

**Isolierung, Identifizierung und  
Inhibition von Esterasen aus  
Ratten- und Hundeserum zur  
Stabilisierung von Serumproben  
*ex vivo* im Rahmen der  
präklinischen  
Arzneimittelentwicklung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Matthias Koitka**

Geboren in Schwedt/Oder

Januar 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. H.-H. Borchert

2. Gutachter: Prof. Dr. M. F. Melzig

Disputation am 31.03.2009

**INHALTS-  
UND  
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>12</b>
1.1 Bedeutung der Stabilität von <i>ex-vivo</i> -Serumproben in der Arzneimittelentwicklung .....	12
1.2 Frage- und Zielstellung dieser Arbeit.....	13
1.3 Untersuchte Wirkstoffe .....	15
1.3.1 Sagopilone .....	15
1.3.2 Drospirenon .....	16
1.3.3 Methylprednisolonaceponat (MPA).....	17
1.3.4 Progesteron-Rezeptor-A-selektiver Ligand (PRASL).....	18
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1 Chemikalien, Geräte, Zubehör, biologische Materialien und Übersicht der verwendeten Methoden .....	20
2.1.1 Chemikalien, wichtige Geräte und sonstiges Zubehör .....	20
2.1.2 Übersicht der verwendeten Methoden .....	20
2.1.3 Gewinnung von Ratten- und Hundeserum.....	21
2.1.3.1 Rattenserum.....	21
2.1.3.2 Hundeserum.....	22
2.2 Bestimmung der Serumesterase-Aktivität .....	22
2.2.1 HPLC-Esteraseassay mit <sup>14</sup> C-markiertem S-Acetylthiocholiniodid und <i>p</i> - Nitrophenylacetat.....	22

---

2.2.2	Die pH-Stat-Titration mit Methyl octanoat .....	25
2.3	Inkubation von Ratten- sowie Hundeserum mit den vier Wirkstoffen .	27
2.3.1	Inkubation von frisch gewonnenem und von tiefgefrorenem Rattenserum ..	27
2.3.2	Inkubation von frisch gewonnenem Ratten- und Hundeserum .....	29
2.4	Proteinisolierung und –reinigung aus Ratten- und Hundeserum.....	30
2.4.1	Ionenaustauschchromatografie (ion-exchange chromatography, IEC) .....	30
2.4.2	Größenausschlusschromatografie (size-exclusion chromatography, SEC) .	32
2.4.3	Affinitätschromatografie (affinity chromatography, AC) zur Abtrennung von Albumin (Albumin-AC) .....	32
2.4.4	Affinitätschromatografie (AC) zur Isolierung von Paraoxonase (PON)-haltigen Fraktionen (PON-AC) .....	33
2.4.5	Kinetischer Assay der isolierten Fraktionen mit <i>p</i> -Nitrophenylacetat (NPA).	33
2.4.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese- (PAGE-)Techniken zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Fraktionen .....	34
2.4.6.1	Sodium dodecyl sulfate- (SDS-)PAGE .....	34
2.4.6.2	Native (nicht denaturierende) PAGE .....	35
2.4.7	Endpunkt-Assay der isolierten Fraktionen mit den vier Wirkstoffen .....	36
2.4.8	Proteingehaltsbestimmung mittels Bicinchoninsäure- ( <i>bicinchoninic acid</i> , BCA-)Assay .....	37
2.4.9	Bestimmung von $K_m$ - und $V_{max}$ -Werten .....	38
2.5	Proteinidentifizierung aus SDS-PAGE-Gelen .....	40
2.5.1	Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) – time of flight (TOF) – mass spectrometry (MS).....	40
2.5.2	Liquid chromatography (LC) – electrospray ionization (ESI) – mass spectrometry (MS) .....	41

2.5.3	Western Immunoblotting (Western Blot) .....	42
2.6	Inkubation von isolierten Fraktionen und von unfraktioniertem Serum mit Inhibitoren .....	43
2.6.1	Kriterien für die Auswahl von Inhibitoren.....	43
2.6.2	Screening ausgewählter Inhibitoren (Inhibitorscreening) .....	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
3.1	Bestimmung der Serumesterase-Aktivität mittels HPLC-Esterase- Assay sowie pH-Stat-Titration .....	55
3.1.1	HPLC-Esterase-Assay mit <sup>14</sup> C-markiertem S-Acetylthiocholiniodid und <i>p</i> - Nitrophenylacetat.....	55
3.1.2	Die pH-Stat-Titration mit Methyloctanoat .....	57
3.2	Vergleich der Serumesterase-Aktivität von Ratten- und Hundeserum	58
3.2.1	Vergleich der Aktivität von frisch gewonnenem und tiefgefrorenem Rattenserum .....	58
3.2.2	Vergleich der Aktivität von frisch gewonnenem Ratten- und Hundeserum ..	61
3.3	Proteinisolierung und –reinigung aus Ratten- und Hundeserum.....	63
3.3.1	Typische Chromatogramme der vier Proteintrennungsverfahren .....	63
3.3.1.1	IEC .....	63
3.3.1.2	SEC.....	64
3.3.1.3	Albumin-AC .....	65
3.3.1.4	PON-AC .....	66
3.3.2	Kinetischer Assay der isolierten Fraktionen mit NPA.....	67
3.3.3	Qualitatives Poolen mittels SDS-PAGE und nativer PAGE.....	68
3.3.4	Assay der isolierten Fraktionen aus den Proteintrennungsverfahren mit den vier Wirkstoffen .....	69

---

3.3.4.1	Sagopilone-Assay der isolierten Fraktionen aus Rattenserum .....	69
3.3.4.2	Drospirenon-Assay der isolierten Fraktionen aus Rattenserum.....	71
3.3.4.3	MPA-Assay der isolierten Fraktionen aus Rattenserum .....	74
3.3.4.4	PRASL-Assay der isolierten Fraktionen aus Rattenserum .....	76
3.3.4.5	Drospirenon-Assay der isolierten Fraktionen aus Hundeserum.....	79
3.3.4.6	MPA-Assay der isolierten Fraktionen aus Hundeserum .....	81
3.3.5	$K_m$ - und $V_{max}$ -Wert-Bestimmung.....	83
3.3.5.1	Sagopilone .....	84
3.3.5.2	Drospirenon .....	84
3.3.5.3	MPA .....	85
3.3.5.4	PRASL.....	85
3.4	Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS, LC-ESI-MS und Western Blot.....	86
3.4.1	Proteinidentifizierung in Rattenserum bzw. Fraktionen aus Rattenserum....	86
3.4.1.1	MALDI-TOF-MS.....	86
3.4.1.2	Western Blot.....	88
3.4.2	Proteinidentifizierung in Hundeserum bzw. Fraktionen aus Hundeserum....	89
3.4.2.1	LC-ESI-MS .....	89
3.4.2.2	Western Blot.....	89
3.5	Inhibitorscreening .....	90
3.5.1	Screening in isolierten Fraktionen aus Rattenserum.....	90
3.5.2	Screening in unfraktionierten Rattenserum.....	92
3.5.3	Screening in unfraktionierten Hundeserum.....	94
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>98</b>

---

4.1	Bestimmung der Serumesterase-Aktivität mittels HPLC-Esterase-Assay sowie pH-Stat-Titration .....	98
4.1.1	HPLC-Esterase-Assay .....	98
4.1.2	Die pH-Stat-Titration .....	102
4.2	Vergleich der Serumesterase-Aktivität bezüglich der vier Wirkstoffe	103
4.2.1	Vergleich der Aktivität von frisch gewonnenem und tiefgefrorenem Rattenserum .....	103
4.2.2	Vergleich der Aktivität von frisch gewonnenem Ratten- und Hundeserum	108
4.3	Proteinisolierung und –reinigung aus Ratten- und Hundeserum.....	113
4.3.1	Proteintrennungsverfahren .....	113
4.3.2	Assay der isolierten Fraktionen aus den Proteintrennungsverfahren mit den vier Wirkstoffen .....	115
4.3.3	$K_m$ - und $V_{max}$ -Wert-Bestimmung.....	120
4.4	Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS, LC-ESI-MS und Western Blot.....	123
4.4.1	Proteinidentifizierung in Rattenserum bzw. Fraktionen aus Rattenserum..	123
4.4.1.1	Identifizierung von Ratten-Carboxylesterase 1 durch MALDI-TOF-MS .....	123
4.4.1.2	Nachweis der Rattenserum-PON1 durch Western Blot und MALDI-TOF-MS.....	126
4.4.2	Proteinidentifizierung in Hundeserum bzw. Fraktionen aus Hundeserum..	127
4.4.2.1	Identifizierung von $\alpha_2$ -Makroglobulin durch LC-ESI-MS .....	127
4.4.2.2	Nachweis der Hundeserum-PON1 durch Western Blot.....	129
4.5	Inhibitorscreening .....	130
4.5.1	Screening in isolierten Fraktionen aus Rattenserum.....	130
4.5.2	Screening in unfraktioniertem Rattenserum.....	136

---

4.5.3	Screening in unfraktioniertem Hundeserum.....	140
<b>5.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>149</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung / Summary.....</b>	<b>153</b>
6.1	Zusammenfassung .....	153
6.2	Summary.....	155
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>159</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>176</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis .....	176
8.2	Tabellenverzeichnis .....	181
8.3	Kurzlebenslauf .....	184
8.4	Danksagung.....	185
8.5	Eidesstattliche Erklärung .....	186
8.6	Anhang zu Materialien und Methoden .....	186
8.6.1	Chemikalien .....	186
8.6.2	Wichtige Geräte und sonstiges Zubehör.....	189



## Abkürzungsverzeichnis

2D-PAGE	zweidimensionale PAGE
<sup>14</sup> C-ATC(-Iodid)	S-Acetylthio[ <i>N</i> -methyl- <sup>14</sup> C]cholin(-Iodid) ( <i>N</i> -2-(S-Acetylthio-)ethyl- <i>N</i> -[ <sup>14</sup> C]-methyl- <i>N,N</i> - dimethylammonium(-Iodid))
<sup>14</sup> C-NP	<i>p</i> -Nitro[ <i>U</i> -ring- <sup>14</sup> C]phenol
<sup>14</sup> C-NPA	<i>p</i> -Nitro[ <i>U</i> -ring- <sup>14</sup> C]phenylacetat
<sup>14</sup> C-TC	Thio[ <i>N</i> -methyl- <sup>14</sup> C]cholin
α <sub>2</sub> M	α <sub>2</sub> -Makroglobulin
AC	<i>affinity chromatography</i> (Affinitätschromatografie)
AChE	Acetylcholinesterase
ACN	Acetonitril
AEBSF	4-(2-Aminoethyl-)benzensulfonylfluorid-Hydrochlorid (Pefabloc® SC) <sup>1</sup>
ALAT	Alanin-Aminotransferase
Albumin-AC	Affinitätschromatografie zur Abtrennung von Albumin
APMSF	4-Amidinophenylmethansulfonylfluorid-Hydrochlorid
Apo A-I	Apolipoprotein A-I
ASS	Acetylsalicylsäure
ATC(-Iodid)	S-Acetylthiocholin(-Iodid) ( <i>N</i> -2-(S-Acetylthio-)ethyl- <i>N,N,N</i> -trimethylammonium(-Iodid))
ATP	Adenosintriphosphat
Aufl.	Auflage (in bibliografischen Angaben)
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BChE	Butyrylcholinesterase
Bis-Tris-HCl	(Bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan)- Hydrochlorid
BNPP	Bis( <i>p</i> -nitrophenylphosphat) [hier ist das Natriumsalz gemeint, vgl. 8.6.1]

<sup>1</sup> ® Registered Trademark of Pentapharm Ltd., Basel (Schweiz).

*Allgemeiner Hinweis:* Das Fehlen von Warenzeichen im laufenden Text schließt nicht aus, dass bestimmte Bezeichnungen geschützt sind.

---

CE	Carboxylesterase
ChE	Cholinesterase(n)
CMC	<i>critical micelle concentration</i> (kritische Mizellkonzentration)
CPT-11	Irinotecan (7-Ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin)
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer(II)-ionen [hier gemeint in Form des Sulfats, vgl. 8.6.1]
DEAE	2-( <i>N,N</i> -Diethylamino)-ethylgruppe
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5`-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	DL-Dithiothreitol
DTPA	<i>diethylenetriaminepentaacetic acid</i> (Diethylentriaminpentaessigsäure)
E-64	<i>N</i> -( <i>trans</i> -Epoxysuccinyl)- <i>L</i> -leucin-4-guanidinobutylamid
ed.	<i>edition</i> (Auflage) oder <i>editor</i> (Herausgeber) (in englischsprachigen bibliografischen Angaben)
eds.	<i>editors</i> (Herausgeber) (in englischsprachigen bibliografischen Angaben)
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> `-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	<i>ethylene diamine-N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid (Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure) [hier ist das Dinatriumsalz gemeint, vgl. 8.6.1]
EGTA	<i>ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid (Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure)
ESI	<i>electrospray ionization</i>
EU	Europäische Union
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
Fr.	Fraktion
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HFBA	<i>heptafluorobutyric acid</i> (Heptafluorbuttersäure)

HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie)
hPON1	humane Paraoxonase 1
IEC	<i>ion-exchange chromatography</i> (Ionenaustauschchromatografie)
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigkeits-Chromatografie)
LDS	<i>lithium dodecyl sulfate</i> (Lithiumlaurylsulfat)
LSC	<i>liquid scintillation counting</i> (Flüssigkeitsszintillationszählung)
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MCP	Metoclopramid-Hydrochlorid
MeBut	Methylbutanoat (Methylbutyrat)
MeOct	Methyloctanoat (Methylcaprylat)
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MPA	Methylprednisolonaceponat
MPP	Methylprednisolon-17 $\alpha$ -propionat
MS	<i>mass spectrometry</i> (Massenspektrometrie)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Bethesda, USA)
NPA	<i>p</i> -Nitrophenylacetat
o. O.	ohne Ort (in bibliografischen Angaben)
p.	<i>page</i> (Seite)
PAF(-AH)	Plättchen-aktivierender Faktor(-Acetylhydrolase)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	<i>peripheric anionic site</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Phosphoramidon, Dinatriumsalz	<i>N</i> -( $\alpha$ -Rhamnopyranosyloxy-hydroxyphosphinyl)-L-leucyl-L-tryptophan, Dinatriumsalz

---

P-gp	P-Glykoprotein
PON	Paraoxonase
PON-AC	Affinitätschromatografie zur Isolierung Paraoxonase-haltiger Fraktionen
PR-A bzw. PR-B	Progesteron-Rezeptor A bzw. B
PRASL	Progesteron-Rezeptor-A-selektiver Ligand
PR-Modulatoren	Progesteronrezeptor-Modulatoren
Radio-HPLC	HPLC mit radiochemischer <i>on-line</i> -Detektion
ref.	<i>refer to</i> (vergleiche, vgl.)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SEC	<i>size-exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatografie)
SH-Reagens	Sulfhydrylgruppen-Reagens
St.	Proteinstandard
STI	<i>soybean trypsin inhibitor</i> (Trypsin-Inhibitor aus der Sojabohne)
TAME	<i>N-<math>\alpha</math>-p-Tosyl-L-argininmethylester-Hydrochlorid</i>
TBA	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumbromid
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
TLCK	<i>N-<math>\alpha</math>-p-Tosyl-L-lysin-chloromethylketon-Hydrochlorid</i>
TOF	<i>time of flight</i>
Tris(-HCl)	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(-Hydrochlorid)
TTBS-Lösung	Lösung aus 0,05 M TBS und 0,05 % (m/V) Tween 20
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität): 1 U entspricht der Enzymmenge, die 1 $\mu$ mol des jeweiligen Substrats in 1 min unter Assay-Bedingungen umsetzt.
UDP	Uridindiphosphat
UV-VIS	<i>ultraviolet-visible spectroscopy</i>
vol.	<i>volume</i> (Band) (in englischsprachigen bibliografischen Angaben)
vs.	<i>versus</i> (vergleiche ... mit ...; ... gegenüber ...)
Zn <sup>2+</sup>	Zinkionen [hier gemeint in Form des Sulfats, vgl. 8.6.1]

# **EINLEITUNG**

# 1. Einleitung

## 1.1 Bedeutung der Stabilität von *ex-vivo*-Serumproben in der Arzneimittelentwicklung

Die Stabilität von Wirkstoffen in biologischen Matrices ist eine wichtige Voraussetzung für die korrekte, bioanalytische Wirkstoffquantifizierung im Rahmen von präklinischen und klinischen Prüfungen. Dabei hängt die Wirkstoffstabilität in biologischen Proben im Prinzip von folgenden Faktoren ab [1,2]:

- chemische Eigenschaften des Wirkstoffs (z. B. Vorhandensein bestimmter funktioneller Gruppen)
- biologische Eigenschaften der Probenmatrix (z. B. Enzymaktivitäten)
- Lagerungsbedingungen der Proben (z. B. Temperatur)

In präklinischen bzw. klinischen Studien hat die Bestimmung der Wirkstoffkonzentration vor allem in Blut eine zentrale Bedeutung. So werden zu gewissen Zeitpunkten nach Verabreichung eines Wirkstoffs an Tieren bzw. Menschen Blutproben genommen, daraus Serum- oder Plasmaproben hergestellt und die Konzentration des Wirkstoffs in diesen Proben bestimmt. Auf Grund der hohen Probenanzahl erfolgt oftmals die Herstellung der Serum- oder Plasmaproben nicht unmittelbar nach der Gewinnung der Blutproben, sondern zeitlich versetzt [2]. Daher kann es bei bestimmten Wirkstoffen, die eine geringe Stabilität in der betrachteten Matrix aufweisen, zu einer Abnahme der Konzentration in der Zeit *nach* der Probenentnahme aus dem Tier oder Menschen (d. h. *ex vivo*) kommen. Die in diesen Proben gemessene Konzentration ist folglich kleiner als in den (bei der Blutentnahme) ursprünglich vorgelegenen Proben und täuscht eine stärkere Metabolisierung des Wirkstoffs im Tier oder Menschen (d. h. *in vivo*) vor. Daher fordern Arzneimittelzulassungsbehörden, wie z. B. die *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA, oder auch bestimmte Richtlinien der Europäischen Union (EU) die Prüfung der Stabilität von Wirkstoffen in biologischen Matrices im Rahmen von pharmakokinetischen Studien [1,3-5].

