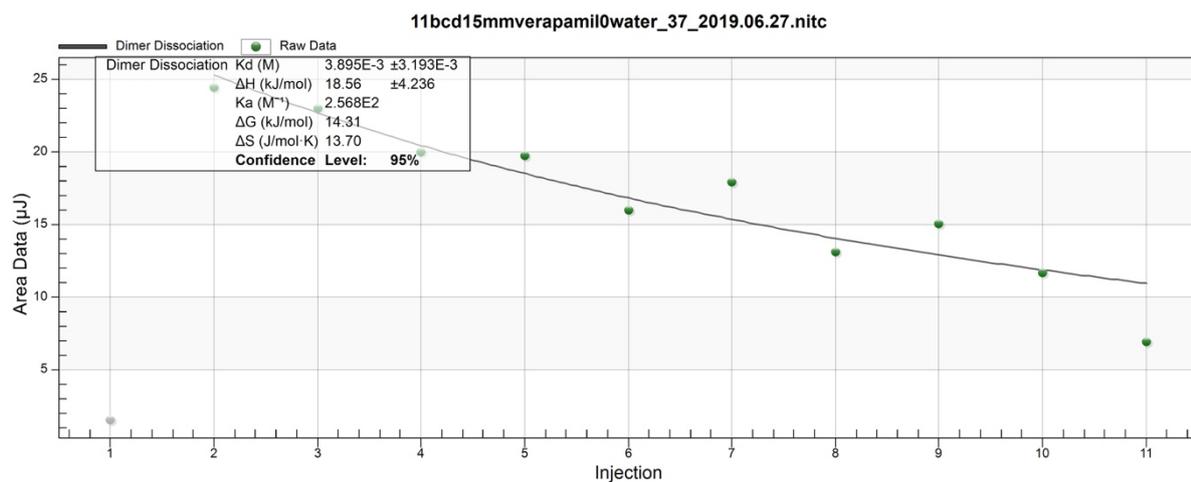


Abb. 25 Titration von 15 mM β -CD und Verapamil in Wasser 37°C

4.2. Ergebnisse der Propafenon Experimente

Analog zu den Experimenten mit Verapamil wurden auch die Propafenon-Experimente zuerst mit einer 10 mM β -Cyclodextrin Lösung durchgeführt. Das Verhältnis der Lösungen war 1:10, die Konzentration der Propafenon-Lösung betrug somit 1 mM (1,161 mM).

Das β -Cyclodextrin ist in der Spritze und wird in die Propafenon-Lösung titriert. Es erfolgten 11 Injektionen bei 25 °C.