Die Problematik der Instabilität von Wirkstoffen in Serum- bzw. Plasmaproben *in vitro* hat sich für Wirkstoffe mit einer Estergruppe als besonders eklatant erwiesen [6-10]. Der Abbau wurde in diesen Matrices auf Esterasen zurückgeführt [11,12]. Esterasen sind Enzyme, die durch Hydrolyse einen Carbonsäureester spalten und dabei eine Carbonsäure und einen Alkohol freisetzen (sog. Hydrolasen) [13,14]. Sie

gehören laut Definition des *Nomenclature Committee* der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) zu Enzymen der Klasse EC 3.1 [15]. Nach den Cytochrom-P450-Isoenzymen und den Uridindiphosphat-(UDP-)Glucuronosyltransferasen sind Esterasen die am häufigsten beteiligten Enzyme im Arzneistoffmetabolismus [16]. In Serum bzw. Plasma von Tieren und Menschen kommen hauptsächlich folgende Esterasen vor [11,13,14]:

- Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7)
- Butyrylcholinesterase (BChE, auch als Pseudo- oder Serumcholinesterase bekannt; EC 3.1.1.8)
- Carboxylesterase (CE; EC 3.1.1.1)
- Paraoxonase (PON, früher als Arylesterase bezeichnet; EC 3.1.8.1)

AChE, BChE und CE sind Serinhydrolasen, d. h. sie weisen einen katalytisch relevanten Serylrest in ihrem aktiven Zentrum auf [13]. Der Serylrest ist Teil der sog. katalytischen Triade (*catalytic triad*), d. i. eine Anordnung von drei Aminosäureresten (hier: Serin, Glutaminsäure und Histidin) in räumlicher Nachbarschaft [13]. Diese Triade und insbesondere der Serylrest haben eine entscheidende Bedeutung im katalytischen Mechanismus der Serinhydrolasen und bedingen die Esteraseaktivität [14]. Dagegen besitzt PON eine sog. *His-His dyad*, bei der zwei Histidylreste in räumlicher Nähe liegen, so dass wahrscheinlich hierüber die Esterase- und Lactonaseaktivität ermöglicht wird [17]. Da Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) für die Aktivität (und Struktur) der PON essentiell sind und sie wahrscheinlich auch am Katalysemechanismus beteiligt sind, kann PON als Metallohydrolase angesehen werden [13,14].

Auf Grund der im Vergleich zu den anderen Esterasen relativ geringen Serum- bzw. Plasmakonzentration von AChE und seiner hohen Substratspezifität für Cholinderivate wurde nicht von einer wesentlichen Beteiligung der AChE am Abbau von Ester-Wirkstoffen in Serum bzw. Plasma ausgegangen. BChE, CE und PON werden als die in diesem Zusammenhang relevanten Serumesterasen betrachtet [11,18-21].

## **1.2 Frage- und Zielstellung dieser Arbeit**

Im Rahmen von präklinischen Prüfungen der Bayer Schering Pharma AG ist die geringe *in-vitro*-Stabilität bestimmter Ester-Wirkstoffe in Serum bzw. Plasma von Tieren und Menschen aufgefallen. In diesem Zusammenhang wurde deutlich, dass insbesondere Serum bzw. Plasma von Nagetieren (z. B. Ratten), in

Übereinstimmung mit Literaturberichten [22,23], oft eine höhere Esteraseaktivität als von Nicht-Nagetieren (z. B. Hunden und Menschen) zeigten. Wie häufig auch in der Literatur für andere Wirkstoffe beschrieben [6-8,24], gelang es in internen Studien der Bayer Schering Pharma AG durch den Einsatz von bestimmten Enzyminhibitoren größtenteils, die Stabilität der Serum- bzw. Plasmaproben *in vitro* zu erhöhen. Diese Stabilitätsuntersuchungen schlossen aber eine tiefergründige Betrachtung des kausalen Zusammenhangs zwischen den Wirkstoff-spezifischen Serumesterasen der jeweiligen Spezies, dem Wirkstoffmolekül und der Wirksamkeit der Inhibitoren nicht ein.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist die Stabilisierung von bestimmten Ester-Wirkstoffen in *in-vitro*-Serumproben von Ratten (als Vertreter der Nagetiere mit im Allgemeinen hoher Serumesteraseaktivität) und Hunden (als Vertreter der Nicht-Nagetiere mit zumeist geringerer Serumesteraseaktivität). Die Esteraseaktivität wird mittels vier strukturell unterschiedlicher Ester-Wirkstoffe der Bayer Schering Pharma AG (Sagopilone, Drospirenon, Methylprednisolonaceponat [MPA] und Progesteron-Rezeptor-A-selektiver Ligand [PRASL]) untersucht. Der Unterschied der Serumesteraseaktivität der beiden Spezies wird zunächst in Voruntersuchungen an Hand geeigneter Esterase-Modellsubstrate sowie der vier Wirkstoffe verdeutlicht. Um die eigentliche Ursache der Serumesteraseaktivität zu eruieren, werden die spezifischen Esterasen aus dem Serum mittels geeigneter Methoden isoliert und identifiziert. Die Identifizierung soll bei der Suche nach geeigneten Inhibitoren helfen. Durch ein Screening ausgesuchter Esterase- und Proteaseinhibitoren sollen potente Inhibitoren zur Erhöhung der Wirkstoffstabilität in Serum gefunden werden. Letztlich sollen aus der Isolierung, Identifizierung und Inhibition der Wirkstoff-spezifischen Esterasen Zusammenhänge zwischen diesen Esterasen, dem jeweiligen Wirkstoffmolekül und der jeweils wirksamen Inhibitoren abgeleitet werden. Diese Erkenntnisse können prospektiv in weiterführenden *in-vitro*-Untersuchungen mit Tier- und Humanblut sowie auch in präklinischen und klinischen Prüfungen mit den vier Wirkstoffen oder strukturell verwandten und nicht verwandten Ester-Wirkstoffen genutzt werden.

## 1.3 Untersuchte Wirkstoffe

### 1.3.1 Sagopilone

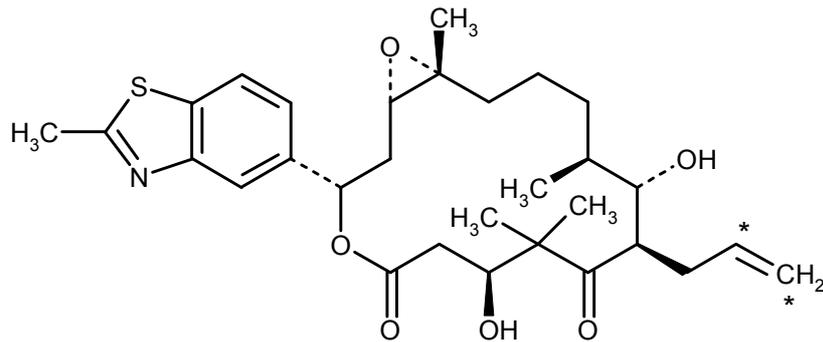
Sagopilone (ZK-EPO) ist ein Vertreter aus der Gruppe der sog. Epothilone [25]. Bei den Epothilonen handelt sich um von Myxobakterien gebildete Sekundärmetaboliten, die bei einem Screening für antifungal wirksame Substanzen erstmals aufgefallen sind [26]. Später wurde entdeckt, dass Epothilone cytotoxisch gegenüber humanen Tumorzellen wirken, da sie Mikrotubuli stabilisieren: Sie inhibieren einerseits die Tubulindepolymerisation in der Anaphase der mitotischen Kern- bzw. Zellteilung und fördern andererseits die Aggregation von Tubulin zu Mikrotubuli. Daher wird der Zellzyklus am Übergang von der Metaphase zur Anaphase arretiert und die Zellteilung unterbleibt. Die Unterbrechung der Mitose führt zur Einleitung der Apoptose und damit zum Zelltod [26-28].

Ein besonderes Merkmal der Epothilone ist ihre wachstumsinhibierende Wirkung auf solche Tumorzellen, die das P-Glykoprotein (P-gp) überexprimieren [26,29]. P-gp ist ein Adenosintriphosphat- (ATP-)abhängiger Effluxtransporter, der Wirkstoffe u. a. Substanzen vom Zellinneren nach außen befördert [30]. Tumorzellen können diese Effluxpumpe übermäßig stark exprimieren und so eine weitgehende Resistenz z. B. gegenüber Cytostatika aufbauen.

Abgeleitet von den natürlich vorkommenden Epothilonen (Epothilon A und Epothilon B [31]) wurden einige Derivate mit höherer cytostatischer Potenz und breiterem Wirkspektrum synthetisiert [27,32-36], darunter auch die in dieser Arbeit untersuchte Verbindung Sagopilone ((1*S*,3*S*,7*S*,10*R*,11*S*,12*S*, 16*R*)-7,11-Dihydroxy-8,8,12,16-tetramethyl-3-(2-methyl-1,3-benzothiazol-5-yl)-10-(prop-2-enyl)-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecan-5,9-dion; **Abbildung 1**) [25,37]. Sagopilone weist dieselbe Grundstruktur wie Epothilon B auf [26], beide unterscheiden sich jedoch in ihren Seitenketten.

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde Tritium- (<sup>3</sup>H-)markiertes Sagopilone eingesetzt (siehe **Abbildung 1**).

Sagopilone ist derzeit in der klinischen Erprobung bei der Bayer Schering Pharma AG. Es wird insbesondere die Wirksamkeit bei Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren geprüft.

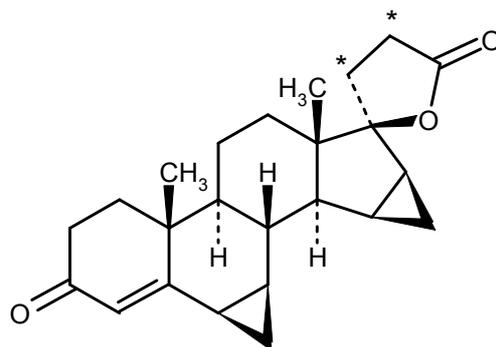


**Abbildung 1:** Strukturformel von Sagopilone. Die Sternchen (\*) kennzeichnen die Positionen der  $^3\text{H}$ -Markierung.

### 1.3.2 Drospirenon

Drospirenon ist eine Substanz aus der Gruppe der Progestine (Gestagene). Gestagene werden zur hormonellen Kontrazeption und in der (post-)menopausalen Hormonersatztherapie eingesetzt [38].

Drospirenon unterscheidet sowohl strukturell als auch funktionell von anderen Progestinen, die sich zumeist von den endogenen Steroidhormonen Testosteron bzw. Progesteron ableiten [38,39]. Progestine weisen auf Grund dieser Strukturverwandschaft häufig Wechselwirkungen mit den entsprechenden Hormonrezeptoren auf [40]. So zeigen einige Gestagene (insbesondere die 19-Nortestosteronderivate) unerwünschte androgene und glucocorticoide Wirkungen, wie z. B. Hirsutismus oder Akne [38,39].



**Abbildung 2:** Strukturformel von Drospirenon. Die Sternchen (\*) kennzeichnen die Positionen der  $^3\text{H}$ -Markierung.

Drospirenon (6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dimethylen-3-oxo-17 $\alpha$ -pregna-4-en-21,17-carbolacton; **Abbildung 2**) leitet sich vom Aldosteron-Rezeptorantagonisten Spironolacton ab, da beide über einen  $\gamma$ -Butyrolactonring am Spiro-Kohlenstoffatom in 17-Position verfügen [41,42]. Daher hat Drospirenon auch antagonistische Effekte am

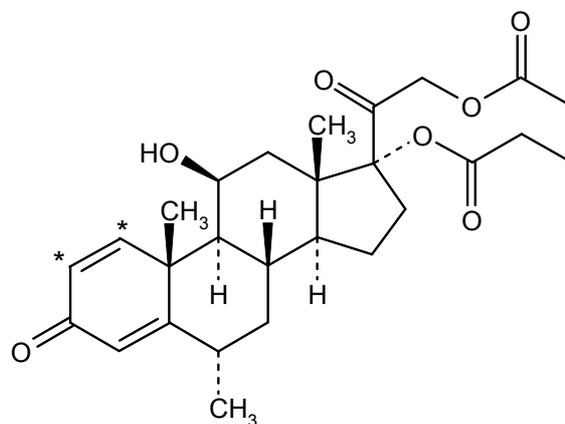
Aldosteronrezeptor und wirkt antimineralocorticoid. In Bezug auf seine gestagene Wirkung ist es mit Progesteron vergleichbar und fungiert auch als Antagonist am Androgenrezeptor [38,40,42].

Die antimineralocorticoide Wirkung des Drospirenon kommt bei einer Kombinationstherapie mit Estrogenen positiv zum Tragen, da Estrogene zu einer vermehrten renalen Wasser- und Salzretention führen können und dies in einer Gewichtszunahme resultiert, der Drospirenon entgegenwirken kann [39,41-43].

Auf Grund des fehlenden androgenen und des vorhandenen partiellen antiandrogenen Effekts treten unerwünschte Wirkungen, die auf Stimulation des Androgenrezeptors zurückzuführen sind, bei Drospirenon seltener auf [39,41,42]. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde  $^3\text{H}$ -markiertes Drospirenon verwendet (siehe **Abbildung 2**).

### 1.3.3 Methylprednisolonaceponat (MPA)

Methylprednisolonaceponat (21-Acetoxy-11 $\beta$ -hydroxy-6 $\alpha$ -methyl-17-propionyloxy-1,4-pregnadien-3,20-dion, MPA; **Abbildung 3**) ist ein topisch wirksames Glucocorticoid [44]. MPA kann zur lokalen Behandlung ekzematöser Hauterkrankungen, Sonnenbrand, Psoriasis und Neurodermitis eingesetzt werden [44-46].



**Abbildung 3:** Strukturformel von Methylprednisolonaceponat (MPA). Die Sternchen (\*) kennzeichnen die Positionen der  $^3\text{H}$ -Markierung.

Die Verbindung stellt im Prinzip ein Derivat des 6 $\alpha$ -Methylprednisolons dar, das in 17 $\alpha$ -Position mit Propionsäure und in 21-Position mit Essigsäure verestert ist (**Abbildung 3**). Auf Grund des hohen lipophilen Charakters penetriert MPA schnell in das *Stratum corneum* der Haut und wird durch dort vorliegende Esterasen in Methylprednisolon-17 $\alpha$ -propionat (MPP) überführt, das eine höhere Affinität zum Glucocorticoidrezeptor als MPA hat. Nach dieser sog. Bioaktivierung kommt es systemisch hauptsächlich zu einer Glucuronidierung des MPP in 21-Position und

renaler Elimination des Glucuronids, so dass der Einfluss von topisch appliziertem MPA auf den endogenen Glucocorticoidstoffwechsel gering ist [44,46].

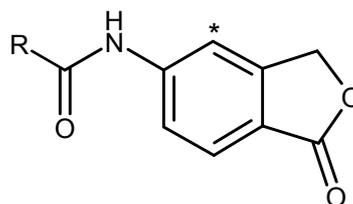
Die therapeutische Wirksamkeit von MPA wird als mittelstark eingestuft [45,47]. Für MPA ist es gelungen, eine derart starke Dissoziation zwischen den erwünschten und unerwünschten glucocorticoiden Wirkungen zu erreichen, dass die erwünschten Wirkungen sogar deutlich überwiegen. So wird das Risiko einer Hautatrophisierung, das allergene Potential und, wie erwähnt, auch die Gefahr von systemischen Glucocorticoideffekten als gering angesehen [44-48].

Die in den hiesigen Untersuchungen verwendete Substanz war  $^3\text{H}$ -markiert (siehe **Abbildung 3**).

#### 1.3.4 Progesteron-Rezeptor-A-selektiver Ligand (PRASL)

Der Progesteron-Rezeptor-A-selektive Ligand (PRASL, Strukturausschnitt in **Abbildung 4**) zählt zu den sog. *nicht-steroidalen* Progesteronrezeptormodulatoren (PR-Modulatoren) [49,50]. Prospektiv können diese Gestagene die bekannten *steroidalen* Progestine in der hormonalen Kontrazeption und in anderen gynäkologischen Indikationen ersetzen, weil die PR-Modulatoren zumeist selektiv an Progesteronrezeptoren wirken, während die steroidalen Progestine auch mit anderen Steroidrezeptoren in Wechselwirkung treten (vgl. 1.3.2) [43,49].

PRASL interagiert bevorzugt mit dem Progesteronrezeptor A (PR-A), der neben dem Progesteronrezeptor B (PR-B) in allen Progesteron-sensitiven Geweben vorkommt. Über die beiden Isoformen werden verschiedene gewebsspezifische Effekte vermittelt: Die Stimulation von PR-A *hemmt* die Proliferation von uteralem Endometrialgewebe und die Ovulation. Dagegen führt die Aktivierung von PR-B zu einer *Anregung* der Proliferation und Differenzierung des Mammagewebes. Von PRASL erhofft man sich deshalb selektive Effekte auf das Endometrium und den Ovarialzyklus, ohne das Brustdrüsengewebe zu beeinflussen [43,49,51-53]. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde die  $^3\text{H}$ -markierte Verbindung eingesetzt (siehe **Abbildung 4**).



**Abbildung 4:** Ausschnitt der Strukturformel des Progesteron-Rezeptor-A-selektiven Liganden (PRASL). Das Sternchen (\*) kennzeichnet die Position der  $^3\text{H}$ -Markierung.

# **MATERIALIEN UND METHODEN**

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Geräte, Zubehör, biologische Materialien und Übersicht der verwendeten Methoden

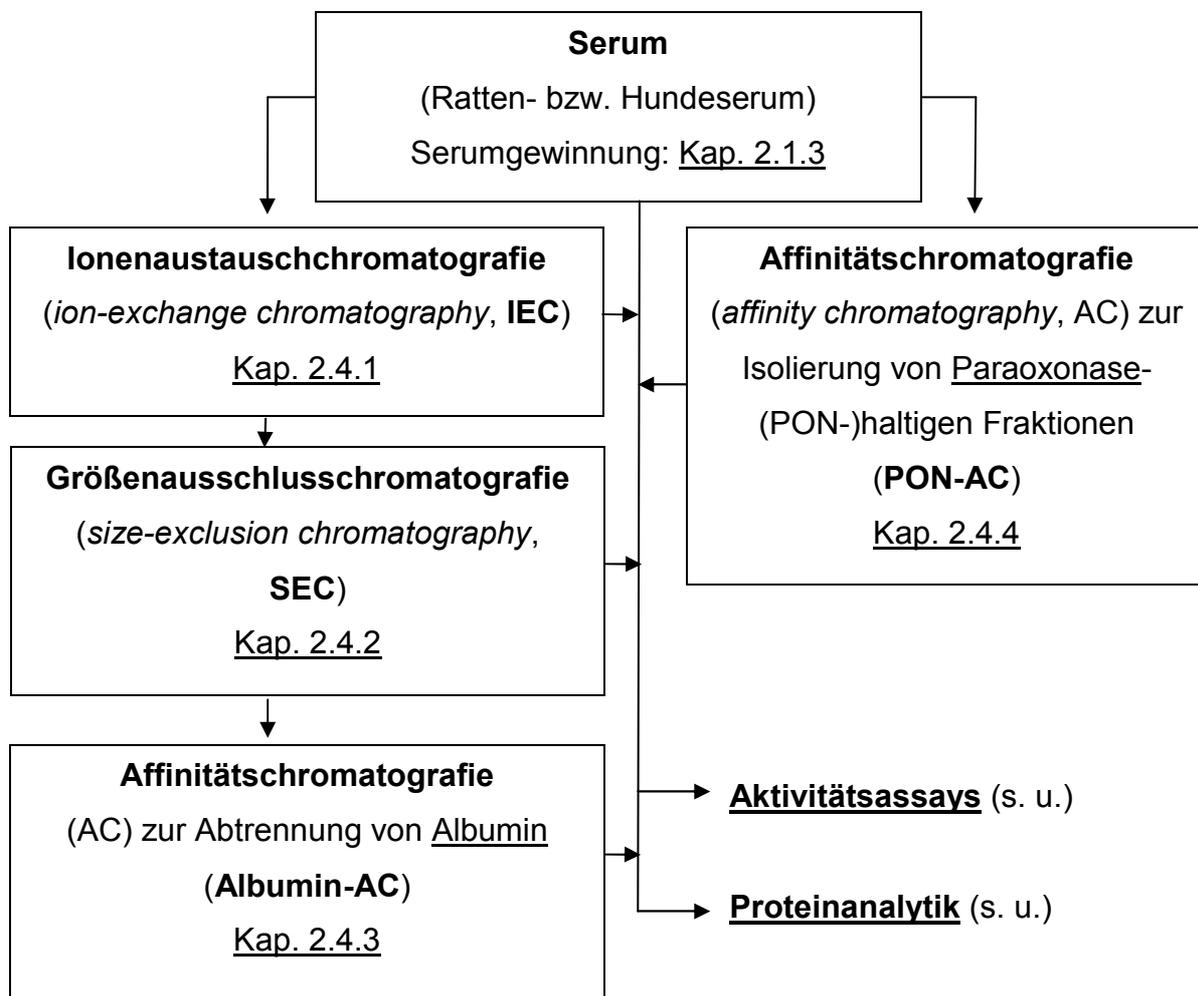
#### 2.1.1 Chemikalien, wichtige Geräte und sonstiges Zubehör

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, wichtiger Geräte und weiteren Zubehörs befindet sich im Anhang (8.6).

#### 2.1.2 Übersicht der verwendeten Methoden

Die folgende Übersicht gibt einen Überblick der angewandten Methoden zur Proteintrennung und anschließenden Assays und weiterer Analytik. Die Inkubation von frisch gewonnenem und tiefgefrorenem Rattenserum sowie frisch gewonnenem Ratten- und Hundeserum (Kap. 2.3), die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wert-Bestimmung (Kap. 2.4.9) und das Inhibitorscreening (Kap. 2.6.2) sind hier nicht aufgeführt.

#### Proteintrennungsverfahren (Kap. 2.4)



### Aktivitätsassays

- Aktivitätsassays mit den **Esterase-Modellsubstraten** S-Acetylthio[*N*-methyl-<sup>14</sup>C]choliniodid (**<sup>14</sup>C-ATC-Iodid**) und *p*-Nitro[*U*-ring-<sup>14</sup>C]phenylacetat (**<sup>14</sup>C-NPA**) (Kap. 2.2.1) bzw. Methyloctanoat (**MeOct**) (Kap. 2.2.2) für *Serum*
- Kinetischer Assay mit dem **unspezifischen Esterasesubstrat** *p*-Nitrophenylacetat (**NPA**) (Kap. 2.4.5) für die *Fraktionen aus den Proteintrennungsverfahren*
- Assay mit den Wirkstoffen **Sagopilone, Drospirenon, MPA** und **PRASL** (Kap. 2.4.7) für *Serum* und die *Fraktionen aus den Proteintrennungsverfahren*

### Proteinanalytik

- **SDS-** und **native PAGE** (Kap. 2.4.6) zur Überprüfung der Reinheit der *Fraktionen aus den Proteintrennungsverfahren*
- **BCA-Assay** (Kap. 2.4.8) zur Proteingehaltsbestimmung der *Fraktionen aus den Proteintrennungsverfahren*

### Proteinidentifizierungstechniken (Kap. 2.5)

- **MALDI-TOF-MS** (Kap. 2.5.1)
  - **LC-ESI-MS** (Kap. 2.5.2)
  - **Western Blot** (Kap. 2.5.3)
- } für *bestimmte Fraktionen aus den Proteintrennungsverfahren*

## 2.1.3 Gewinnung von Ratten- und Hundeserum

### 2.1.3.1 Rattenserum

Zur Gewinnung von Rattenserum wurden männliche und weibliche Ratten des Wistar-Stammes Crl:WI (Han) (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einer Körpermasse von 155 bis 265 g entblutet. Die Entblutung erfolgte während einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (Fa. Abbott, siehe Anhang 8.6.1) durch chirurgische Öffnung der Bauchdecke und Blutentnahme über die *Vena cava caudalis* mittels Serum-Monovetten (Fa. Sarstedt, siehe Anhang 8.6.2). Nach ca. 30-minütigem Stehen bei Raumtemperatur und anschließender 15-minütiger Zentrifugation bei ca.

1400·g und 4°C wurde der klare Überstand abgenommen und zu äquivalenten Volumenteilen aus Serum von männlichen und weiblichen Tieren gemischt. Dieses Serumgemisch wurde dann innerhalb von 8 h als Frischserum verwendet, wobei die Zwischenlagerung in dieser Zeit bei 4°C erfolgte. Ein Teil des frisch hergestellten Serumgemisches wurde bei -20°C eingefroren, nach 13 bis 15 Tagen innerhalb von etwa 2 h bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend als tiefgefrorenes (und zur Inkubation mit den vier Wirkstoffen wieder aufgetautes) Serum innerhalb von 8 h (mit Zwischenlagerung bei 4°C) verwendet.

### 2.1.3.2 Hundeserum

Hundeserum wurde durch Blutentnahme aus männlichen und weiblichen Hunden der Rasse Beagle (Marshall BioResources, North Rose, USA) gewonnen. Die Tiere wiesen jeweils eine Körpermasse von 6,2 bis 9 kg auf. Die Herstellung des Serums erfolgte in Analogie zum Rattenserum. In den folgenden Untersuchungen mit Hundeserum wurde nur mit Frischserum gearbeitet. Dieses wurde bis zur jeweiligen Untersuchung bei 4°C gelagert.

## 2.2 Bestimmung der Serumesterase-Aktivität

### 2.2.1 HPLC-Esteraseassay mit <sup>14</sup>C-markiertem S-Acetylthiocholiniodid und p-Nitrophenylacetat

Ratten- bzw. Hundeserum wurde mit <sup>14</sup>C-markiertem S-Acetylthiocholiniodid (<sup>14</sup>C-ATC-Iodid, Fa. BlyChem) und <sup>14</sup>C-markiertem p-Nitrophenylacetat (<sup>14</sup>C-NPA, Fa. Hartmann Analytic) inkubiert, um die Aktivität dieser Matrizes bezogen auf die beiden unspezifischen Esterasesubstrate S-Acetylthiocholiniodid (ATC-Iodid) und p-Nitrophenylacetat (NPA) vergleichen zu können. Die Methodik wurde bereits ausführlich beschrieben [54] und wird nachfolgend kurz wiedergegeben.

In einem Gesamtansatz von 500 µL wurden 250 µL einer Pufferlösung (pH 7,4), die 100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl, Fa. Alfa-Aesar) und 10 mM Calciumchlorid (Fa. Merck) enthält, mit 130 µL Wasser, 10 µL einer wässrigen <sup>14</sup>C-ATC-Iodid-Lösung (50 mM; 60 kBq/mg), 10 µL einer methanolischen <sup>14</sup>C-NPA-Lösung (50 mM; 90 kBq/mg) und 100 µL Ratten- bzw. Hundeserum gemischt, so dass jeweils 1 mM <sup>14</sup>C-ATC-Iodid und <sup>14</sup>C-NPA sowie 2 % (V/V) Methanol (Fa. Merck) im Ansatz vorlagen. Nach einer Inkubationszeit von 0, 0,5, 1,

1,5, 2 oder 2,5 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zusatz von 10  $\mu\text{L}$  Perchlorsäure (Fa. Riedel-de Haën) gestoppt. Die Proben wurden bei ca. 10000·g für 15 min zentrifugiert, der klare Überstand in HPLC-Gefäße überführt und im HPLC-Autosampler bei 5°C für die anschließende Analyse gelagert. Jeweils 10  $\mu\text{L}$  wurden in das HPLC-System injiziert.

Zur Kontrolle der nicht-enzymatischen Hydrolyse und zur Abschätzung möglicher Interferenzen durch Serumbestandteile wurden sowohl Nullproben mit insgesamt 230  $\mu\text{L}$  Wasser statt 100  $\mu\text{L}$  Serum als auch Leerproben mit insgesamt 150  $\mu\text{L}$  Wasser statt 20  $\mu\text{L}$  der Substratlösungen untersucht. Alle Proben wurden doppelt hergestellt.

Die Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung des Verhältnisses der radiochemisch gemessenen Peakfläche des jeweiligen Substrats ( $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid, gemessen als  $^{14}\text{C}$ -ATC, bzw.  $^{14}\text{C}$ -NPA) zur Gesamtfläche des Peaks des jeweiligen Substrats und seines Abbauproduktes, d. i. Thio[*N-methyl*- $^{14}\text{C}$ ]cholin ( $^{14}\text{C}$ -TC) bzw. *p*-Nitro[*U*-ring- $^{14}\text{C}$ ]phenol ( $^{14}\text{C}$ -NP). Mittels dieses Verhältnisses wurde die Konzentration der Substrate in den einzelnen 500- $\mu\text{L}$ -Proben berechnet, da die Ausgangskonzentration bekannt war. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte für die aus der Konzentration berechneten Stoffmengen an  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid und  $^{14}\text{C}$ -NPA für die einzelnen Inkubationszeitpunkte auf eine Ausgangsstoffmenge von jeweils 100 % Substrat bezogen. Die Hydrolyse von  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid folgte im gesamten Reaktionsverlauf von 0 bis 2,5 min einer Kinetik nullter Ordnung. Demnach wurde eine Einheit (Unit, U) der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ( $k_{\text{ATC}}$ , d. i. die Steigung der Regressionsgeraden dieses Umsatzes) als die Enzymmenge definiert, die 1  $\mu\text{mol}$  Substrat ( $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid) in 1 min unter Assay-Bedingungen umsetzte. Im Gegensatz dazu wies die Hydrolyse von  $^{14}\text{C}$ -NPA eine Kinetik erster Ordnung auf. Demzufolge wurden die Steigungen der Regressionskurven dieser Hydrolyse über den gesamten Reaktionsverlauf von 0 bis 2,5 min berechnet und als positive Werte in Form der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k_{\text{NPA}}$  (in  $\text{min}^{-1}$ ) angegeben. Für die Spaltung von  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid bzw.  $^{14}\text{C}$ -NPA wurden keine Korrekturen hinsichtlich der nicht-enzymatischen Hydrolyse vorgenommen, weil diese unter 5 bzw. 10 % nach 2,5 min lag. Dennoch ist zu bemerken, dass die hier ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten sowohl die enzymatische als auch die nicht-enzymatische Hydrolyse im gesamten Reaktionsverlauf beschrieben. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{ATC}}$  bzw.  $k_{\text{NPA}}$  wurden zur besseren

Vergleichbarkeit in Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) umgerechnet, und zwar für  $k_{ATC}$  gemäß folgender Gleichung:

$$t_{1/2} = \frac{n_0}{2 \cdot k_{ATC}}$$

Die Größe  $n_0$  gab die ursprünglich vorliegende Stoffmenge an  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid im Reaktionsansatz an (d. i.  $0,5 \mu\text{mol}$ ). Die lineare Regression wurde mit der Gleichung  $f=y_0+a \cdot x$  ausgeführt, wobei der Parameter  $y_0$  aus der Regression stammte und  $f$  der Stoffmenge an  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid,  $a$  der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k_{ATC}$  und  $x$  der Zeit  $t$  entsprachen. Für  $k_{NPA}$  wurde folgende Gleichung zur Umrechnung in  $t_{1/2}$  angewandt:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{NPA}}$$

Die nicht-lineare Regression wurde mit der dreiparametrischen Gleichung  $f=y_0+a \cdot e^{-b \cdot x}$  durchgeführt, wobei die Parameter  $y_0$  und  $a$  aus der Regression stammten und  $f$  der Stoffmenge an  $^{14}\text{C}$ -NPA,  $b$  der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{NPA}$  und  $x$  der Zeit  $t$  entsprachen. Die Berechnung von  $t_{1/2}$  bezog sich auf die Krümmung der Exponentialkurve ohne Berücksichtigung von  $n_0$ ,  $y_0$  und  $a$ . Zur Berechnung der Initialgeschwindigkeit  $v_0$  wurde eine lineare Regression der jeweiligen Stoffmenge bei 0 min und der ein bis zwei unmittelbar darauf folgenden Inkubationszeitpunkte durchgeführt und die Steigung der erhaltenen Gerade als positiver Wert für  $v_0$  angegeben. Der Substratumsatz lag dabei für  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid unter 20 % und für  $^{14}\text{C}$ -NPA unter 30 %.

Zum Vergleich der gefundenen Stoffmengen an  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid (gemessen als  $^{14}\text{C}$ -ATC) bzw.  $^{14}\text{C}$ -NPA wurden die Werte für die einzelnen Inkubationszeitpunkte mittels eines Zweistichproben-t-Test auf einen signifikanten Unterschied hin untersucht, wobei das Signifikanzniveau mit  $p < 0,05$  festgelegt wurde. Alle Angaben zu Stoffmengen der Substrate,  $k_{ATC}$ ,  $k_{NPA}$  und  $t_{1/2}$  beziehen sich auf den Reaktionsansatz ( $500 \mu\text{L}$ ).

Zur HPLC-Analytik wurden bereits beschriebene Verfahren [55,56] entsprechend angepasst [54]. Es wurde eine Luna C18 (2)-Säule (Fa. Phenomenex) unter folgenden Bedingungen verwendet:

- Eluens A: 20 mM Ammoniumformiat (Fa. Riedel-de Haën) mit 20 mM Heptafluorobuttersäure (*heptafluorobutyric acid*, HFBA, Fa. Alfa-Aesar), pH 3,0
- Eluens B: Acetonitril (ACN, Fa. Merck)

- Flussgeschwindigkeit: 0,5 mL/min
- Säulentemperatur: 60°C
- Gradientenverlauf (in % [V/V]):
  - 0 – 12 min: Eluens A / Eluens B 95 / 5
  - 12 – 17 min: Eluens A / Eluens B 95 / 5 → 40 / 60
  - 17 – 21 min: Eluens A / Eluens B 40 / 60 → 10 / 90
  - 21 – 25 min: Eluens A / Eluens B 10 / 90 → 95 / 5
  - 25 – 30 min: Eluens A / Eluens B 95 / 5
- UV-VIS-Detektor-Wellenlängen: 230 und 350 nm
- Volumen der Flusszelle im radiochemischen Detektor: 250 µL
- *Liquid scintillation counting*- (LSC-)Cocktail zur radiochemischen Detektion: Ultima-Flo M (Fa. PerkinElmer), zugemischt mit 1 mL/min Flussgeschwindigkeit

### 2.2.2 Die pH-Stat-Titration mit Methyloctanoat

Die pH-Stat-Titration diente der Bestimmung der Aktivität von Ratten- und Hundeserum bezogen auf die Spaltung von MeOct, einem relativ lipophilen, aliphatischen Ester, der ein Carboxylesterase- (CE-)Substrat ist. Bei der pH-Stat-Titration wird während der Reaktion ein Ester durch eine Matrix gespalten. Die dabei frei werdende Säure vermindert geringfügig den pH-Wert der gepufferten Reaktionslösung. Dieser Abfall des pH-Wertes kann durch ein pH-Meter gemessen werden. Das pH-Meter steht in Verbindung mit einem Impulsomaten (Fa. Metrohm), der wiederum mit einer automatischen Bürette verknüpft ist. Bei einer Änderung des pH-Werts wird über den Impulsomaten ein elektronisches Signal an die Bürette gegeben, eine bestimmte Menge einer Titrationslösung, hier 0,05 M Natriumhydroxid- (NaOH-)Lösung (Fa. Sigma-Aldrich), hinzuzugeben, und zwar so viel, bis der pH-Wert wieder den ursprünglichen pH-Wert der gepufferten Reaktionslösung erreicht hat. In gewissen zeitlichen Abständen kann man den Verbrauch an Titrator ablesen und so auf die pro Zeit entstandene Menge an Säure (d. h. pro Zeit umgesetztes Substrat) zurückschließen.

Zur Herstellung der gepufferten Reaktionslösung wurden 455 µL MeOct (Fa. Alfa-Aesar) und 583 µL Ethanol (Fa. Merck) in ca. 20 mL einer Kaliumphosphat (Fa. Sigma-Aldrich)-Pufferlösung (10 mM; pH 8,0) mit einem Rührstab dispergiert. Dieser Ansatz wurde mit der Kaliumphosphat-Pufferlösung auf 50,0 mL aufgefüllt. Somit

lagen in der Reaktionslösung 50 mM MeOct und 0,2 M Ethanol (d. i. 0,92 % [m/V] Ethanol) vor. Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde dann gemessen und als Ausgangswert im Impulsomat eingestellt. Danach wurden 1,5 mL Ratten- bzw. Hundeserum zur Reaktionslösung gegeben und etwa 10 s mit einem Magnetrührer gemischt. Die Reaktionslösung wurde während der gesamten Titration mit diesem Magnetrührer durchmischt. Anschließend wurde die elektronische Verbindung zwischen Impulsomat und Bürette aktiviert, das Volumen der nach den ersten 15 s zugegebenen NaOH-Lösung notiert (als Wert zum Zeitpunkt 0 min) und dann die Stoppuhr gestartet. Von 0 bis 20 min wurde die Reaktionslösung titriert und der Verbrauch an NaOH-Lösung zu einzelnen Zeitpunkten (von 0-10 min: bei jeder Minute, danach: bei 12, 15 und 20 min) festgehalten. Als Nullprobe wurde 1,5 mL Wasser statt 1,5 mL Serum verwendet. Der Verbrauch an NaOH-Lösung für die Serumproben wurde um den Verbrauch für die Nullproben zur Erfassung der nicht-enzymatischen Hydrolyse korrigiert. Für Rattenserum wurden zwei Proben gemessen und der Mittelwert der Volumina für die einzelnen Zeitpunkte zur Auswertung herangezogen. Für Hundeserum und die Nullproben wurden je eine Probe gemessen.

Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der Stoffmenge des umgesetzten Substrats aus dem Titer der NaOH-Lösung ( $\text{Titer} \geq 0,989$ ) und dem Verbrauch an Titrator pro Zeitpunkt. Die pro Zeit umgesetzte Stoffmenge wurde um die Stoffmenge, die bei 0 min bereits umgesetzt war, korrigiert. Diese korrigierte Stoffmenge wurde gegen die Zeit aufgetragen. Für Rattenserum wurde durch lineare Regression die Aktivität der Serumprobe bestimmt. Dabei wurde die Enzymaktivität (in U) wie bei 2.2.1 (hier bezogen auf MeOct) definiert und als Initialgeschwindigkeit  $v_0$  angegeben, da der Substratumsatz unter 20 % lag. Die lineare Regression wurde mit der Gleichung  $f = y_0 + a \cdot x$  durchgeführt, wobei der Parameter  $y_0$  aus der Regression stammte und  $f$  der Stoffmenge an umgesetzten MeOct,  $a$  der Initialgeschwindigkeit  $v_0$  und  $x$  der Zeit  $t$  entsprachen. Für Hundeserum wurde eine nicht-lineare Regression mit der Gleichung  $f = y_0 + a \cdot (1 - e^{-b \cdot x})$  durchgeführt, wobei  $y_0$ ,  $a$  und  $b$  Regressionsparameter waren,  $f$  die umgesetzte Stoffmenge an MeOct und  $x$  die Zeit repräsentierten. Die erhaltene Kurve aus dieser Regression wurde grafisch dargestellt. Wie für Rattenserum wurde für Hundeserum durch lineare Regression der Werte zwischen 0 und 6 min die Steigung einer Gerade erhalten und diese als Initialgeschwindigkeit  $v_0$  angegeben, wobei der Substratumsatz ebenfalls unter 20 %

lag. Alle Angaben zu den Stoffmengen des Substrats und  $v_0$  bezogen sich auf den Reaktionsansatz (50 mL).