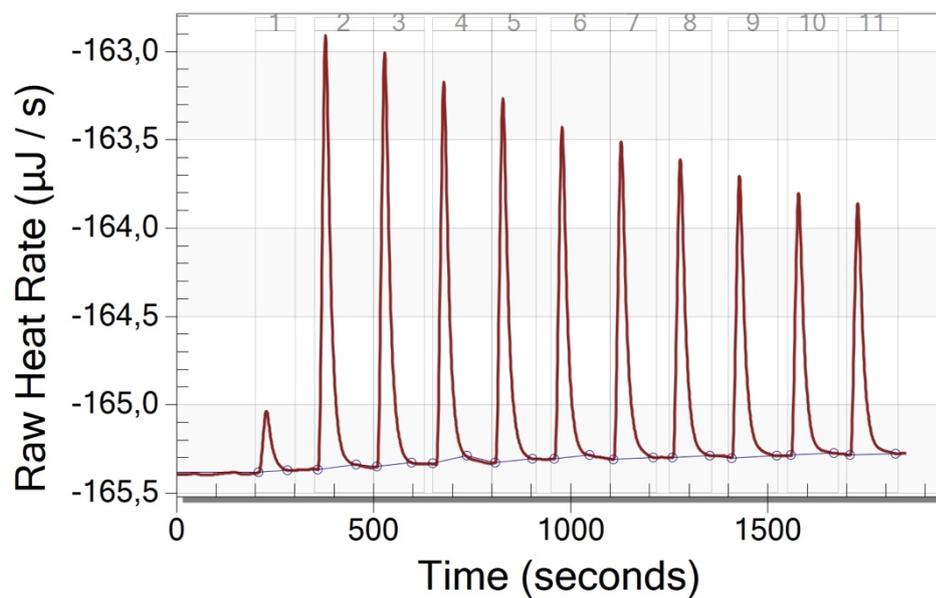


Abb. 26 Titration von 10 mM β -CD in Propafenon 25°C

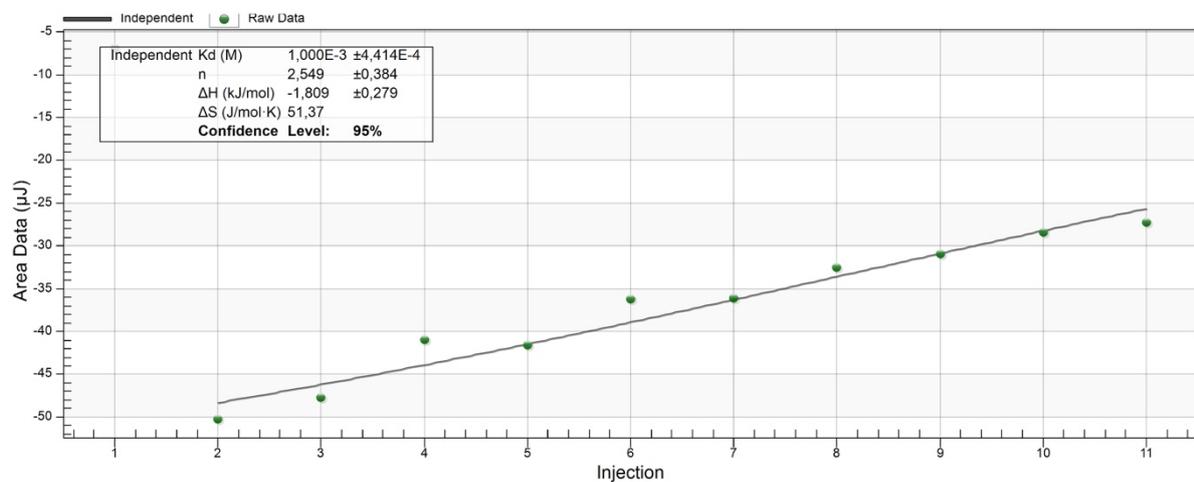


Abb. 27 Titration von 10 mM β -CD in Propafenon 25°C

Die Titration von 10 mM β -Cyclodextrin in Propafenon führte zu einer exothermen Reaktion. ΔH beträgt dabei -1,809 kJ/mol. Die Komplexbildung ist somit wie bei Verapamil exotherm und es wird dabei Wärme freigesetzt. Da die Konzentration von freien Propafenon Molekülen in der Probenzelle sinkt, sinkt auch die freigesetzte Wärmemenge und es bilden sich weniger Komplexe. Daher werden die Peaks immer kleiner, was hier deutlicher zu sehen ist, als beim gleichen Versuch mit Verapamil.

Das Release-Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, 11 Injektionen bei 25°C. 10 mM β -Cyclodextrin in Kombination mit Propafenon wurde in reines Wasser titriert.