### 2.3 Inkubation von Ratten- sowie Hundeserum mit den vier Wirkstoffen

Sagopilone, Drospirenon, MPA und PRASL (1.3; alle von Bayer Schering Pharma) wurden in diskontinuierlichen Assays mit einem definierten Endpunkt untersucht, d. h. für jeden Zeitpunkt und Wirkstoff wurde eine Probe hergestellt, inkubiert und mittels HPLC und radiochemischer *on-line*-Detektion (Radio-HPLC) analysiert.

#### 2.3.1 Inkubation von frisch gewonnenem und von tiefgefrorenem Rattenserum

Die Untersuchung zum Vergleich der Aktivität von Frischserum sowie tiefgefrorenem und dann aufgetautem Rattenserum erfolgte durch Inkubation der vier Wirkstoffe in dem jeweiligen Serum. Dazu wurde jeweils eine ethanolische Lösung des  $^3\text{H}$ -markierten Wirkstoffs unter leichtem Stickstoffstrom eingetrocknet. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Serums auf den getrockneten Wirkstoff gegeben, gemischt und für definierte Zeiträume (siehe 3.2.1) in einem Wasserbad bei  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (bei MPA:  $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Am Ende des jeweiligen Inkubationszeitpunkts wurde die Reaktion gestoppt, indem 100  $\mu\text{L}$  ACN dazugegeben, gemischt, 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 15 min bei etwa  $10000\cdot g$  zentrifugiert wurde. Danach wurde der klare Überstand abgenommen, unter Stickstoff getrocknet und in Eluens A (siehe **Tabelle 1**) bzw. für PRASL-haltige Proben in ACN aufgenommen. Diese Proben wurden, falls sie nicht sofort in entsprechende HPLC-Gefäße abgefüllt wurden, bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert und dann (ggf. nach dem Auftauen bei Raumtemperatur) in HPLC-Gefäße überführt. Jeweils 20  $\mu\text{L}$  wurden zur HPLC-Analytik injiziert. Pro Serum, Zeitpunkt und Wirkstoff wurden jeweils mindestens 3 Proben hergestellt.

Neben den in **Tabelle 1** genannten HPLC-Bedingungen galten folgende für alle Analysen:

- Autosamplertemperatur:  $10^\circ\text{C}$
- Flussgeschwindigkeit: 1 mL/min
- Säulentemperatur:  $22^\circ\text{C}$
- Volumen der Flusszelle im radiochemischen Detektor: 500  $\mu\text{L}$
- LSC-Cocktail zur radiochemischen Detektion: Ultima-Flo M, zugemischt mit 3 mL/min Flussgeschwindigkeit

**Tabelle 1:** Inkubations- und HPLC-Bedingungen für die Untersuchung des Vergleichs der Aktivität von Frischserum und tiefgefrorenem Serum von Ratten mittels der vier Wirkstoffe

	<b>Sagopilone</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>	<b>PRASL</b>																																																																											
Konzentration im Ansatz [µM]	3	10	0,2	0,2																																																																											
Spezifische Radioaktivität [GBq/mmol]	55	17	832	793																																																																											
HPLC-Säule (siehe 8.6.2)	Kromasil	Hypersil	Spherisorb	HyPURITY ADVANCE																																																																											
HPLC-Eluenten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eluens A: Essigsäure 0,1 % (V/V) (Fa. Merck)</li> <li>• Eluens B: ACN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eluens A: Essigsäure 0,1 % (V/V), pH 7,5, eingestellt mit Ammoniaklösung (Fa. Riedel-de Haën)</li> <li>• Eluens B: Methanol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eluens A: ACN / Wasser 30 % / 70 % + 0,15 % (V/V/V) Essigsäure</li> <li>• Eluens B: ACN / Wasser 70 % / 30 % + 0,15 % (V/V/V) Essigsäure</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eluens A: ACN / Wasser 5 % / 95 % + 0,3 % (V/V/V) Trifluoressigsäure (TFA) (Fa. Merck)</li> <li>• Eluens B: ACN / Wasser 95 % / 5 % (V/V)</li> </ul>																																																																											
HPLC-Gradientenverlauf (Eluens A und B in [% (V/V)])	<table border="1"> <thead> <tr> <th>[min]</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>8</td><td>40</td><td>60</td></tr> <tr><td>20</td><td>40</td><td>60</td></tr> <tr><td>23</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>25</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>27</td><td>80</td><td>20</td></tr> </tbody> </table>	[min]	A	B	0	80	20	8	40	60	20	40	60	23	20	80	25	20	80	27	80	20	<table border="1"> <thead> <tr> <th>[min]</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>75</td><td>25</td></tr> <tr><td>35</td><td>45</td><td>55</td></tr> <tr><td>55</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>58</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>60</td><td>75</td><td>25</td></tr> </tbody> </table>	[min]	A	B	0	75	25	35	45	55	55	0	100	58	0	100	60	75	25	<table border="1"> <thead> <tr> <th>[min]</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>20</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>25</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>35</td><td>100</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	[min]	A	B	0	100	0	20	0	100	25	0	100	35	100	0	<table border="1"> <thead> <tr> <th>[min]</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>8</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>18</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>28</td><td>40</td><td>60</td></tr> <tr><td>30</td><td>40</td><td>60</td></tr> <tr><td>32</td><td>100</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	[min]	A	B	0	100	0	8	60	40	18	60	40	28	40	60	30	40	60	32	100	0
[min]	A	B																																																																													
0	80	20																																																																													
8	40	60																																																																													
20	40	60																																																																													
23	20	80																																																																													
25	20	80																																																																													
27	80	20																																																																													
[min]	A	B																																																																													
0	75	25																																																																													
35	45	55																																																																													
55	0	100																																																																													
58	0	100																																																																													
60	75	25																																																																													
[min]	A	B																																																																													
0	100	0																																																																													
20	0	100																																																																													
25	0	100																																																																													
35	100	0																																																																													
[min]	A	B																																																																													
0	100	0																																																																													
8	60	40																																																																													
18	60	40																																																																													
28	40	60																																																																													
30	40	60																																																																													
32	100	0																																																																													

Die Quantifizierung erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Die relativen Flächenverhältnisse wurden mit Hilfe der bekannten Ausgangsstoffmenge der Wirkstoffe im 100- $\mu$ L-Ansatz in die Stoffmenge (in pmol) umgerechnet und diese Werte gegen die Zeit aufgetragen. Durch nicht-lineare Regression wurde die jeweilige Steigung der Regressionskurve als Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  (in  $\text{min}^{-1}$ ) erhalten. Die nicht-lineare Regression wurde mittels der Gleichung  $f=y_0+a\cdot e^{-b\cdot x}$  ( $R^2\geq 0,990$ ) durchgeführt, wobei  $f$  die Stoffmenge an Wirkstoff und  $a$  und  $y_0$  Regressionsparameter waren sowie  $b$  der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  und  $x$  der Zeit  $t$  entsprachen. Die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  wurden, wie unter 2.2.1 für  $k_{\text{NPA}}$  beschrieben, jeweils aus  $k$  berechnet. Zur Berechnung der Initialgeschwindigkeit  $v_0$  wurde eine lineare Regression der jeweiligen Stoffmenge bei 0 min und des unmittelbar darauf folgenden Inkubationszeitpunkts durchgeführt und die Steigung der erhaltenen Gerade als positiver Wert für  $v_0$  (in  $\mu\text{U}$ ; definiert wie unter 2.2.1, hier bezogen auf den jeweiligen Wirkstoff) angegeben. Der Substratumsatz lag für diesen Inkubationszeitraum stets unter 20 %. Ein Histogramm wurde erstellt, indem die einzelnen Differenzen der Stoffmengen (bezogen auf die jeweilige Ausgangsstoffmenge des Wirkstoffs) zu jedem Zeitpunkt der Inkubation in Frischserum und tiefgefrorenem Serum für alle vier Wirkstoffe ermittelt (sog. relative Differenzen, in %), für acht Klassen der relativen Differenzen von 0-2,5 %, 2,5-5 %, 5-7,5%, 7,5-10 %, 10-12,5 %, 12,5-15 %, 15-17,5 % und 17,5-20 % gezählt und als relative Häufigkeit dargestellt wurden. Es wurde ein gepaarter t-Test (Signifikanzgrenze:  $p<0,05$ ) paarweise mit den Werten der jeweiligen Stoffmengen zu jedem Inkubationszeitpunkt durchgeführt. Alle Angaben zu den einzelnen Stoffmengen,  $v_0$ ,  $k$  und  $t_{1/2}$  bezogen sich auf den Reaktionsansatz (100  $\mu\text{L}$ ).

### 2.3.2 Inkubation von frisch gewonnenem Ratten- und Hundeserum

Zum Vergleich der Aktivität von frisch gewonnenem Ratten- und Hundeserum wurde Serum beider Spezies gewonnen und jeweils mit den vier Wirkstoffen inkubiert (vgl. 2.3.1). Abweichend von der Vorgehensweise nach 2.3.1 wurde MPA in Hundeserum nicht bei 30°C, sondern bei 37°C inkubiert. Die Inkubations- und HPLC-Bedingungen sind der **Tabelle 1** zu entnehmen und die Inkubationszeitpunkte unter 3.2.2 zu finden. Für Rattenserum wurden keine neuen Proben hergestellt, sondern die Ergebnisse (3.2.2) beziehen sich auf die unter 2.3.1 inkubierten Proben. Für Drospirenon erfolgte die Auswertung der Abbaukinetik wie unter 2.3.1 beschrieben. Bei MPA wurde hingegen eine lineare Regression mittels der Gleichung  $f=y_0+a\cdot x$

angewandt, wobei  $f$  die Stoffmenge an MPA und  $y_0$  ein Parameter der Regression waren,  $a$  der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  und  $x$  der Zeit  $t$  entsprachen. Die Initialgeschwindigkeiten  $v_0$  wurden, wie unter 2.3.1 beschrieben, berechnet. Die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  wurden aus  $k$  ermittelt.

## 2.4 Proteinisolierung und –reinigung aus Ratten- und Hundeserum

Zur Isolierung von Fraktionen mit Esteraseaktivität aus Ratten- und Hundeserum wurden drei sequenzielle, klassische Proteintrennungsvorgänge angewandt (Übersicht in 2.1.2). Diese dreistufige Proteintrennung diente daneben auch der Reinigung der Fraktionen mit Esteraseaktivität.

### 2.4.1 Ionenaustauschchromatografie (ion-exchange chromatography, IEC)

Der erste Schritt zur Isolierung der Fraktionen mit Esteraseaktivität aus Serum war eine Ionenaustauschchromatografie. Bei diesem Verfahren werden Proteine auf Grund ihrer elektrischen Ladung unter bestimmten Bedingungen an eine Matrix gebunden, von der sie durch Änderung der Bedingungen (z. B. Erhöhung der Ionenstärke im Fließmittel) eluiert werden können. Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurde DEAE-Sephacel (Fa. GE Healthcare) als Matrix verwendet, ein schwacher Anionenaustauscher auf Cellulosebasis. Bei leicht basischem pH-Wert (hier pH 7,6) ist die Austauscherguppe dieser Matrix, eine 2-(*N,N*-Diethylamino)-ethylgruppe (DEAE), elektrisch positiv geladen und kann Serumproteine, die bei diesem pH-Wert zum großen Teil elektrisch negativ geladen sind [57], binden. Mittels eines Salzgradienten (hier linear von 10 mM Natriumchlorid [NaCl, Fa. Merck] auf 200 mM NaCl, dann auf 500 mM NaCl in einem Schritt zur Reinigung der Matrix) können die gebundenen Proteine von der Matrix getrennt und fraktioniert gesammelt werden (hiesige Chromatografiebedingungen in **Tabelle 2**). Die IEC wurde durch Wasserkühlung der Säule bei 4°C durchgeführt. Der Verlauf jeder Chromatografie wurde mittels eines UV-Detektors bei 280 nm, eines Leitfähigkeitsdetektors und einer pH-Elektrode kontinuierlich beobachtet, aufgezeichnet und mittels des Programms PrimeView (Fa. GE Healthcare) ausgewertet. Die aufgefangenen IEC-Fraktionen wurden, wenn sie unmittelbar danach für weitere Untersuchungen gebraucht wurden, bei 4°C gelagert oder, wenn sie erst später in weiteren Reinigungsstufen verwendet werden sollten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -85°C gelagert.

**Tabelle 2:** Chromatografiebedingungen für die vier Verfahren zur Proteintrennung

	<b>IEC</b>	<b>SEC</b>	<b>Albumin-AC</b>	<b>PON-AC</b>																																																																																																
Säulenmatrix (Volumen; Arbeitstemperatur)	DEAE Sephacel (ca. 25 mL; 4°C)	Sephacryl S-300 HR (ca. 300 mL; 4°C)	Blue Sepharose (HiTrap Blue HP, 5 mL; Raumtemperatur)	Blue Sepharose (HiTrap Blue HP, 5 mL; Raumtemperatur)																																																																																																
Appliziertes Probenvolumen	6 mL Serum verdünnt mit Puffer A auf 75 mL	0,5 mL (in Puffer A)	1,0 mL (in Puffer A)	1 mL Serum verdünnt mit Puffer A auf 2 mL																																																																																																
Eluenten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puffer A: 20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 10 % (V/V) Glycerol (Fa. Merck), pH 7,6</li> <li>• Puffer B: wie A, statt 10 jetzt 200 mM NaCl</li> <li>• Puffer C: wie A, statt 10 jetzt 500 mM NaCl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puffer A: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 % (V/V) Glycerol, pH 7,6</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puffer A: 20 mM Tris-HCl, 10 % (V/V) Glycerol, pH 7,0</li> <li>• Puffer B: wie A, zusätzlich 1,5 M NaCl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puffer A: 20 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, 1 mM Calciumchlorid, 5 µM EDTA, 10 % (V/V) Glycerol, pH 8,0</li> <li>• Puffer B: wie A, ohne NaCl</li> <li>• Puffer C: wie B, zusätzlich 0,1 % (m/V) Natriumdesoxycholat</li> </ul>																																																																																																
Gradientenverlauf (Puffer A – C in [% (V/V/V)])	<table border="1"> <thead> <tr> <th>[mL]</th> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>30,0</td><td colspan="3">Applikation der Probe (75 mL)</td></tr> <tr><td>105,0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>195,0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>695,0</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>807,0</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>807,1</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>907,0</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>907,1</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	[mL]	A	B	C	0,0	100	0	0	30,0	Applikation der Probe (75 mL)			105,0	100	0	0	195,0	100	0	0	695,0	0	100	0	807,0	0	100	0	807,1	0	0	100	907,0	0	0	100	907,1	100	0	0	<table border="1"> <thead> <tr> <th>[mL]</th> <th>A</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,0</td><td>100</td></tr> <tr><td>335,0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	[mL]	A	0,0	100	335,0	100	<table border="1"> <thead> <tr> <th>[mL]</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>60,0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>60,1</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>100,0</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>100,1</td><td>100</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	[mL]	A	B	0	100	0	60,0	100	0	60,1	0	100	100,0	0	100	100,1	100	0	<table border="1"> <thead> <tr> <th>[mL]</th> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>50,0</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>50,1</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>90,0</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>90,1</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>120,0</td><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>120,1</td><td>100</td><td>0</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	[mL]	A	B	C	0,0	100	0	0	50,0	100	0	0	50,1	0	100	0	90,0	0	100	0	90,1	0	0	100	120,0	0	0	100	120,1	100	0	0
[mL]	A	B	C																																																																																																	
0,0	100	0	0																																																																																																	
30,0	Applikation der Probe (75 mL)																																																																																																			
105,0	100	0	0																																																																																																	
195,0	100	0	0																																																																																																	
695,0	0	100	0																																																																																																	
807,0	0	100	0																																																																																																	
807,1	0	0	100																																																																																																	
907,0	0	0	100																																																																																																	
907,1	100	0	0																																																																																																	
[mL]	A																																																																																																			
0,0	100																																																																																																			
335,0	100																																																																																																			
[mL]	A	B																																																																																																		
0	100	0																																																																																																		
60,0	100	0																																																																																																		
60,1	0	100																																																																																																		
100,0	0	100																																																																																																		
100,1	100	0																																																																																																		
[mL]	A	B	C																																																																																																	
0,0	100	0	0																																																																																																	
50,0	100	0	0																																																																																																	
50,1	0	100	0																																																																																																	
90,0	0	100	0																																																																																																	
90,1	0	0	100																																																																																																	
120,0	0	0	100																																																																																																	
120,1	100	0	0																																																																																																	
Fraktionsvolumen [mL]	10,0 (ab Applikation)	5,0 (ab Applikation)	2,0 (ab Applikation)	2,0 (ab Applikation)																																																																																																
Flussgeschwindigkeit [mL/min]	2,0	0,5 oder 0,8	2,0	2,0																																																																																																

### 2.4.2 Größenausschlusschromatografie (size-exclusion chromatography, SEC)

Die Größenausschlusschromatografie (Gelfiltration) nutzt zur Trennung von Proteinen eine Matrix mit einer bestimmten Porengröße. Kleine Proteine wandern mit höherer Wahrscheinlichkeit in diese Poren als größere Proteine. Dadurch werden kleinere Proteine später aus der Matrix eluiert als große Proteine. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde ein kreuzvernetztes Copolymer aus Allyldextran und *N,N'*-Methylenbisacrylamid mit einem relativ großen Trennbereich von 10 bis 1500 kDa eingesetzt (Sephacryl S-300 HR, Fa. GE Healthcare). Für die SEC wurden Proben appliziert, die aus IEC-Fractionen hergestellt wurden. Dazu wurden die IEC-Fractionen mittels Ultrafiltration durch eine gering proteinbindende Membran aus regenerierter Cellulose (Amicon Ultra-15; Ausschlussgrenze: 3 kDa, Fa. Millipore) mit dem Puffer A der SEC gewaschen und auf 0,5 mL konzentriert. Nähere Angaben zur Chromatografie finden sich in **Tabelle 2**. Zur Kalibrierung der SEC-Säule wurde ein Proteinstandard mit fünf Proteinen (molare Masse [kDa]: 670; 158; 44; 17; 1,35) auf die Säule appliziert (Gel Filtration Standard, Fa. Bio-Rad). Das jeweilige Elutionsvolumen wurde gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Masse aufgetragen. Mittels linearer Regression ( $R^2 > 0,999$ ) wurde eine Geradengleichung erhalten, mit deren Hilfe die molaren Massen der Peaks in den Probenchromatogrammen angegeben wurden. Die gewonnenen Fractionen wurden bis zur weiteren Untersuchung bei 4°C gelagert. Die SEC wurde durch Wasserkühlung der Säule bei 4°C durchgeführt.

### 2.4.3 Affinitätschromatografie (affinity chromatography, AC) zur Abtrennung von Albumin (Albumin-AC)

Zur Abtrennung von Albumin aus den SEC-Fractionen wurde eine Affinitätschromatografie an einer Sepharose-Matrix durchgeführt, an die der Farbstoff Cibacron Blue F3G-A kovalent gebunden ist (HiTrap Blue HP, Fa. GE Healthcare). Durch die hohe Affinität bestimmter Proteine (z. B. Albumin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin [ $\alpha_2$ M]) zu dem Farbstoff können diese Proteine aus einem Proteingemisch abgetrennt werden. Dadurch werden einerseits die an die Matrix gebundenen Proteine angereichert und andererseits die nicht gebundenen Proteine abgetrennt. Die gebundenen Proteine können durch einen Salzgradienten von der Matrix (hier von 0 auf 1,5 M NaCl in einem Schritt) eluiert werden. Als Proben zur Applikation

wurden SEC-Fractionen mittels Ultrafiltration mit dem Puffer A der Albumin-AC gewaschen (vgl. 2.4.2) und auf 1,0 mL konzentriert. Die Chromatografiebedingungen sind im Detail in **Tabelle 2** aufgeführt. Die erhaltenen Fractionen wurden bei 4°C gelagert. Die Albumin-AC wurde bei Raumtempertur durchgeführt.

#### **2.4.4 Affinitätschromatografie (AC) zur Isolierung von Paraoxonase (PON)-haltigen Fractionen (PON-AC)**

Zur Isolierung von Paraoxonase- (PON-)haltigen Fractionen aus Serum wurde dieselbe Matrix wie zur Abtrennung von Albumin (2.4.3) verwendet. Allerdings wurden die Chromatografiebedingungen, insbesondere die Eluenten, verändert (**Tabelle 2**). Es wurde Serum (verdünnt in Puffer A der PON-AC) ohne vorherige Reinigungsschritte direkt appliziert. Durch einen initial sehr hohen Salzgehalt (2 M NaCl) ist es möglich, PON an die Blue-Sepharose-Matrix zu binden, während Albumin unter diesen Bedingungen nicht bindet. Durch anschließendes NaCl-freies Waschen der Matrix und Elution mit einem anionischen Detergens (hier 0,1 % [m/V] Natriumdesoxycholat, Fa. Alfa-Aesar) kann PON eluiert werden. Die gewonnenen Fractionen wurden bei 4°C gelagert. Die PON-AC wurde bei Raumtempertur durchgeführt.

#### **2.4.5 Kinetischer Assay der isolierten Fractionen mit *p*-Nitrophenylacetat (NPA)**

Um zu entscheiden, ob die gewonnenen Fractionen aus der IEC, SEC und Albumin-AC weiter untersucht werden sollten, d. h. ob sie Esteraseaktivität aufwiesen, wurde ein kinetischer Assay mit NPA als unspezifischem Esterasesubstrat durchgeführt. Bei einem kinetischen Assay wird zeitabhängig die enzymatische Reaktion verfolgt, hier an Hand der Absorption des während der Reaktion frei werdenden *p*-Nitrophenolats. Dazu wurde in Reaktionslösungen, die sich in Mikrowell-Titerplatten (Fa. Nunc) befanden, die Absorption bei 405 nm über 3 min (im 15-s-Intervall, d. h. 13 Messzeitpunkte) bei 30°C mittels des Spektrophotometers SpectraMax 190 (Fa. Molecular Devices) gemessen. Es wurden jeweils 200 µL jeder Fraction der einzelnen Reinigungsstufen in eine Mikrowell-Titerplatte pipettiert, jeweils 10 µL einer methanolischen NPA-Lösung (50 mM) hinzugegeben und die Messung gestartet. Jede Fraction wurde mindestens zweimal vermessen. Die Auswertung mittels der Software SoftMax Pro (Fa. Molecular Devices) erfolgte durch Berechnung der

Steigung einer linearen Regression der Absorptionswerte für eine Probe. Als Ergebnis wurde die maximale Steigung ( $S_{\max}$  in mAU/min) angegeben, d. i. der größte aller Werte für die Steigung zwischen den Absorptionswerten des ersten, dann zweiten, dritten Messzeitpunkts usw. über alle dazwischen liegenden Messzeitpunkte bis zum letzten Messzeitpunkt. Nullproben mit 200  $\mu$ L der entsprechenden Puffer der einzelnen Trennungsverfahren statt 200  $\mu$ L der Fraktionen wurden zur Abschätzung der nicht-enzymatischen Hydrolyse gemessen. Das Eluens der jeweiligen Proteintrennung mit der höchsten Aktivität wurde für diese Trennung als Nullprobe festgelegt. Lagen die  $S_{\max}$ -Werte der Proben höher als die Werte der Nullproben, wurden diese Fraktionen hinsichtlich ihrer Reinheit gemäß 2.4.6 überprüft, ihre Aktivität bezüglich der vier Wirkstoffe gemäß 2.4.7 bestimmt und für die nächste Reinigungsstufe vorbereitet (siehe 2.4.2 und 2.4.3).

#### **2.4.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese- (PAGE-)Techniken zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Fraktionen**

Zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen Fraktionen, die ausreichend hohe Aktivität im kinetischen Assay mit NPA (2.4.5) gezeigt hatten, wurden sowohl eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter proteindenaturierenden Bedingungen mittels Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) als auch eine nicht-proteindenaturierende (native) PAGE durchgeführt. Hintergrund für die Anwendung von zwei PAGE-Techniken war eine zu erwartende, unterschiedliche Trennung von Proteinen, deren Ergebnis beim qualitativen Poolen (2.4.7 und 3.3.3) half.

##### **2.4.6.1 Sodium dodecyl sulfate- (SDS-)PAGE**

Die hier eingesetzte SDS-PAGE wurde unter Verwendung von fertigen Polyacrylamid-Gelen ausgeführt, die mit Bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan)-Hydrochlorid (Bis-Tris-HCl) gepuffert waren. Es wurden Gele mit einem Gradienten von 4-12 % Acrylamid eingesetzt (NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel; Fa. Invitrogen). Als Laufpuffer wurde eine SDS- und 3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure- (MOPS-) haltige Lösung eingesetzt (NuPAGE SDS Running Buffer, Fa. Invitrogen). Probenpuffer war eine Lithiumlaurylsulfat- (*lithium dodecyl sulfate*, LDS-)haltige Pufferlösung (NuPAGE LDS Sample Buffer, Fa. Invitrogen). Des Weiteren wurden alle SDS-PAGE-Analysen unter reduktiven Bedingungen

ausgeführt. Dazu wurde dem Kathodenpuffer ein Antioxidans zugesetzt (NuPAGE Antioxidant, Fa. Invitrogen). Entsprechend der Herstelleranweisung wurden die Laufpuffer hergestellt und die Elektrophorese durchgeführt [58]. Zur Herstellung der Proben wurden 400  $\mu\text{L}$  und danach 300  $\mu\text{L}$  der Fraktionen durch eine Membran aus wenig proteinbindender, regenerierter Cellulose (Amicon Ultrafree-MC; Ausschlussgrenze: 5 kDa, Fa. Millipore) bei 4°C ultrafiltriert und anschließend mit 200  $\mu\text{L}$  Wasser gewaschen. 40  $\mu\text{L}$  des Retentats wurden mit 25  $\mu\text{L}$  Wasser, 25  $\mu\text{L}$  des LDS-Probenpuffers (NuPAGE LDS Sample Buffer) und 10  $\mu\text{L}$  eines Reduktionsmittels (NuPAGE Sample Reducing Agent, Fa. Invitrogen) versetzt, gemischt und bei 70°C für 10 min erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurden jeweils 25  $\mu\text{L}$  pro Gelspur mit geeigneten Pipettenspitzen aufgetragen. Pro Gel wurden außer den Proben zwei Spuren mit je 10  $\mu\text{L}$  eines Proteinstandards aufgetragen (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Fa. Invitrogen). Außerdem wurde in einer Spur 25  $\mu\text{L}$  einer Serumprobe aufgetragen. Dazu wurden 167  $\mu\text{L}$  Serum mit Wasser auf 1 mL verdünnt, 25  $\mu\text{L}$  dieser Lösung mit 40  $\mu\text{L}$  Wasser, 25  $\mu\text{L}$  LDS-Probenpuffer und 10  $\mu\text{L}$  Reduktionsmittel versetzt, erhitzt und appliziert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mittels einer Coomassie-G-250-haltigen Lösung (Colloidal Blue Stain Kit, Fa. Invitrogen) nach Herstelleranweisung gefärbt und visuell ausgewertet [59]. Die relativen molaren Massen der Proteinbanden der Proben wurden mittels der Geradengleichung aus einer linearen Regression ( $R^2 > 0,970$ ) berechnet. Zur linearen Regression wurden die  $R_f$ -Werte (d. i. der Abstand einer Proteinbande zum Start im Verhältnis zur Gesamtlaufstrecke des Gels) der Banden des Proteinstandards gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Masse der Proteine dieses Standards aufgetragen (jeweils in kDa: 191; 97; 64; 51; 39; 28; 19; 14).

#### **2.4.6.2 Native (nicht denaturierende) PAGE**

Die native PAGE wurde mittels fertigen Polyacrylamid-Gelen ausgeführt, die einen Gradienten von 8 bis 16 % Acrylamid aufwiesen und mit Tris-HCl gepuffert waren (Novex 8-16 % Tris-Glycine Gel; Fa. Invitrogen). Der Laufpuffer enthielt Tris und Glycin (Novex Tris-Glycine Native Running Buffer, Fa. Invitrogen). Entsprechend der Herstelleranweisung wurde der Laufpuffer hergestellt und die Elektrophorese ausgeführt [60]. Zur Probenherstellung wurden 15  $\mu\text{L}$  des unter 2.4.6.1 gewonnenen Retentats mit 15  $\mu\text{L}$  des Probenpuffers (Novex Tris-Glycine Native Sample Buffer, Fa. Invitrogen) versetzt und gemischt. 25  $\mu\text{L}$  wurden davon jeweils auf das Gel

aufgetragen. Daneben wurden je 10 µL eines Proteinstandards in zwei Spuren pro Gel appliziert (NativeMark Unstained Protein Standard, Fa. Invitrogen). Der Standard enthielt Proteine mit folgenden Molmassen [kDa]: 1236; 1048; 720; 480; 242; 146; 66; 20. Zusätzlich wurde 25 µL einer Serumprobe aufgetragen. Dazu wurden 167 µL Serum mit Wasser auf 1 mL verdünnt, 10 µL dieser Lösung mit 5 µL Wasser und 15 µL Probenpuffer versetzt und appliziert. Die Detektion der Proteine im Gel erfolgte wie unter 2.4.6.1 beschrieben.

#### **2.4.7 Endpunkt-Assay der isolierten Fraktionen mit den vier Wirkstoffen**

Die Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte, die im kinetischen Assay mit NPA (2.4.5) aktiv waren, wurden mittels Vergleich der qualitativen Übereinstimmung ihrer Proteinbanden in der SDS-PAGE (2.4.6.1) und nativen PAGE (2.4.6.2) gepoolt (sog. qualitatives Poolen). Dazu wurden Fraktionen, deren Banden bezüglich ihrer Intensität im Verhältnis zu den Banden benachbarter Fraktionen und im Verhältnis zu den Banden innerhalb einer Fraktion vergleichbar waren, mittels Ultrafiltration (2.4.2) mit einer Pufferlösung (aus 100 mM Tris-HCl und 10 mM Calciumchlorid, pH 7,4) auf 0,3 mL konzentriert. Anschließend wurde mit diesem Konzentrat der Assay mit jeweils einem der vier Wirkstoffe, wie unter 2.3.1 und in **Tabelle 1** beschrieben, durchgeführt. Alle Proben wurden bei  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  inkubiert. Es wurden pro Wirkstoff und Fraktionspool zwei oder drei Zeitpunkte für den Assay verwendet (der erste Zeitpunkt war stets 0 min; siehe 3.3.4). Die erhaltenen relativen radioaktiven Flächen wurden mittels der bekannten Ausgangsstoffmenge der Wirkstoffe in den 100-µL-Ansätzen in Stoffmengen (in pmol) umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Es wurde eine lineare Regression zwischen den Werten des ersten über den zweiten bis zum dritten Zeitpunkt durchgeführt (sofern drei Werte vorlagen), anschließend eine lineare Regression der Werte vom zweiten zum dritten Zeitpunkt (analog zum Vorgehen nach 2.4.5). Als maximale Aktivität wurde die jeweils größere Steigung dieser beiden Regressionen definiert (in pmol/min). Auf Grund der z. T. relativ geringen Aktivität und der damit verbundenen Notwendigkeit der starken Aufkonzentrierung der Fraktionen war eine größere Anzahl von Inkubationszeitpunkten nicht möglich. Ebenso war eine Bestimmung der Initialgeschwindigkeit, die sonst für enzymatische Assays üblicherweise durchgeführt wird, hier wegen der geringen Probenmenge (0,3 mL) wenig sinnvoll, weil dazu mehrere Vorversuche zur Abschätzung geeigneter Inkubationsbedingungen

notwendig gewesen wären. Als weiteres Ergebnis der Wirkstoff-Assays wurde die spezifische Aktivität angegeben (in pmol/[min·mg] oder pmol/[h·mg]), die durch Division der maximalen Aktivität des jeweiligen Fraktionspools durch die nach 2.4.8 ermittelte Proteinmenge dieses Pools erhalten wurde. Als Anreicherung (an Aktivität; engl. *purification factor*) wurde das Verhältnis zwischen der spezifischen Aktivität des jeweiligen Fraktionspools zur spezifischen Aktivität des Serums bezeichnet. Die Ausbeute (an Aktivität, in %) gab den prozentualen Anteil der maximalen Aktivität des jeweiligen Fraktionspools an der maximalen Aktivität des Serums wieder. Dazu wurde die maximale Aktivität des 100- $\mu$ L-Ansatzes auf das Gesamtvolumen des Fraktionspools (bezogen auf den jeweiligen Trennschritt) hochgerechnet und dann als Anteil an der maximalen Aktivität des Gesamtvolumens des Serums angegeben. Alle Angaben zur maximalen Aktivität und Proteinmasse bezogen sich auf den 100- $\mu$ L-Ansatz eines Wirkstoff-Assays. Die Angaben zur spezifischen Aktivität, Anreicherung und Ausbeute bezogen sich auf das Gesamtvolumen des Serums oder des Fraktionspools der jeweiligen Trennstufe.

#### **2.4.8 Proteingehaltsbestimmung mittels Bicinchoninsäure- (*bicinchoninic acid*, BCA-)Assay**

Die Bestimmung der Proteinmenge in den Fraktionen der einzelnen Reinigungsstufen und in Serum wurde mit Hilfe des Bicinchoninsäure- (*bicinchoninic acid*, BCA-)Assays durchgeführt. Dieser basiert auf der Reduktion von Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung und anschließender Komplexierung der gebildeten Kupfer(I)-Ionen durch Bicinchoninsäure, wobei dieser Komplex bei 562 nm photometrisch vermessen werden kann [61]. Die Herstellung der Reagentien erfolgte in allen Assays nach Herstelleranweisung [62,63]. Für die IEC-Fraktionen wurden jeweils 10  $\mu$ L der Fraktionen mit 200  $\mu$ L der BCA-Arbeitslösung (hergestellt aus BCA Protein Assay Reagent A und B, Fa. Thermo Scientific) in einer Mikrotiterplatte versetzt. Als Standard wurden Lösungen von Rinderserumalbumin (Albumin Standard, Fa. Thermo Scientific) in folgenden Konzentrationen inkubiert (in  $\mu$ g/mL): 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25. Weiterhin wurden Serum in einer Verdünnung von 1:100 als Positivkontrolle und Wasser als Negativkontrolle inkubiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C unter leichtem Schütteln (Schüttelinkubator) erfolgte die Messung bei 562 nm in einem Plattenleser (Tecan Genios Basic, Fa. Tecan), die dann mittels des

Programms Magellan (Fa. Tecan) ausgewertet wurde. Es wurde eine Kalibriergerade ( $R^2 > 0,997$ ) aus den Absorptionwerten der Albuminstandardlösungen und ihrer Konzentration erstellt. Diese Kalibrierung wurde für die Berechnung der Proteinmenge in den Proben der Fraktionen herangezogen. Auf Grund der wesentlich geringeren Proteinmengen war für die SEC- und AC-Fraktionen ein Assay mit höherer Sensitivität und kleinerer Bestimmungsgrenze erforderlich (Micro BCA Protein Assay Kit, Fa. Thermo Scientific). Hierfür wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  der Fraktionen mit 100  $\mu\text{L}$  der Micro-BCA-Arbeitslösung (hergestellt aus Micro BCA Reagent A, B und C, Fa. Thermo Scientific) in einer Mikrotiterplatte versetzt. Folgende Lösungen von Rinderserumalbumin wurden inkubiert (in  $\mu\text{g/mL}$ ): 200; 100; 40; 20; 10; 5; 1. Als Positivkontrolle wurde Serum in einer Verdünnung von 1:1000 und als Negativkontrolle Wasser inkubiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Schüttelinkubator wurde die Mikrotiterplatte vermessen, die Kalibriergerade erstellt ( $R^2 > 0,999$ ) und die Proteinmenge der Fraktionen berechnet. Alle Proben wurden doppelt hergestellt. Bezogen auf die Fraktionspools nach 2.4.7 wurde für jede Fraktion die ermittelte Proteinkonzentration mit dem Fraktionsvolumen (siehe **Tabelle 2**) multipliziert und die Summe der Proteinmenge in den Fraktionen eines Pools durch das Konzentratvolumen dividiert. Diese Proteinkonzentration wurde dann mit 100  $\mu\text{L}$  multipliziert, um die Proteinmenge pro Ansatz (im Wirkstoff-Assay; siehe 2.4.7) zu erhalten. Die Proteinmenge dieses Fraktionspools im 100- $\mu\text{L}$ -Ansatz fand dann Eingang in die Berechnung der spezifischen Aktivität nach 2.4.7.

#### 2.4.9 Bestimmung von $K_m$ - und $V_{max}$ -Werten

Zur Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte der isolierten, für Sagopione, Drospirenon und MPA aktiven Fraktionen aus Rattenserum (2.4.7) wurden für die Inkubation die Albumin-AC-Fraktionen mit der höchsten Anreicherung bzw. Ausbeute an Aktivität ausgesucht. Um ausreichend Probenvolumen für diese Untersuchung zu gewinnen, wurden jeweils zwei Fraktionspools pro Wirkstoff aus der Albumin-AC mittels Ultrafiltration auf 2,0 mL konzentriert (siehe 2.4.7). Für Sagopione wurde dieses Konzentrat wieder zu 1:2 (V/V) verdünnt, da die Aktivität zu hoch war. Für PRASL war die benötigte Menge an isolierten, aktiven Fraktionen aus der PON-AC praktisch nicht zu decken. Daher wurden der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wert für PRASL in unfraktioniertem Rattenserum bestimmt. Die Inkubation und Analyse der Proben erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Alle Assays wurden bei  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  ausgeführt. Für jeden

Wirkstoff wurden mehrere Konzentrationen in den für diesen Wirkstoff aktiven Fraktionen bzw. (für PRASL) in Rattenserum inkubiert. Pro Wirkstoff, Zeitpunkt und Konzentration wurde jede Probe einmal hergestellt. In **Tabelle 3** sind die verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe in den 100- $\mu$ L-Ansätzen, deren spezifische Radioaktivität sowie die Inkubationszeitpunkte wiedergegeben.