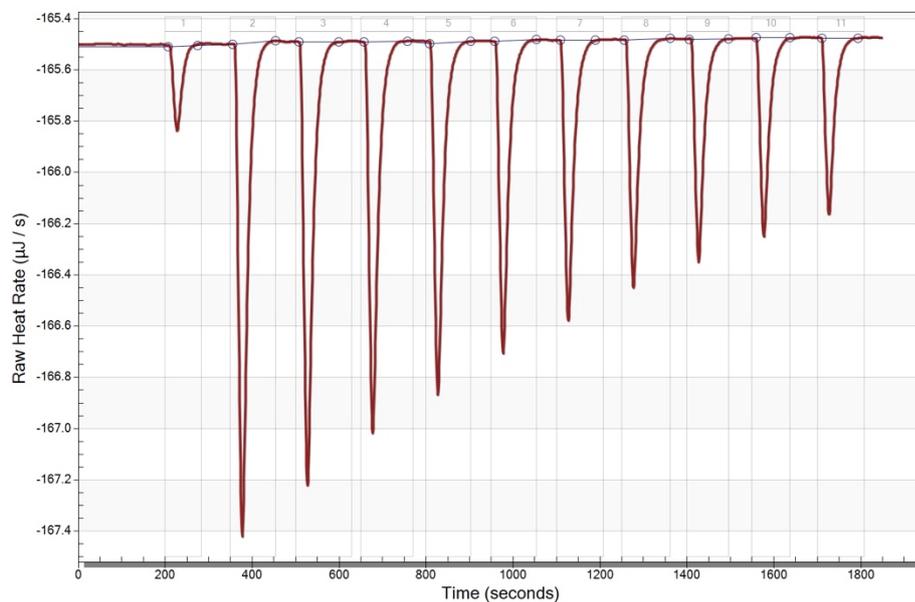


Abb. 28 Titration von 10 mM β -CD und Propafenon in Wasser 25°C

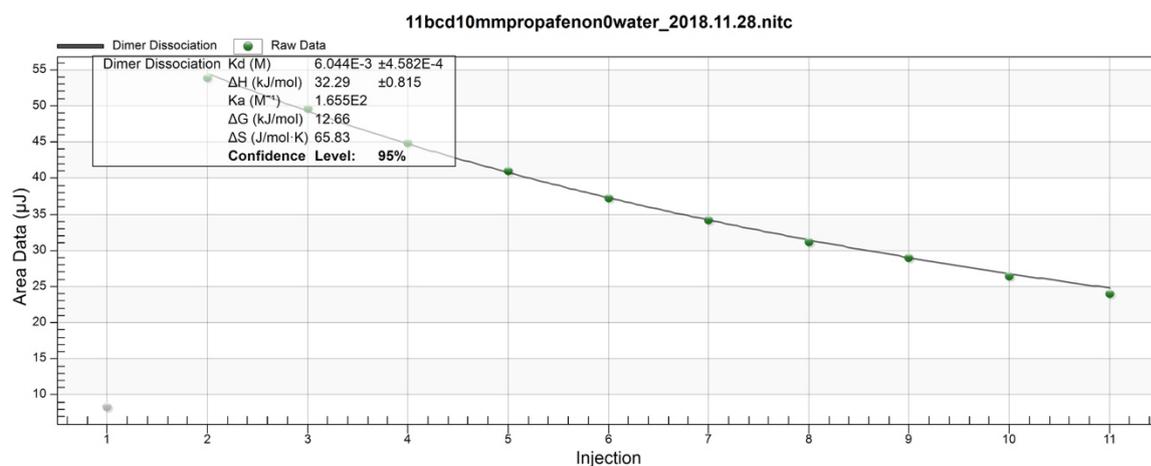


Abb. 29 Titration von 10 mM β -CD und Propafenon in Wasser 25°C

Im Gegensatz zum gleichen Experiment mit Verapamil ist das Thermogramm von Propafenon eindeutig endotherm. Das Thermogramm ist nicht verrauscht, die Baseline ist gerade und die Peaks entspringen alle der Baseline. ΔH hat einen positiven Wert von 32,29 kJ/mol.

Die Konzentration der β -Cyclodextrin Lösung wurde auf 15 mM erhöht um zu überprüfen, ob sich eine Änderung der Konzentration auf die Reaktionen auswirkt. Das Titration-Experiment war wie erwartet exotherm. ΔH beträgt -1,613 kJ/mol und weist keinen großen Unterschied auf im Vergleich zu dem Experiment mit der 10 mM β -Cyclodextrin Lösung.

Das Release-Experiment ist endotherm und mit einem positiven ΔH Wert von 30,96 kJ/mol. Im Gegensatz zu Verapamil hat die Änderung der Konzentration keinen großen Einfluss auf die Reaktionen.

Nachdem die Veränderung der Konzentration ermittelt worden ist, wurden die Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Die Konzentration der β -Cyclodextrin Lösung von 15 mM wurde beibehalten.

Die folgenden Experimente wurden bei 30°C durchgeführt.

Auch hier ist das Titration-Experiment exotherm und ΔH beträgt -1,404 kJ/mol.

Das Release-Experiment ist endotherm und ΔH beträgt 26,67 kJ/mol und ist somit geringer, als beim Versuch bei 25°C.

Die Temperatur wurde weiter erhöht auf 37°C. Dieser Temperaturbereich ist besonders interessant, weil man die Reaktion bei Körpertemperatur beobachten kann.