**Tabelle 3:** Inkubationsbedingungen für die Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte der isolierten Fraktionen aus Rattenserum für Sagopilone, Drospirenon, MPA und von unfraktioniertem Rattenserum für PRASL. Sternchen (\*, \*\*, \*\*\*) verweisen auf unterschiedliche Inkubationszeitpunkte (siehe letzte Tabellenzeile).

	<b>Sagopilone</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>	<b>PRASL</b>
Konzentration	0,1 (1159)	0,1 (961) *	1 (83)	5 (83)
[ $\mu$ M] (spezifische	0,3 (580)	1 (107) *	5 (83)	15 (83)
Radioaktivität	0,5 (580)	10 (17) **	7 (83)	30 (83)
[GBq/mmol])	1,0 (580)	20 (17) ***	10 (55)	60 (83)
	1,5 (55)	40 (17) ***	12 (55)	80 (83)
	2,0 (55)	60 (1) ***	15 (55)	100 (83)
	2,5 (55)	80 (1) ***	18 (55)	200 (82)
	3,0 (55)	100 (1) ***	20 (55)	300 (82)
	3,5 (55)	120 (1) ***	25 (55)	400 (82)
	4,0 (55)	150 (1) ***		500 (81)
	5,0 (55)			
	6,0 (55)			
	7,0 (55)			
	8,0 (55)			
	9,0 (55)			
	10,0 (55)			
Inkubations- zeitpunkte [min]	0; 0,5; 1	* 0; 5 ** 0; 10 *** 0; 60	0; 1	0; 30

Die Auswertung erfolgte an Hand der relativen radioaktiven Flächen. Diese wurden mit Hilfe der bekannten Ausgangsstoffmenge der Wirkstoffe in die Stoffmenge (bezogen auf einen Ansatz von 100  $\mu$ L) umgerechnet. Die jeweilige Differenz der

Stoffmengen zwischen 0 min und dem zweiten Inkubationszeitpunkt wurde durch den Inkubationszeitraum und die Proteinmenge im Ansatz dividiert, um die spezifische Aktivität (in pmol/[min·mg]) zu erhalten. Bei Sagopilone wurde die jeweils größere Differenz der Stoffmengen zwischen 0 min und dem zweiten Inkubationszeitpunkt und zwischen dem zweiten und dritten Inkubationszeitpunkt zur Berechnung der spezifischen Aktivität herangezogen. Es wurden nur solche Inkubationszeitpunkte berücksichtigt, bei denen der Substratumsatz unter 20 % lag. Die als Initialgeschwindigkeit  $v_0$  bezeichneten spezifischen Aktivitäten wurden gegen die einzelnen Konzentrationen für jeden Wirkstoff aufgetragen (Michaelis-Menten-Diagramm). Mittels nicht-linearer Regression ( $R^2 \geq 0,592$ ) mit der Gleichung  $f = (a \cdot x) / (b + x)$ , die formal der Michaelis-Menten-Gleichung entsprach, wurden die Parameter  $a$  als  $V_{\max}$ -Wert (in pmol/[min·mg]) und  $b$  als  $K_m$ -Wert (in  $\mu\text{M}$ ) erhalten. Die Größe  $f$  entsprach  $v_0$  (in pmol/[min·mg]) und  $x$  stand für die Substratkonzentration (in  $\mu\text{M}$ ). Für Sagopilone und MPA war eine Wichtung der Regression notwendig. Dazu wurde ein sog. Wichtungsfaktor (*weight variable*) zur Regression verwendet, der mit  $1/y^2$  festgelegt wurde.

## 2.5 Proteinidentifizierung aus SDS-PAGE-Gelen

### 2.5.1 Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) – time of flight (TOF) – mass spectrometry (MS)

Zur Untersuchung der isolierten, für Sagopilone und PRASL aktiven Fraktionen aus Rattenserum (2.4.7) wurden die Proteine dieser Fraktionen mittels SDS-PAGE getrennt, mit Coomassie G-250 gefärbt (2.4.6.1) und die am stärksten gefärbten Banden ausgeschnitten. Die zerkleinerten Gelbanden wurden in *polymerase chain reaction*- (PCR-)Gefäße überführt. Es wurde ein Verdau-Puffer (Lösung von 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat [Fa. Sigma-Aldrich] in Wasser) hergestellt. Die Gelstücke wurden mit 25  $\mu\text{L}$  einer Mischung von ACN und Verdau-Puffer (50 % / 50 % [V/V]) bei 70°C für 20 min inkubiert. Danach wurde die Lösung wieder entfernt, die Gelstücke mit 25  $\mu\text{L}$  Verdau-Puffer versetzt und wiederum bei 70°C für 20 min inkubiert. Diese Waschprozedur wurde solange wiederholt, bis die Gelstücke vollständig entfärbt waren. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Waschlösung entfernt, die Gelstücke mit 50  $\mu\text{L}$  ACN versetzt und bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sie weiß waren. Nach Abdampfen des restlichen ACN aus den Gelstücken wurden diese, je nach Farbintensität, mit 10 bis 20  $\mu\text{L}$  einer

Trypsinlösung (d. i. 10 ng/ $\mu$ L Trypsin [Fa. Promega] in Verdau-Puffer) versetzt. Nach 15 min wurden 10 bis 30  $\mu$ L Verdau-Puffer zugegeben, so dass die Gelstücke bedeckt waren, und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Der tryptische Verdau wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ L 2 % (V/V) TFA (Fa. Sigma-Aldrich) gestoppt. Die Gelstücke wurden jeweils in ein neues PCR-Gefäß überführt, mit 10 bis 30  $\mu$ L eines Extraktionspuffers (39,9 % Wasser / 60 % ACN / 0,1 % TFA [V/V/V]) versetzt und bei 60°C für 20 min inkubiert. Danach wurden die Gelstücke mit 20  $\mu$ L ACN bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Die Überstände aus der gestoppten Verdauprobe, der extrahierten Probe und der mit ACN inkubierten Probe wurden jeweils abgenommen und vereinigt. Diese Lösungen wurden mittels Vakuumzentrifugation getrocknet. Die getrockneten Rückstände wurden in 10  $\mu$ L 0,1 % (V/V) TFA aufgenommen. Zur Vorbereitung der MALDI-TOF-MS-Analyse wurden ZipTips (Fa. Millipore) durch zweimaliges Waschen mit je 10  $\mu$ L ACN, dann je 10  $\mu$ L einer Mischung von 49,9 % Wasser / 50 % ACN / 0,1 % TFA (V/V/V) und abschließend je 10  $\mu$ L 0,1 % (V/V) TFA konditioniert. Danach wurden mittels 20 Ansaug-/Dispensierschritten die in TFA gelösten Peptide an die konditionierten ZipTips gebunden. Nach fünfmaligem Waschen der ZipTips mit je 10  $\mu$ L 0,1 % (V/V) TFA wurden die Peptide mit 1  $\mu$ L einer MALDI-Matrix-Lösung (5 mg  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure [Fa. LaserBio Labs], gelöst in 1300  $\mu$ L einer Mischung von 49,9 % Wasser / 50 % ACN / 0,1 % TFA [V/V/V]) direkt auf geeignete Stahlplatten dispensiert. Die Analyse mittels MALDI-TOF-MS-Technik (siehe 8.6.2) erfolgte nach kurzem Trocknen der Probe. Die Peptide wurden an Hand der gemessenen MS- und MS/MS-Spektren durch Suche mit der Software Mascot (Fa. Matrix Science) in der jeweils aktuellen Version der Proteindatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, USA) identifiziert. Wichtige Ergebnisse und dazugehörige, relevante Gütekriterien wurden angegeben (siehe 3.4.1.1).

### **2.5.2 Liquid chromatography (LC) – electrospray ionization (ESI) – mass spectrometry (MS)**

Die für MPA aktiven Fraktionen aus Hundeserum (2.4.7) wurden mittels SDS-PAGE getrennt, die Proteine gefärbt (2.4.6.1) und die am intensivsten gefärbten Banden ausgeschnitten. Die Gelbanden wurden zerkleinert und die Stücke in eine PCR-Mikrotiterplatte (mit Löchern im Boden) überführt. Nach Zusatz von 50  $\mu$ L einer Mischung von ACN und Verdau-Puffer (siehe 2.5.1; 50 % / 50 % [V/V]) wurde die

Mikrotiterplatte versiegelt und bei 60°C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch Vakuumzentrifugation entfernt, 50 µL Verdau-Puffer zugegeben und wiederum bei 60°C für 20 min inkubiert. Nach Vakuumzentrifugation wurden diese Waschschriffe solange wiederholt, bis die Gelstücke komplett entfärbt waren. Nach dem letzten Waschschriff wurde die Waschlösung entfernt, die Gelstücke mit 50 µL ACN versetzt, versiegelt und bei Raumtemperatur für etwa 10 min stehen gelassen, bis sie weiß waren. Durch Vakuumzentrifugation und Abdampfen wurde das restliche ACN entfernt. Anschließend wurden die Gelstücke mit 10 bis 20 µL Trypsinlösung (siehe 2.5.1) versetzt, 10 min stehen gelassen, versiegelt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurden je etwa 30 µL Verdau-Puffer zugegeben, so dass die Gelstücke bedeckt waren, und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Verdauung wurde in eine neue PCR-Platte (ohne Löcher im Boden) zentrifugiert.

Der Stopp der Verdauung und die Extraktion erfolgten wie unter 2.5.1. Die jeweiligen Überstände wurden vereinigt und durch Vakuumzentrifugation getrocknet. Die Rückstände wurden in je 10 µL 0,1 % (V/V) TFA aufgenommen. Je 10 µL wurden zur Analyse mittels LC-ESI-MS-Technik (siehe 8.6.2) injiziert. Für die LC wurden folgende Eluenten und Gradienten verwendet:

- Eluens A: 0,1 % (V/V) Ameisensäure
- Eluens B: ACN / Wasser / Ameisensäure 95 % / 5 % / 0,1 % (V/V/V)
- Typischer Gradientenverlauf (in % [V/V]):
  - 0 – 5 min: Eluens A / Eluens B 95 / 5
  - 5 – 30 min: Eluens A / Eluens B 95 / 5 → 60 / 40
  - Spülen der Säule mit Eluens A / Eluens B >60 / <40
  - Rekonstituieren der Startbedingungen (Eluens A / Eluens B 95 / 5)

Die Auswertung erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben.

### **2.5.3 Western Immunoblotting (Western Blot)**

Zum direkten Nachweis der PON in den isolierten, für Drospirenon, MPA und PRASL aktiven PON-AC-Fraktionen aus Ratten- bzw. Hundeserum (2.4.7) wurden diese Fraktionen mittels SDS-PAGE getrennt (2.4.6.1) und das Gel anschließend durch einen Western Immunoblot (Western Blot) analysiert. Dazu wurde das Gel nach der SDS-PAGE (ohne Färbung) auf eine Nitrocellulose-Membran (iBlot Gel Transfer Stacks, Fa. Invitrogen) mittels Blotting gemäß Herstelleranweisung transferiert [64]. Anschließend wurde die Membran in ca. 20 mL eines Blockier-Puffers (d. i. eine

Lösung aus 5 % [m/V] Rinderserumalbumin in 0,05 M *Tris buffered saline* [TBS] und 0,05 % [m/V] Tween 20 [alle von Fa. Sigma-Aldrich]) bei 4°C über Nacht geschüttelt. Danach wurde der Blockier-Puffer entfernt. Der primäre Antikörper, ein Anti-Paraoxonase 1 (Anti-PON1)-Antikörper, produziert im Kaninchen (Fa. Sigma-Aldrich), wurde in 15 mL Blockierpuffer in einer Verdünnung von 1:1000 (V/V) gelöst, diese Lösung auf der Membran verteilt und bei Raumtemperatur für 1,5 h geschüttelt. Dann wurde diese Lösung entfernt und die Membran dreimal jeweils mit 20 mL Blockier-Puffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper, ein Anti-Kaninchen-Immunglobulin G-Antikörper, produziert in der Ziege (Fa. Sigma-Aldrich), wurde in 15 mL Blockier-Puffer in einer Verdünnung von 1:3000 (V/V) gelöst, auf der Membran verteilt und bei Raumtemperatur für 1,5 h geschüttelt. Diese Lösung wurde danach entfernt und die Membran fünfmal mit je 20 mL einer Lösung aus 0,05 M TBS und 0,05 % (m/V) Tween 20 (TTBS-Lösung) bei Raumtemperatur für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend wurde eine Fertiglösung von Nitrotetrazolblau und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (Premixed BCIP/NBT Solution, Fa. Sigma-Aldrich) zur Membran gegeben. Bei Raumtemperatur wurden PON1-haltige Proteinbanden durch eine Violettfärbung nach wenigen Minuten visuell detektiert. Als Negativkontrollen wurden in der SDS-PAGE Lösungen von AChE, BChE und Schweineleber-Esterase (alle von Fa. Sigma-Aldrich) sowie proteinfreier Probenpuffer aufgetragen. Dazu wurden 5 mg der jeweiligen Esterase in 1 mL Wasser gelöst, 25 µL dieser Lösung mit 40 µL Wasser, 25 µL des LDS-Probenpuffers (2.4.6.1) und 10 µL Reduktionsmittels versetzt, erhitzt und jeweils 25 µL appliziert. Als proteinfreier Probenpuffer wurden 65 µL Wasser, 25 µL des LDS-Probenpuffers mit 10 µL Reduktionsmittel gemischt, erhitzt und 25 µL davon aufgetragen. Hundeserum diente als Positivkontrolle (siehe 2.4.6.1).

## **2.6 Inkubation von isolierten Fraktionen und von unfraktioniertem Serum mit Inhibitoren**

### **2.6.1 Kriterien für die Auswahl von Inhibitoren**

Um die Beteiligung der identifizierten Esterasen an der Spaltung der vier Wirkstoffe in Serum zu bestätigen und zugleich potente Inhibitoren für den Einsatz in Serum zu finden, wurden Konzentrate aus Fraktionen, unfraktioniertes Ratten- oder Hundeserum mit den vier Wirkstoffen und ausgesuchten Protease-, Esterase- und unspezifischen Enzyminhibitoren inkubiert (sog. Inhibitorscreening; siehe 2.6.2). Die

Auswahl geeigneter Inhibitoren richtete sich in erster Linie nach Erfordernissen für ihren etwaigen zukünftigen Einsatz zur Stabilisierung von Serumproben in der Praxis. Folgende Kriterien wurden zur Inhibitorauswahl für das hier durchgeführte Screening herangezogen:

- Wasserlöslichkeit: mindestens 10 mM in Wasser oder Pufferlösung
- Stabilität der Inhibitorlösung sowie des Inhibitors in Serum bzw. in den konzentrierten Albumin-AC-Fractionen aus Rattenserum (2.6.2)
- Inhibitionseigenschaften:
  - möglichst irreversible Inhibition
  - als CE- oder PON-Inhibitor bereits beschrieben
  - breites Inhibitionsspektrum (mehrere Katalyseklassen bzw. breites Spektrum innerhalb einer Katalyseklasse)
- Toxizität:
  - Akzeptabel: Substanzen mit den Gefahrensymbolen Xi (reizend), Xn (gesundheitsschädlich), C (ätzend), N (umweltgefährlich), B (*Biohazard*)
  - *Nicht* akzeptabel: T (giftig), T+ (sehr giftig), F (leichtentzündlich), F+ (hochentzündlich), O (brandfördernd)
- Preis für eine Verkaufseinheit (mindestens 5 mg): höchstens ca. 100 €

Eine Übersicht über alle eingesetzten Inhibitoren und ihre Eigenschaften, die den Einsatz im Screening rechtfertigen, ist in **Tabelle 4** dargestellt. Die Zusammenstellung erfolgte mit Hilfe von Herstellerangaben [65,66] und sonstigen Literaturangaben (siehe Beispiele in **Tabelle 4** in eckigen Klammern) und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

**Tabelle 4:** Relevante Eigenschaften von Inhibitoren, die im Inhibitorscreening (2.6.2) eingesetzt wurden. Sternchen (\*, \*\*, \*\*\*) und Fußnoten: siehe Anmerkungen am Tabellenende.

Inhibitor	Löslichkeit (Lösungsmittel)	Stabilität der Lösung	Inhibitionseigenschaften	Toxizität
$\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor ( $\alpha_1$ -Antitrypsin) <sup>1</sup>	Ca. 0,1 mM (Wasser) *	Lösungen bei -70°C bis zu 6 Monate stabil	Reversible Inhibition von Serinproteasen	B
<i>N</i> -( $\alpha$ -Rhamnopyranosyloxyhydroxyphosphinyl)-L-leucyl-L-tryptophan, Dinatriumsalz (Phosphoramidon, Dinatriumsalz) <sup>2</sup>	Ca. 17 mM (Wasser)	Lösungen bei -20°C 1 Monat stabil	Metalloprotease-Inhibitor	k. A. **
4-(2-Aminoethyl)-benzen-sulfonylfluorid-Hydrochlorid (AEBSF; Pefabloc® SC) <sup>2</sup>	Ca. 800 mM (Wasser)	Lösungen bei 4°C oder -20°C und pH<7 bis zu 6 Monate stabil	Irreversible Inhibition von Serinproteasen, auch Inhibition von Cysteinproteasen	C
4-Amidinophenylmethan-sulfonylfluorid-Hydrochlorid (APMSF) <sup>1</sup>	50 mM (Wasser)	Lösungen bei -20°C stabil	Irreversible Inhibition von Serinproteasen	Xn
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) <sup>3</sup>	In Wasser löslich, ca. 5 mM (Phosphatpuffer)	5-mM-Lösung in Phosphatpuffer pH 7,2 bei 4°C und Dunkellagerung bis zu 6 Monate stabil	Unspezifisches SH-Reagens [67], CE-Inhibitor [68]	Xi
Aldrithiol-2 (2,2'-Dithiopyridin) <sup>1</sup>	In Pufferlösungen löslich	k. A.	Unspezifisches SH-Reagens [67]	Xi
Aprotinin <sup>4</sup>	Ca. 1,5 mM (Wasser) *	Lösungen bei 4°C stabil	Reversible Inhibition von Serinproteasen	k. A.
Benzamidin-Hydrochlorid <sup>1</sup>	Ca. 320 mM (Wasser)	Lösungen bei -20°C bis zu 6 Monate stabil	Reversible Inhibition von Serinproteasen [69,70]	Xi
Bis( <i>p</i> -nitrophenylphosphat), Natriumsalz (BNPP) <sup>1</sup>	In Pufferlösungen löslich	k. A.	Irreversible Inhibition von CE [71]	k. A.