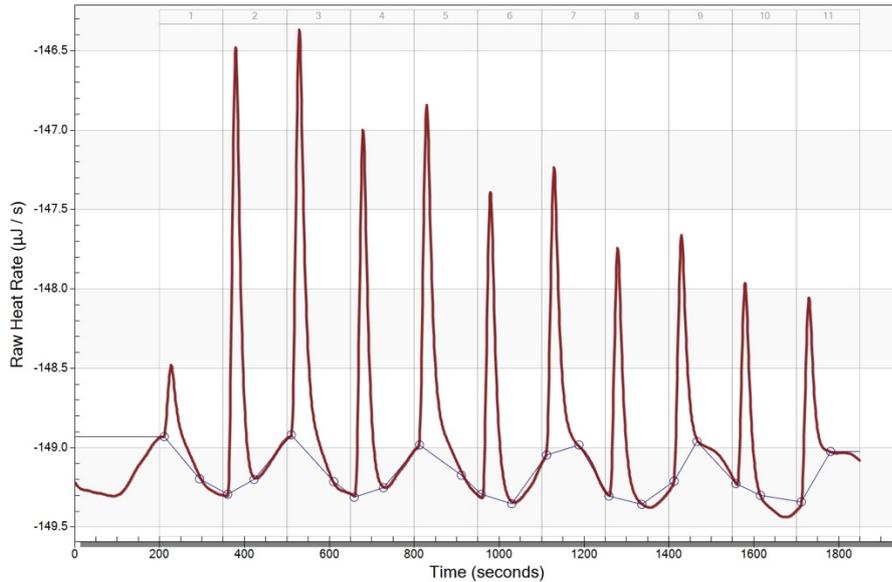


Abb. 30 Titration von 10 mM β -CD und Propafenon in Wasser 25°C

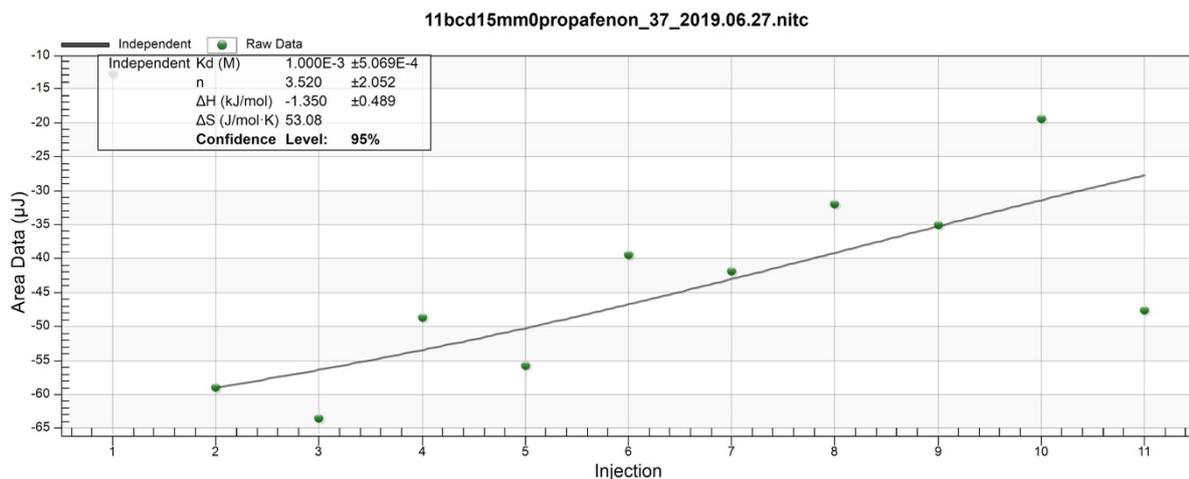


Abb. 31 Titration von 10 mM β -CD und Propafenon in Wasser 25°C

Das Titration-Experiment ist exotherm und ΔH beträgt -1,35 kJ/mol und ist somit fast genau gleich wie beim Experiment mit 30°C. Der Temperaturunterschied beeinflusst somit nicht die Komplexbildung. Die Baseline ist in diesem Thermogramm nicht gerade. Die Equillibrationszeit ist jedoch auch überdurchschnittlich hoch.

Üblicherweise beträgt die Equillibrationszeit 700-900 sec in diesem Fall sind es 1800 sec. Wenn die durchschnittliche Equillibrationszeit überschritten wird, ist die Baseline meistens ungerade.

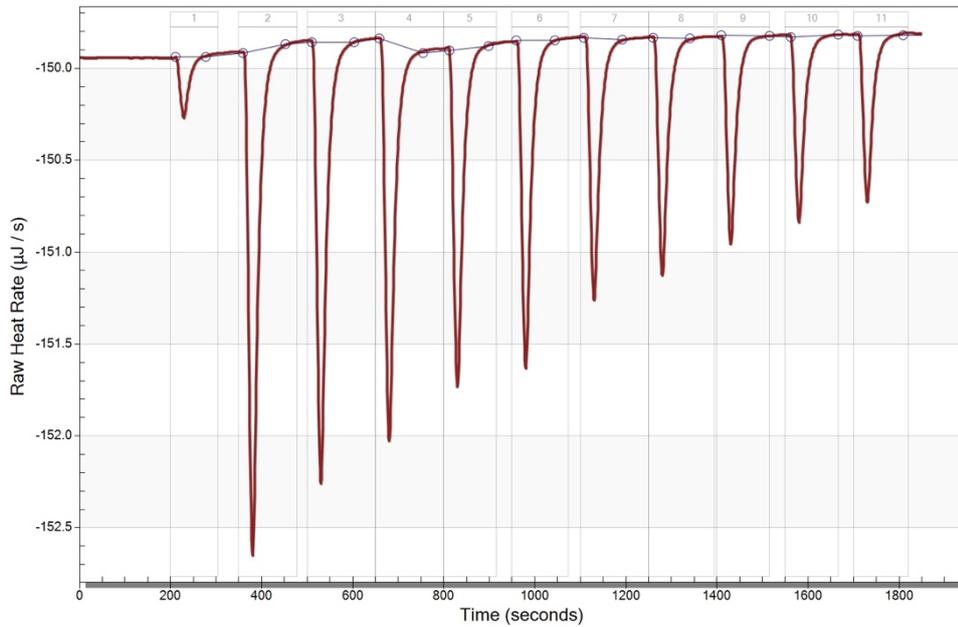


Abb. 32 Titration von 10 mM β -CD und Propafenon in Wasser 25°C

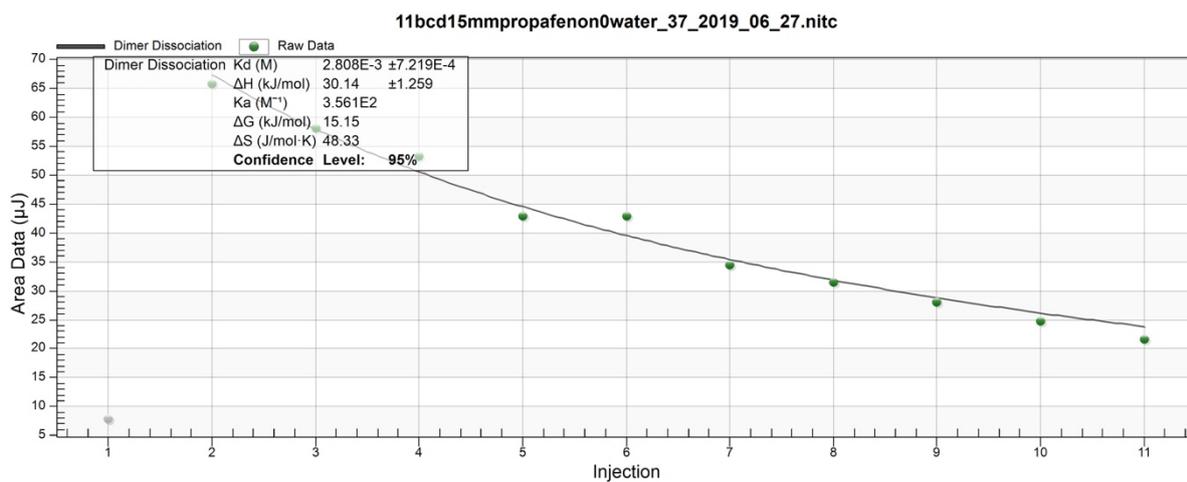


Abb. 33 Titration von 10 mM β -CD und Propafenon in Wasser 25°C

Beim Release-Experiment beträgt ΔH 30,14 kJ/mol und das Experiment ist endotherm.

4.3. Vergleich der Ergebnisse von Verapamil und Propafenon

Tab. 9 Ergebnisse Verapamil

Verapamil mit 10 mM β -CD

Temperatur	25°C	
	Titration	Release
ΔH (kJ/mol)	-0,21	9,459
ΔS (J/mol * K)	56,73	-13,44
Kd (M)	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$4,372 \cdot 10^{-3}$

Tab. 10 Ergebnisse Verapamil

Verapamil mit 15 mM β -CD

Temperatur	25°C		30°C		37°C	
	Titration	Release	Titration	Release	Titration	Release
ΔH (kJ/mol)	-0,101	13,53	-0,221	10,9	-0,13	18,56
ΔS (J/mol * K)	172	1,25	56,71	-9,489	69,34	13,7
Kd (M)	$1,000 \cdot 10^{-9}$	$4,946 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$4,228 \cdot 10^{-3}$	$2,270 \cdot 10^{-4}$	$3,895 \cdot 10^{-3}$

An den Ergebnissen ist deutlich zu sehen, dass alle Titration-Experimente exotherm sind auf Grund der negativen ΔH -Werte. Das bedeutet, dass bei der Komplexbildung Wärme freigesetzt wird. Bei den Titration-Experimenten variiert die Bindungskonstante Kd zwischen den Versuchen, die bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt worden sind. Sie ist am höchsten bei einer Temperatur von 30°C. Der Temperaturunterschied hat somit einen Einfluss auf die Komplexbildung.

Die Release-Experimente haben alle positive ΔH -Werte und sind somit alle endotherm. Bei der Dissoziation der Komplexe kommt es zu einer Wärmeaufnahme. Die Bindungskonstante K_d weist keine großen Unterschiede auf bei den unterschiedlichen Temperaturen.

Die Experimente funktionieren mit einer 15 mM β -Cyclodextrin Lösung besser, als mit einer 10 mM Lösung. Der Grund dafür könnte sein, dass die 10 mM Lösung zu niedrig dosiert ist und es nur zu einer schwachen Komplexbildung kommt.

Tab. 11 Ergebnisse Propafenon

Propafenon mit 10 mM β -CD

Temperatur	25°C	
	Titration	Release
ΔH (kJ/mol)	-1,809	32,29
ΔS (J/mol * K)	51,37	65,83
K_d (M)	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$6,044 \cdot 10^{-3}$

Tab. 12 Ergebnisse Propafenon

Propafenon mit 15 mM β -CD

Temperatur	25°C		30°C		37°C	
	Titration	Release	Titration	Release	Titration	Release
ΔH (kJ/mol)	-1,613	30,96	-1,404	26,67	-1,35	30,14
ΔS (J/mol * K)	52,02	55,32	52,8	38,93	53,08	48,33
K_d (M)	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$2,917 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$2,737 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$2,808 \cdot 10^{-3}$

Die Versuche mit Propafenon zeigen ebenso, dass die Titration-Experimente alle exotherm sind. Die ΔH Werte sind jedoch größer im Vergleich zu Verapamil, es entsteht somit mehr Wärme während der Reaktion mit Propafenon als mit Verapamil. Die ΔH Werte sind auch bei den Release-Experimenten höher im Vergleich zu den Versuchen mit Verapamil, d.h. dass, bei der Dissoziation der Komplexe mehr Wärme aufgenommen wird.

Die Temperaturänderung wirkt sich bei den Propafenon Experimenten nicht auf die Bindungskonstante aus. D.h. dass die Temperaturänderung keinen Einfluss auf die On- oder Off Kinetik hat. K_d hängt von k_{on} und k_{off} ab, wenn K_d unverändert bleibt, sind auch die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} konstant.