Inhibitor	Löslichkeit (Lösungsmittel)	Stabilität der Lösung	Inhibitionseigenschaften	Toxizität
Dithiothreitol (DTT) <sup>1</sup>	100 mM (Wasser)	k. A.	Unspezifisches SH-Reagens, CE-Inhibitor [72]	Xn
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA) <sup>1</sup>	Ca. 270 mM (Wasser)	Lösungen bei 4°C über Monate stabil	Metalloprotease-Inhibitor	k. A.
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA) <sup>1</sup>	Ca. 500 mM (Wasser; pH 8,5)	k. A.	Metalloprotease-Inhibitor	k. A.
Glyoxal <sup>1</sup>	Ca. 9 M (Wasser)	Lösungen bei 4°C stabil	Kovalente Modifizierung von Arginylresten [73,74]	Xn
Kupfer(II)-sulfat <sup>1</sup>	Ca. 625 mM (Wasser)	k. A.	Arylesterase-Inhibitor [75,76]	Xn, N
Methylglyoxal <sup>1</sup>	Ca. 6 M (Wasser)	Lösungen bei 4°C stabil	Kovalente Modifizierung von Arginylresten [73,74]	Xn
Metoclopramid-Hydrochlorid (MCP) <sup>1</sup>	In Wasser löslich	k. A.	Reversible Inhibition von BChE [77]	Xn
<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC) <sup>5</sup>	In Wasser löslich	k. A.	Kovalente Modifizierung von Carboxylgruppen [78,79]	Xi
<i>N</i> - $\alpha$ - <i>p</i> -Tosyl-L-argininmethylester-Hydrochlorid (TAME) <sup>1</sup>	Ca. 106 mM (Wasser)	k. A.	Reversible Inhibition von Serinproteasen [80,81]	k. A.
<i>N</i> - $\alpha$ - <i>p</i> -Tosyl-L-lysin-chloromethylketon-Hydrochlorid (TLCK) <sup>1</sup>	Ca. 140 mM (Wasser)	k. A.	Irreversible Inhibition von Serinproteasen, auch Inhibition einiger Cysteinproteasen	Xi
<i>N</i> -( <i>trans</i> -Epoxy succinyl)-L-leucin-4-guanidinobutylamid (E-64) <sup>2</sup>	Ca. 56 mM (Wasser)	Lösungen bei -20°C über Monate stabil	Irreversible Inhibition von Cysteinproteasen, auch Inhibition von Trypsin [82]	k. A.
Natriumfluorid (NaF) <sup>1</sup>	1 M (Wasser)	k. A.	Reversible Inhibition von ChE und CE [83,84]	T ***

Inhibitor	Löslichkeit (Lösungsmittel)	Stabilität der Lösung	Inhibitionseigenschaften	Toxizität
<i>N</i> -Bromsuccinimid (NBS) <sup>1</sup>	Ca. 11 mM (Wasser)	k. A.	Irreversible Inhibition von ChE und CE [85,86]	C
<i>p</i> -Aminobenzamidin- Dihydrochlorid <sup>1</sup>	In Pufferlösungen löslich	k. A.	Reversible Inhibition von Serinproteasen [69,70]	Xi
Tetra- <i>n</i> -butyl- ammoniumbromid (TBA) <sup>1</sup>	Ca. 1,6 M (Wasser)	k. A.	Reversible Inhibition von ChE [87]	Xi
Trypsin-Inhibitor (aus der Sojabohne) (STI) <sup>1</sup>	Ca. 0,5 mM (Wasser) *	Lösungen bei -20°C stabil	Reversible Inhibition von Serinproteasen	k. A.
Zinksulfat <sup>1</sup>	Ca. 170 mM (Wasser)	k. A.	Arylesterase-Inhibitor [88]	Xn, N

\* Trotz der geringen Wasserlöslichkeit wurden  $\alpha_1$ -Antitrypsin, Aprotinin und STI auf Grund des bekanntermaßen breiten Inhibitionsspektrums für das Inhibitorscreening eingesetzt.

\*\* k. A. – keine Angabe.

\*\*\* NaF ist als giftig eingestuft. Es wurde zu Vergleichszwecken mit früheren Studien und wegen seines bekanntermaßen breiten Inhibitionsspektrums dennoch für das Inhibitorscreening eingesetzt.

<sup>1</sup> Fa. Sigma-Aldrich; <sup>2</sup> Fa. Biomol; <sup>3</sup> Fa. Alfa-Aesar; <sup>4</sup> Fa. MP Biomedicals; <sup>5</sup> Fa. Acros Organics

### 2.6.2 Screening ausgewählter Inhibitoren (Inhibitorscreening)

Die gemäß 2.6.1 ausgesuchten Inhibitoren wurden mit Konzentraten der isolierten, für die jeweiligen Wirkstoffe aktiven Albumin-AC-Fractionen (2.4.7) aus Rattenserum (bezogen auf Sagopilone, Drospirenon und MPA) sowie mit unfraktioniertem Rattenserum (bezogen auf alle vier Wirkstoffe) und Hundeserum (bezogen auf Drospirenon und MPA) inkubiert. Die Konzentrate der Fraktionen aus den Proteintrennungen von Rattenserum wurden, wie unter 2.4.9 beschrieben, hergestellt. Für das Inhibitorscreening wurden stets jeweils 90 µL Konzentrat oder Serum mit 10 µL der entsprechenden Inhibitorlösung versetzt und bei  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (Wasserbad) für 30 min präinkubiert. Diese Lösung (100 µL) wurde auf den jeweiligen getrockneten Wirkstoff gegeben (vgl. 2.3.1) und bei  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (Wasserbad) über einen definierten Zeitraum inkubiert (siehe **Tabelle 5**: letzte Zeile). Die Konzentration (und spezifische Radioaktivität) der einzelnen Wirkstoffe im 100-µL-Ansatz war wie folgt:

- Sagopilone: 0,15 µM (580 GBq/mmol)
- Drospirenon: 10 µM (17 GBq/mmol)
- MPA: 0,2 µM (832 GBq/mmol) oder 1 µM (83 GBq/mmol)
- PRASL: 0,1 µM (793 GBq /mmol)

Die Reaktion wurde, wie unter 2.3.1 beschrieben, gestoppt, die Probe aufbereitet und die HPLC-Analytik durchgeführt. Pro Wirkstoff, Inhibitorkonzentration und Matrix wurde eine Probe hergestellt. In **Tabelle 5** ist angegeben, welcher Inhibitor in welcher Konzentration in den einzelnen Matrices mit den jeweiligen Wirkstoffen inkubiert wurde. Alle Inhibitoren wurden in reinem Wasser gelöst. Abweichungen davon sind in **Tabelle 5** gekennzeichnet.

**Tabelle 5:** Übersicht (Probenplan) über das Inhibitorscreening der Konzentrate aus der Fraktionierung von Rattenserum und des unfraktionierten Ratten- und Hundeserums für die vier Wirkstoffe (✓: Inkubation durchgeführt; n.d.: nicht durchgeführt). Sternchen (\*, \*\*, \*\*\*): siehe Anmerkungen am Tabellenende.

Inhibitor (Konzentration im Ansatz)	<u>Konzentrat der Fraktionen aus</u> <u>Rattenserum</u> (gemäß 2.4.9)			<u>Rattenserum</u> (unfraktioniert)				<u>Hundeserum</u> (unfraktioniert)	
	Sagopilone	Drospirenon	MPA	Sagopilone	Drospirenon	MPA	PRASL	Drospirenon	MPA
$\alpha_1$ -Antitrypsin (0,01 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
Aldrithiol-2 (0,1 mM) *	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
APMSF (1 mM)	✓	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
APMSF (10 mM)	✓	n.d.	n.d.	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
Aprotinin (0,1 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
Benzamidin- Hydrochlorid (1 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
BNPP (1 mM)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.
BNPP (5 mM) **	✓	n.d.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
DTNB (1 mM) *	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
DTT (1 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
E-64 (1,4 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
EDC (1 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓

Inhibitor (Konzentration im Ansatz)	<u>Konzentrat der Fraktionen aus Rattenserum (gemäß 2.4.9)</u>			<u>Rattenserum (unfraktioniert)</u>				<u>Hundeserum (unfraktioniert)</u>	
	<b>Sagopilone</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>	<b>Sagopilone</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>	<b>PRASL</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>
EDTA (10 mM)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.
EDTA (20 mM)	✓	n.d.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
EGTA (10 mM) *	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
Glyoxal (1 mM) ***	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
Kupfer(II)-sulfat (1 mM)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Methylglyoxal (1 mM) ***	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
MCP (1 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
NaF (1 mM)	✓	✓	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NaF (10 mM)	✓	n.d.	n.d.	✓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NaF (100 mM)	✓	n.d.	n.d.	✓	✓	n.d.	✓	✓	✓
NBS (1 mM)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.
NBS (2 mM)	✓	n.d.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>p</i> -Aminobenzamidin- Dihydrochlorid (1 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓

Inhibitor (Konzentration im Ansatz)	<u>Konzentrat der Fraktionen aus Rattenserum (gemäß 2.4.9)</u>			<u>Rattenserum (unfraktioniert)</u>				<u>Hundeserum (unfraktioniert)</u>	
	<b>Sagopilone</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>	<b>Sagopilone</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>	<b>PRASL</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>
Pefabloc® SC (1 mM)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.
Pefabloc® SC (10 mM)	✓	n.d.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Pefabloc® SC (100 mM)	✓	n.d.	✓	✓	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.
Phosphoramidon, Dinatriumsalz (1 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
STI (0,1 mM)	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓	✓
TAME (1 mM)	✓	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	n.d.	n.d.
TAME (10 mM)	n.d.	n.d.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TBA (10 mM)	✓	✓	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TBA (100 mM)	✓	n.d.	n.d.	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TLCK (1 mM)	✓	✓	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TLCK (10 mM)	✓	n.d.	n.d.	✓	✓	n.d.	✓	✓	✓
Zinksulfat (1 mM)	✓	✓	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓	✓
Zinksulfat (10 mM)	n.d.	n.d.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Inhibitor (Konzentration im Ansatz)	<u>Konzentrat der Fraktionen aus Rattenserum (gemäß 2.4.9)</u>			<u>Rattenserum (unfraktioniert)</u>				<u>Hundeserum (unfraktioniert)</u>	
	<b>Sagopilone</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>	<b>Sagopilone</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>	<b>PRASL</b>	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>
Zinksulfat (100 mM)	n.d.	n.d.	✓	n.d.	n.d.	✓	n.d.	n.d.	n.d.
Inkubationsdauer	2 min	6 h	20 min	2 min	6 h	20 min	12 h	6 h	6 h

\* Gelöst in der Pufferlösung nach 2.4.7.

\*\* Inhibitor-Stammlösung flockt einige Zeit nach der Herstellung aus.

\*\*\* Das Probenkonzentrat wurde vor der Inkubation erst mit Wasser und dann mit einer Pufferlösung aus 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,5 mittels Ultrafiltration (siehe 2.4.6.1) gewaschen.

Die Auswertung erfolgte auf Grundlage der relativen radioaktiven Flächen. Diese wurden auf eine nicht-inhibierte Positivkontrolle bezogen, die aus jeweils 90 µL Konzentrat oder Serum und 10 µL der unter 2.4.7 genannten Pufferlösung hergestellt, wie oben beschrieben präinkubiert und dann nach **Tabelle 5** inkubiert wurde. Zur Berechnung der Inhibition (in %, bezogen auf die jeweilige Positivkontrolle) wurde die Differenz der relativen Fläche der Inhibitionsprobe zu 1 durch die Differenz der relativen Fläche der Positivkontrolle zu 1 dividiert und die Differenz dieses Quotienten zu 1 prozentual angegeben. Es wurden im Einzelnen nur Inhibitionswerte von  $\geq 50$  % (d. h. ausreichende Wirksamkeit) bzw. nur solche Werte aufgeführt, die für einen Vergleich der Wirksamkeit bezogen auf die vier Wirkstoffe genutzt wurden. Alle Angaben bezogen sich auf einen 100-µL-Ansatz.

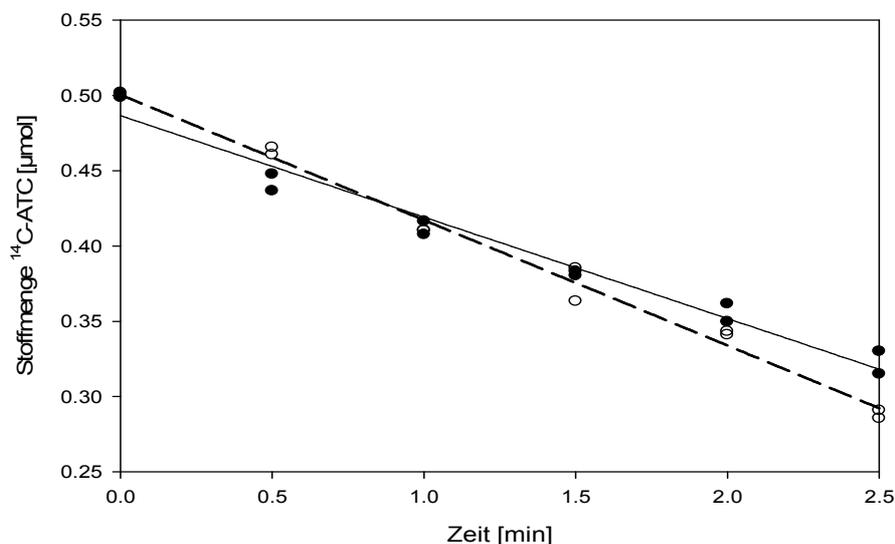
# **ERGEBNISSE**

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung der Serumesterase-Aktivität mittels HPLC-Esterase-Assay sowie pH-Stat-Titration

##### 3.1.1 HPLC-Esterase-Assay mit $^{14}\text{C}$ -markiertem S-Acetylthiocholiniodid und p-Nitrophenylacetat

Ratten- bzw. Hundeserum wurden mit  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid und  $^{14}\text{C}$ -NPA in einem Reaktionsansatz simultan inkubiert (siehe 2.2.1), um die Esteraseaktivität des Serums beider Spezies bezogen auf diese Substrate zu vergleichen.

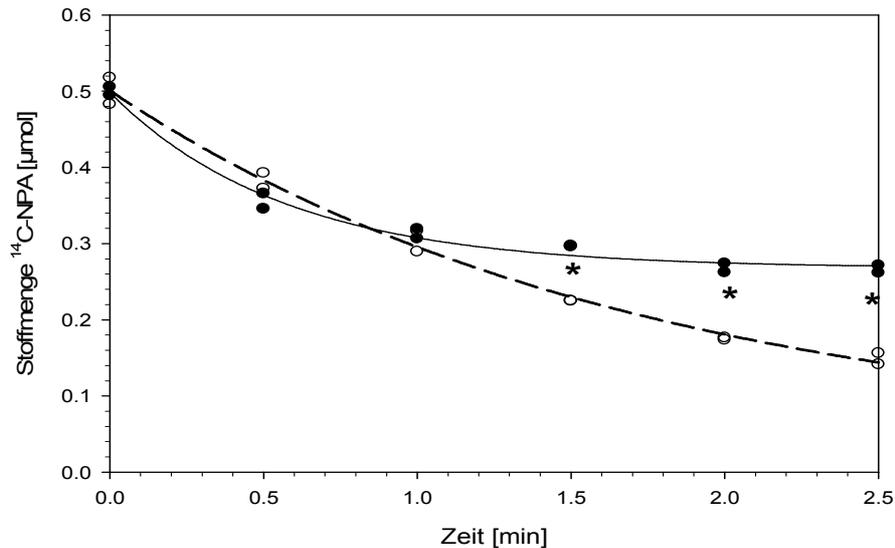


**Abbildung 5:** Zeitabhängiger Abbau von  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid (gemessen als  $^{14}\text{C}$ -ATC) durch Rattenserum (—●) bzw. Hundeserum (-----○) (Inkubationsbedingungen: siehe 2.2.1)

Der Abbau von  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid wurde für Rattenserum durch eine lineare Regression mit der Regressionsgleichung  $f=0,487 \mu\text{mol} - 0,067 \text{ U} \cdot x$  (Bestimmtheitsmaß:  $R^2=0,973$ ) bzw. für Hundeserum  $f=0,500 \mu\text{mol} - 0,083 \text{ U} \cdot x$  ( $R^2=0,991$ ) beschrieben, wobei  $f$  die Stoffmenge an  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid (in  $\mu\text{mol}$ ) und  $x$  die Zeit (in min) repräsentieren (**Abbildung 5**). U (Unit) ist die Einheit der Enzymaktivität, d. h. 1 U entspricht der Enzymmenge, die 1  $\mu\text{mol}$  Substrat in 1 min umsetzte (2.2.1). Der Vergleich der Messwerte zu den einzelnen Inkubationszeitpunkten mittels t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied.

Der Abbau von  $^{14}\text{C}$ -NPA durch Serum der beiden Spezies wurde durch eine nicht-lineare Regression mit der Regressionsgleichung  $f=0,268 \mu\text{mol} + 0,230 \mu\text{mol} \cdot e^{(-1,755/\text{min}) \cdot x}$  für Rattenserum ( $R^2=0,986$ ) bzw.  $f=0,035 \mu\text{mol} + 0,466 \mu\text{mol} \cdot e^{(-0,582/\text{min}) \cdot x}$  für Hundeserum ( $R^2=0,991$ ) beschrieben (**Abbildung 6**). Die

Variablen  $f$  und  $x$  sind wie oben erwähnt definiert ( $f$  hier bezogen auf  $^{14}\text{C-NPA}$ ). Für die Werte der umgesetzten Stoffmengen von  $^{14}\text{C-NPA}$  bei 1,5, 2 und 2,5 min wurde



ein signifikanter Unterschied zwischen Ratten- und Hundeserum gefunden.

**Abbildung 6:** Zeitabhängiger Abbau von  $^{14}\text{C-NPA}$  durch Rattenserum (—●) bzw. Hundeserum (-----○); \*  $p < 0,05$  (t-Test) (Inkubationsbedingungen: siehe 2.2.1)

Für die Spaltung von  $^{14}\text{C-ATC-Iodid}$  wurde eine geringfügig höhere Initialgeschwindigkeit ( $v_0$ ) in Hundeserum im Vergleich zu Rattenserum gefunden (**Tabelle 6**). Über den gesamten Inkubationszeitraum betrachtet wurde  $^{14}\text{C-ATC-Iodid}$  langsamer in Rattenserum als in Hundeserum abgebaut (gemessen an  $k_{\text{ATC}}$ ). In Übereinstimmung damit wurde in Hundeserum nach 2,5 min insgesamt mehr  $^{14}\text{C-ATC-Iodid}$  als in Rattenserum umgesetzt (**Abbildung 5**). Dagegen wurde  $^{14}\text{C-NPA}$  in Rattenserum sowohl initial (gemessen an  $v_0$ ) als auch während der gesamten Inkubationszeit (gemessen an  $k_{\text{NPA}}$ ) schneller als in Hundeserum abgebaut. Allerdings erreichte die Kurve in Rattenserum bereits nach etwa 1,5 min ein Plateau (**Abbildung 6**). In Hundeserum schritt der Umsatz auch über 1,5 min hinaus weiter voran. Die insgesamt umgesetzte Stoffmenge an  $^{14}\text{C-NPA}$  war daher nach 2,5 min in Hundeserum höher als in Rattenserum.