Im Gegensatz dazu wird die Bindungskonstante der Verapamil Experimente deutlich durch eine Änderung der Temperatur beeinflusst. Die Temperaturänderung wirkt sich somit auf die On-und Off-Kinetik aus. Damit ein Komplex entstehen kann, müssen Wassermoleküle aus dem hydrophoben Hohlraum verdrängt werden. Die Energiebarriere, die dabei überwunden werden muss, ist die Desolvatisierungsenergie. K_d ist bei einer Temperatur von 30°C am höchsten. Das bedeutet, dass k_{on} hier am größten ist und die Desolvatisierungsenergie am geringsten. Je kleiner die Desolvatisierungsenergie ist, desto größer ist k_{on} und desto schneller bildet sich der Komplex. K_d ist bei 25°C am geringsten. Bei dieser Temperatur ist die Desolvatisierungsenergie besonders hoch.

Wie bereits in einer Studie festgestellt wurde, bildet Propafenon mit β -Cyclodextrin ausschließlich 1:1 Komplexe. Der Phenylring wird gemeinsam mit der Carbonylgruppe in den Hohlraum eingeschlossen, das ganze Molekül ist zu groß für den hydrophoben Hohlraum. Außerdem ist diese Orientierung energetisch am günstigsten. Die Methoden, die in dieser Studie verwendet wurden waren Elektronenmikroskopie (SEM), Differential scanning calorimetry (DSC) und $^1\text{H-NMR}$.

[16]

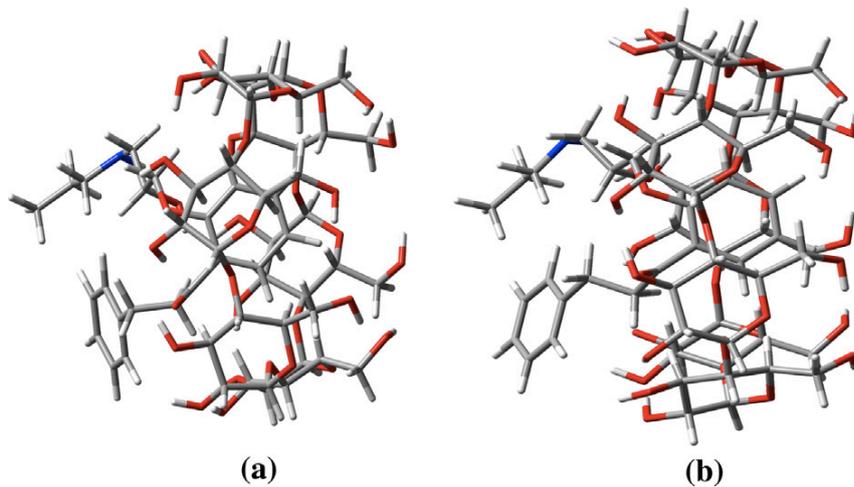


Abb. 34 Propafenon mit α -Cyclodextrin (a) und mit β -Cyclodextrin (b) [16]

Der Prozess der Komplexbildung ist exotherm und läuft spontan ab, was sich in den thermodynamischen Parameter Enthalpie ΔH , Entropie ΔS und Gibbs-Energie ΔG widerspiegelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen somit zu gleichen Resultaten wie die Ergebnisse der Studie und beweisen, dass die Komplexbildung exotherm ist. Wasserstoffbrücken stabilisieren den Komplex und entstehen zwischen den H-Atomen der sekundären Hydroxylgruppe, der Methylengruppe der Cyclodextrine und den O-Atomen vom Propafenon. Insgesamt sind es drei Wasserstoffbrückenbindungen, wobei auch Van der Waals-Kräfte zur Stabilität des Komplexes beitragen. Der hydrophobe Effekt trägt auch zur Komplexbildung bei, indem Wassermoleküle aus der hydrophoben Tasche der Cyclodextrine verdrängt werden. [16]

Außerdem hat sich herausgestellt, dass sich Propafenon-CD Komplexe am besten bei einer Temperatur von 303 Kelvin bzw. 30°C bilden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen nicht zum gleichen Resultat wie in der genannten Studie. Die Bindungskonstante K_d variierte nicht zwischen den unterschiedlichen Temperaturbereichen und weist keine signifikanten Unterschiede auf. Interessanterweise ist die Bindungskonstante K_d bei den Verapamil-Experimenten bei einer Temperatur von 30°C am höchsten. D.h. der Komplex bildet sich am besten bei 30°C.

Als Vorlage für den Experimentaufbau und die Durchführung wurde eine Arbeit von David Landy und Eleonore Bertaut verwendet. Sowohl das Titration-Experiment als auch das Release-Experiment wurden übernommen. Titration- und Release Experimente werden miteinander kombiniert, weil man so genauer die

thermodynamischen Parameter bestimmen kann, insbesondere die Bindungskonstante K_d . Bei beiden Experimenten wird die Bindungskonstante zwischen dem Gastmolekül und dem β -Cyclodextrin ermittelt. Indem die Ergebnisse beider Experimente miteinander verglichen werden, kann man die Bindungskonstante genauer bestimmen. Die Kombination des Titration-Release Experiments wurde somit als der Goldstandard bestimmt. [27]

In der Studie wurde Ibuprofen in Kombination mit β -Cyclodextrin gemessen. Es hat sich herausgestellt, dass die Komplexbildung exotherm ist d.h. es entsteht Wärme während der Reaktion. Die Komplexbildung zwischen Ibuprofen und β -Cyclodextrin verhält sich somit genauso wie die Reaktion zwischen β -Cyclodextrin und Verapamil oder Propafenon. Man kann daraus schließen, dass die Komplexbildung zwischen β -Cyclodextrin und seinen Gastmolekülen generell exotherm ist.

Die Release-Experimente mit Ibuprofen ergaben eine endotherme Reaktion. Auch hier führen die Experimente mit Ibuprofen zu gleichen Ergebnissen wie Verapamil und Propafenon. Die Dissoziation der β -Cyclodextrin-Komplexe ist daher immer endotherm.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Komplexbildung zwischen Propafenon und Verapamil mit Cyclodextrinen untersucht. Mittels nITC wurden die thermodynamischen Parameter bestimmt.

Verapamil und Propafenon sind P-Glykoprotein Inhibitoren. Das P-Glykoprotein ist ein Transmembrantransporter, der physiologisch für das Ausschleusen von toxischen Substanzen verantwortlich ist. Der Transporter pumpt dabei auch Cytostatika aus Zellen was zur sogenannten Multi-Drug-Resistenz führt. Dadurch werden Cytostatika unwirksam und die Behandlung vieler Krebsarten wie Brustkrebs oder Lebezellkarzinom werden dadurch problematisch. P-Glykoprotein Inhibitoren, wie Verapamil und Propafenon sind in der Lage das P-Glykoprotein zu blockieren sodass Cytostatika nicht mehr aus Tumorzellen ausgeschleust werden.

Cyclodextrine sind ringförmige Oligosaccharide, die mit unterschiedlichen Molekülen Komplexe bilden können. Sie fördern dadurch die Löslichkeit des Moleküls.

Die Komplexbildung zwischen den Arzneistoffen und dem β -Cyclodextrin wurde mittels nITC untersucht. ITC steht für isotherme Titrationskalorimetrie. Mit dieser Methode kann man thermodynamische Parameter wie Enthalpie ΔH und Entropie ΔS ermitteln und man kann die Bindungskonstante K_d bestimmen. Man kann daraus schließen ob eine Reaktion exotherm oder endotherm und ob sie entropie- oder enthalpiegetrieben ist.

Es wurden erste Pilotexperimente durchgeführt. Als Modellsystem wurden Verapamil mit β -Cyclodextrin verwendet und Propafenon mit β -Cyclodextrin. Die Experimente wurden bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Es wurde bei 25°C, 30°C und 37°C gemessen. Mit Titration-Experimenten wurde die Komplexbildung ermittelt. Dabei wurde das β -Cyclodextrin in die Lösung des Arzneistoffs titriert. Es hat sich herausgestellt, dass die Komplexbildung zwischen dem β -Cyclodextrin und beiden Arzneistoffen exotherm ist. Während der Reaktion wird Wärme freigesetzt.

Mit Release-Experimenten wurde die Dissoziation untersucht. Dabei wurden das β -Cyclodextrin gemeinsam mit dem Arzneistoff als Komplex in reines Wasser titriert. Die Dissoziation der Komplexe ist endotherm. Für diese Reaktion muss Energie zugeführt werden. Die Temperaturänderungen hatten keinen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion.

6. Abstract

The aim of this study was to determine cyclodextrin inclusion compounds with Verapamil and Propafenone by isothermal titration calorimetry (ITC).

Verapamil and Propafenone are P-glycoprotein inhibitors. P-Glycoprotein is a transmembrane protein of the cell membrane and it pumps toxic substances out of the cells. It also pumps cytostatic drugs out of tumor cells. As a result, the cells become resistant to cytostatic drugs and multi drug resistance occurs. P-glycoprotein inhibitors such as verapamil and propafenone are able to inhibit the P-glycoprotein. Cyclodextrins are sugar molecules bound together in a ring. They are able to form complexes with hydrophobic molecules. The complex formation between the drugs and the β -cyclodextrin was investigated by isothermal titration calorimetry. It is possible to determine thermodynamic parameters such as enthalpy ΔH and entropy ΔS and the binding constant K_d with this method. It can be concluded whether a reaction is exothermic or endothermic and whether it is entropy or enthalpy driven. In this study first pilot experiments were carried out. Verapamil with β -cyclodextrin and propafenone with β -cyclodextrin were used as a model system. The experiments were conducted at different temperatures. The temperature ranges were 25°C, 30°C and 37°C. Two different types of experiments were conducted. The first one was the titration experiment and the second one the release experiment. Complex formation was determined using titration experiments. The β -cyclodextrin was titrated into the solution of the drug. It turned out that the complex formation between the β -cyclodextrin and the drug is exothermic. The injection of β -cyclodextrin into Verapamil or Propafenone leads to release of heat.

The dissociation was investigated with release experiments. The β -cyclodextrin was titrated together with the drug as a complex into water. The dissociation of the complex is endothermic and results in heat consumption.

The change of temperature had no effect on the experiments.

7. Literaturverzeichnis

1. K. Aktories, U. Förstermann, F. B. Hofmann, K. Starke: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, 10. überarbeitete Auflage, Elsevier Urban&Fischer, 2009; 469-472
2. Singh, B.N., Ellrodt, G. & Peter, C.T. *Drugs* (1978) 15: 169
3. Duda-Seiman, C., et al., *Thermal behavior of verapamil in pure and in solid dosage forms*. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 2011. **105**(3): p. 851-858.
4. Meier, M., et al., *Interaction of verapamil with lipid membranes and P-glycoprotein: connecting thermodynamics and membrane structure with functional activity*. *Biophys J*, 2006. **91**(8): p. 2943-55.
5. Harron, D.W.G. & Brogden, R.N. *Drugs* (1987) 34: 617
6. H.P.T. Ammon, *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*, 9. Auflage, 2004, Walter de Gruyter
7. [https://de.wikipedia.org/wiki/Propafenon#/media/Datei:\(RS\)-Propafenon_Structural_Formula_V1.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Propafenon#/media/Datei:(RS)-Propafenon_Structural_Formula_V1.svg) (Internet); (zitiert am 13.10.2019)
8. Sharom, F.J., *Complex interplay between the P-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: its role in modulating protein function*. *Frontiers in oncology*, 2014. **4**: p. 41.
9. Aller, S.G., et al., *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*. *Science*, 2009. **323**(5922): p. 1718-1722.
10. Chang, G., *Multidrug resistance ABC transporters*. *FEBS letters*, 2003. **555**(1): p. 102-105.
11. Srivalli, K.M.R. and P. Lakshmi, *Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012. **48**(3): p. 353-367.
12. S. Klein, T. Zöller, *Molekulare Zuckertüten für Arzneistoffe*. *Pharmazeutische Zeitung*, 2008.
13. R. Voigt, A. Fahr, *Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 10. Auflage, 2006.
14. <https://www.indiamart.com/proddetail/beta-cyclodextrin-12387538873.html> (Internet); (zitiert am 24.10.2019)
15. M. Gröger, et al., *Reader mit Hintergrundinformationen zum Thema Cyclodextrine*. Dissertation, Science Forum der Universität Siegen - Didaktik der Chemie Universität Siegen, 2001.
16. Siva, S., J. Thulasidhasan, and N. Rajendiran, *Host-guest inclusion complex of propafenone hydrochloride with α - and β -cyclodextrins: Spectral and molecular modeling studies*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013. **115**: p. 559-567.
17. C. Czeslik, H. Seemann, R. Winter, *Basiswissen physikalische Chemie*, Vieweg Teubner Verlag, 4. aktualisierte Auflage, 2010
18. G. Ecker, *Biophysikalische pharmazeutische Chemie*, Universität Wien, 2013
19. <https://de.wikipedia.org/wiki/Wasserstoffbrückenbindung#/media/Datei:H-Bruecke-delta.svg>; (Internet), (zitiert am 20.11.2019)
20. <https://www.malvernpanalytical.com/de/products/technology/microcalorimetry/isothermal-titration-calorimetry>; (Internet); (zitiert am 22.11.2019)

21. Falconer, R.J., *Applications of isothermal titration calorimetry—the research and technical developments from 2011 to 2015*. Journal of Molecular Recognition, 2016. **29**(10): p. 504-515.
22. Atri, M.S., A.A. Saboury, and F. Ahmad, *Biological applications of isothermal titration calorimetry*. Physical Chemistry Research, 2015. **3**(4): p. 319-330.
23. Schuetz, D.A., et al., *Kinetics for Drug Discovery: an industry-driven effort to target drug residence time*. Drug Discovery Today, 2017. **22**(6): p. 896-911.
24. <https://www.k4dd.eu/about-k4dd/mission/>; (Internet); (zitiert am 6.1.2020)
25. Schuetz, D.A., et al., *Ligand desolvation steers on-rate and impacts drug residence time of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors*. Journal of medicinal chemistry, 2018. **61**(10): p. 4397-4411.
26. Englert, L., et al., *Displacement of disordered water molecules from hydrophobic pocket creates enthalpic signature: Binding of phosphoramidate to the S1'-pocket of thermolysin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2010. **1800**(11): p. 1192-1202.
27. Bertaut, E. and D. Landy, *Improving ITC studies of cyclodextrin inclusion compounds by global analysis of conventional and non-conventional experiments*. Beilstein journal of organic chemistry, 2014. **10**(1): p. 2630-2641.
28. TA Instruments - Waters LLC, Nano Isothermal Titration Calorimeter Getting Started Guide, 2015
29. <https://www.tainstruments.com/nano-itc/?lang=de>; (Internet), (zitiert am 4.12.2019)
30. Nano ITC Test Kit Instruction Manual