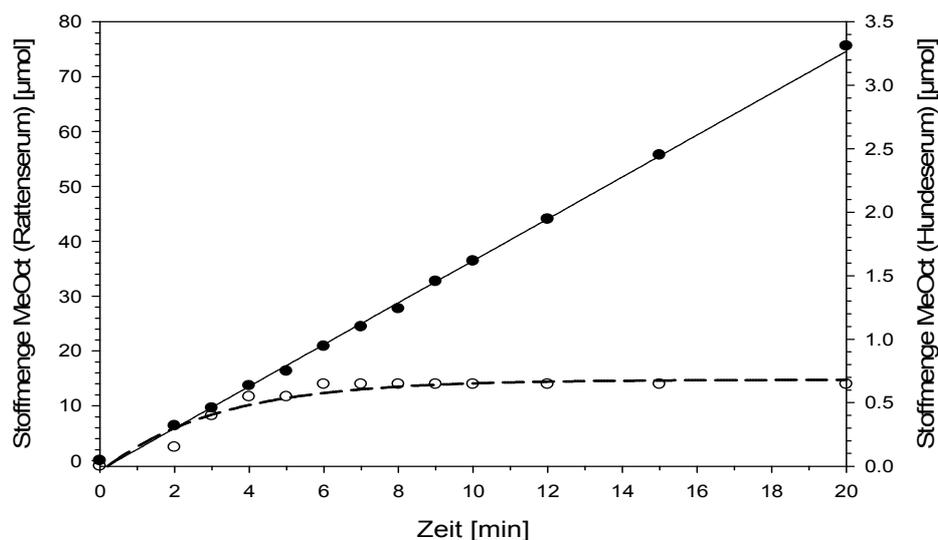
**Tabelle 6:** Initialgeschwindigkeiten ( $v_0$ ), Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{ATC}}$  bzw.  $k_{\text{NPA}}$ ) und Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) für den Abbau von  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid und  $^{14}\text{C}$ -NPA durch Ratten- und Hundeserum

Substrat	Rattenserum			Hundeserum		
	$v_0$ [mU]	$k_{\text{ATC}}$ bzw. $k_{\text{NPA}}$	$t_{1/2}$ [min]	$v_0$ [mU]	$k_{\text{ATC}}$ bzw. $k_{\text{NPA}}$	$t_{1/2}$ [min]
$^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid	88	67 mU	3,7	91	83 mU	3,0
$^{14}\text{C}$ -NPA	289	1,8 $\text{min}^{-1}$	0,4	236	0,6 $\text{min}^{-1}$	1,2

### 3.1.2 Die pH-Stat-Titration mit Methyloctanoat

Ratten- und Hundeserum wurden hinsichtlich ihrer Aktivität der Spaltung von MeOct untersucht.

Für Rattenserum wurde für alle Werte von 0 bis 20 min eine lineare Regressionskurve mit der Gleichung  $f = -1,741 \mu\text{mol} + 3,818 \text{ U} \cdot x$  ( $R^2 = 0,999$ ) erhalten (**Abbildung 7**). In Hundeserum wurde der MeOct-Umsatz hingegen durch eine dreiparametrische Exponentialkurve mit der Gleichung  $f = -0,048 \mu\text{mol} + 0,729 \mu\text{mol} \cdot (1 - e^{(-0,324/\text{min}) \cdot x})$  erhalten ( $R^2 = 0,930$ ). Die Variable  $f$  gibt die Stoffmenge an MeOct (in  $\mu\text{mol}$ ) und  $x$  die Zeit (in min) an. U ist die Einheit der Enzymaktivität, d. h. 1 U entspricht der Enzymmenge, die 1  $\mu\text{mol}$  Substrat in 1 min umsetzte (2.2.2).



**Abbildung 7:** Zeitabhängiger Umsatz von Methyloctanoat (MeOct) durch Rattenserum (—●) bzw. Hundeserum (----○) (Inkubationsbedingungen: siehe 2.2.2)

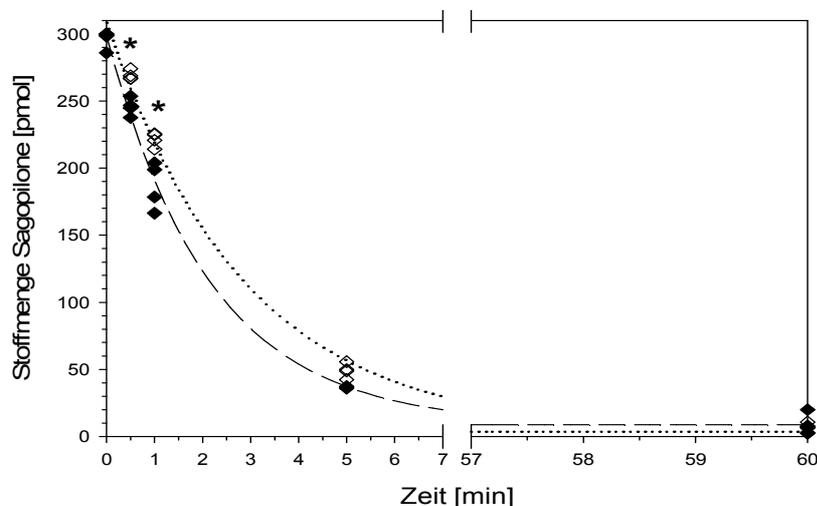
In Rattenserum wurde ein über die gesamte betrachtete Zeit linearer Umsatz von MeOct festgestellt, während in Hundeserum nach etwa 6 min ein Plateau erreicht wurde (**Abbildung 7**). Der Gesamtumsatz an MeOct blieb in Hundeserum nach 20 min unter 1 % des Umsatzes in Rattenserum. Initial setzte Hundeserum das Substrat etwa 30-mal langsamer um ( $v_0=0,11$  U in Hundeserum vs. 3,8 U in Rattenserum). Der Umsatz in Hundeserum folgte, über die gesamte Inkubationsdauer betrachtet, einer Kinetik erster Ordnung.

### 3.2 Vergleich der Serumesterase-Aktivität von Ratten- und Hundeserum

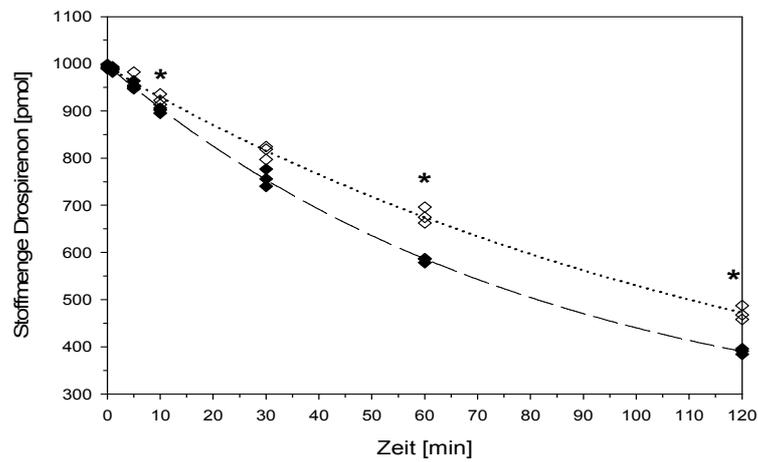
#### 3.2.1 Vergleich der Aktivität von frisch gewonnenem und tiefgefrorenem Rattenserum

Die Esteraseaktivität von frisch gewonnenem und von tiefgefrorenem Rattenserum wurde in Bezug auf die Spaltung von Sagopilone, Drospirenon, MPA und PRASL (2.3.1) verglichen.

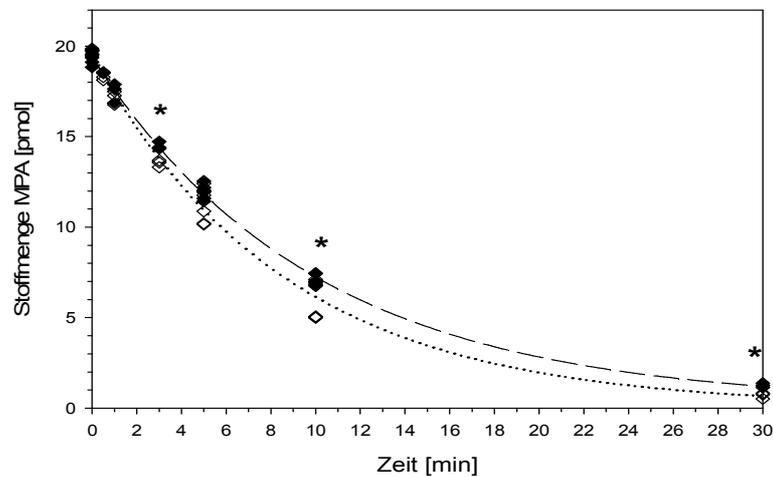
Aus qualitativer Sicht ergaben sich keine Unterschiede: Nach der Inkubation der vier Wirkstoffe in Frischserum bzw. in tiefgefrorenem Serum wurden in der Radio-HPLC jeweils dieselben Peaks des Wirkstoffs und seines Abbauproduktes bzw. seiner Abbauprodukte mit unveränderter Retentionszeit gefunden (Chromatogramme nicht gezeigt).



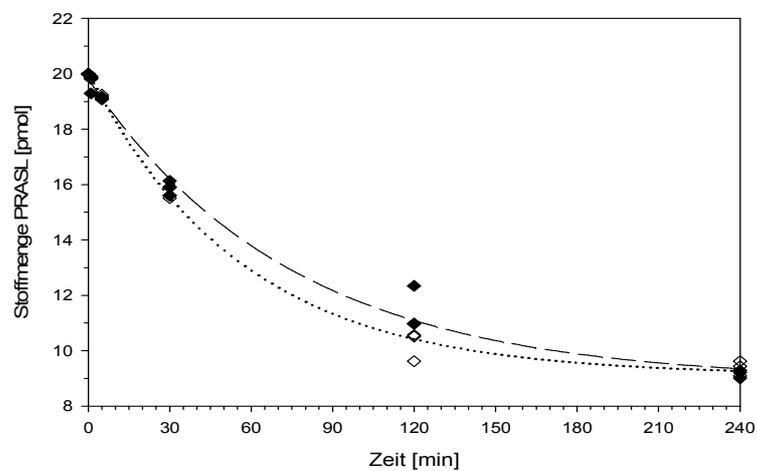
**Abbildung 8:** Zeitabhängiger Abbau von Sagopilone in Frischserum (— — —◆) bzw. tiefgefrorenem Serum (·····◇) von Ratten; \*  $p < 0,05$  (gepaarter t-Test)



**Abbildung 9:** Zeitabhängiger Abbau von Drospirenon in Frischserum (— — —◆) bzw. tiefgefrorenem Serum (·····◇) von Ratten; \*  $p < 0,05$  (gepaarter t-Test)



**Abbildung 10:** Zeitabhängiger Abbau von MPA in Frischserum (— — —◆) bzw. tiefgefrorenem Serum (·····◇) von Ratten; \*  $p < 0,05$  (gepaarter t-Test)



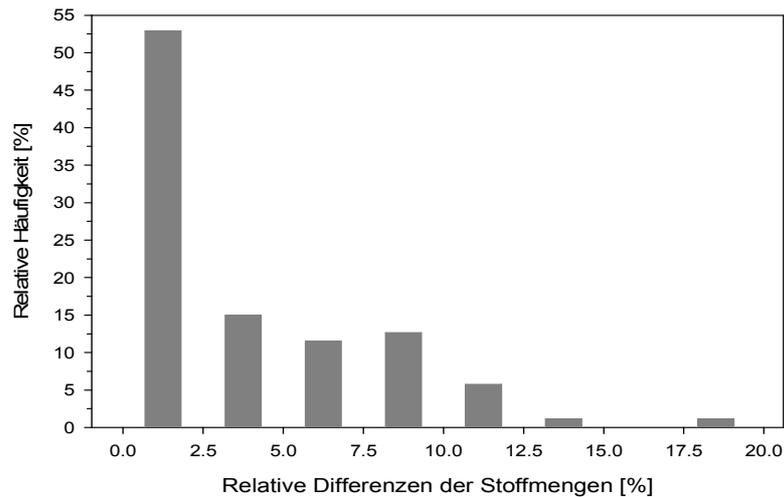
**Abbildung 11:** Zeitabhängiger Abbau von PRASL in Frischserum (— — —◆) bzw. tiefgefrorenem Serum (·····◇) von Ratten

Der Abbau der vier Wirkstoffe erfolgte jeweils stets nach einer Kinetik erster Ordnung (**Abbildung 8 bis Abbildung 11**) und wurde am besten durch eine dreiparametrische Exponentialgleichung beschrieben (2.3.1). Für Sagopilone war die Aktivität des Frischserums (gemessen an  $v_0$ ) höher als die des tiefgefrorenen Serums (**Tabelle 7**). Die Stoffmengen bei 0,5 und 1 min unterschieden sich im gepaarten t-Test signifikant. Bei Drospirenon wurden für die Werte bei 10, 60 und 120 min signifikante Unterschiede gefunden. Die Aktivität des Frischserums war höher als die des tiefgefrorenen Serums. Für MPA wurde dagegen eine höhere Aktivität des tiefgefrorenen Serums festgestellt. Signifikante Unterschiede wurden für die Werte bei 3, 10 und 30 min konstatiert. Für PRASL war die Aktivität des Frischserums größer als die des tiefgefrorenen Serums. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Stoffmengen zu den einzelnen Zeitpunkten gefunden. Die Werte für  $k$  und  $t_{1/2}$  unterstützten den Vergleich der Initialgeschwindigkeiten für Sagopilone, Drospirenon und MPA. Bei PRASL hingegen war die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante im tiefgefrorenem Serum größer (und die Halbwertszeit dementsprechend kleiner) als im Frischserum.

**Tabelle 7:** Initialgeschwindigkeiten ( $v_0$ ), Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) und Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ , berechnet aus  $k$ ) des Abbaus der vier Wirkstoffe in Frischserum und tiefgefrorenem Serum von Ratten (Inkubationsbedingungen: siehe 2.3.1)

Wirkstoff	Frischserum			Tiefgefrorenes Serum		
	$v_0$ [ $\mu\text{U}$ ]	$k$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]	$v_0$ [ $\mu\text{U}$ ]	$k$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]
Sagopilone	101	0,47	1,5	60	0,35	2,0
Drospirenon	6,1	0,012	57	3,7	0,008	92
MPA	1,7	0,101	6,9	2,8	0,12	5,9
PRASL	0,34	0,013	53	0,12	0,018	39

Um den tatsächlichen quantitativen Unterschied der Aktivität zwischen Frischserum und tiefgefrorenem Serum auszumachen, wurde ein Histogramm erstellt (2.3.1; **Abbildung 12**). Etwa 53 % aller relativen Differenzen waren kleiner als 2,5 %, 39 % der Differenzen lagen zwischen 2,5 und 10 % und etwa 8 % waren größer als 10 %. Keine der relativen Differenzen überschritt 20 %.



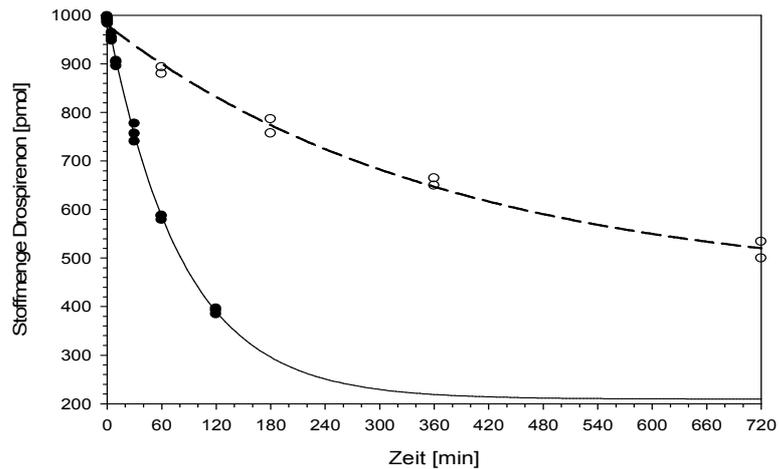
**Abbildung 12:** Histogramm der relativen Differenzen der Stoffmengen aus der Inkubation von Frischserum und tiefgefrorenem Serum von Ratten für die vier Wirkstoffe

### 3.2.2 Vergleich der Aktivität von frisch gewonnenem Ratten- und Hundeserum

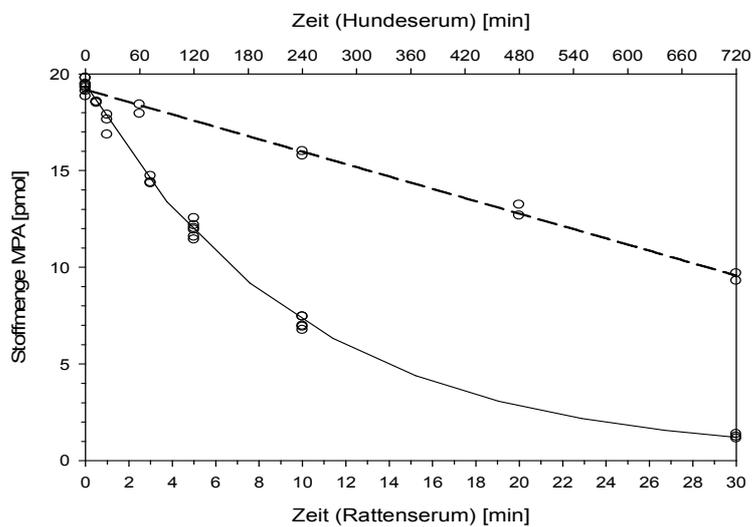
Die Esteraseaktivität von frisch gewonnenem Ratten- und Hundeserum wurde durch Inkubation mit Sagopilone, Drospirenon, MPA und PRASL in beiden Matrices verglichen (2.3.2).

Sagopilone und PRASL wurden innerhalb des jeweiligen Inkubationszeitraums in Hundeserum nicht abgebaut (**Tabelle 8**). Der Abbau von Drospirenon bzw. MPA erfolgte in Hundeserum langsamer als in Rattenserum (**Abbildung 13** bzw.

**Abbildung 14**). Für Drospirenon verlief der Abbau, wie in Rattenserum, nach einer Kinetik erster Ordnung. Nach einer Inkubation von 12 h in Hundeserum wurde in etwa die Stoffmenge an Drospirenon umgesetzt, die Rattenserum bereits nach 1 h abgebaut hatte. MPA wurde, im Gegensatz zu Rattenserum, in Hundeserum nach einer Kinetik nullter Ordnung abgebaut. Die Stoffmenge an MPA, die in Hundeserum in 12 h abgebaut wurde, wurde in Rattenserum bereits nach etwa 5 min umgesetzt.



**Abbildung 13:** Zeitabhängiger Abbau von Drospirenon in Frischserum von Ratten (—●) bzw. Hunden (-----○)



**Abbildung 14:** Zeitabhängiger Abbau von MPA in Frischserum von Ratten (—●) bzw. Hunden (-----○)

**Tabelle 8:** Initialgeschwindigkeiten ( $v_0$ ), Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) und Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) des Abbaus der vier Wirkstoffe in Frischserum von Ratten und Hunden

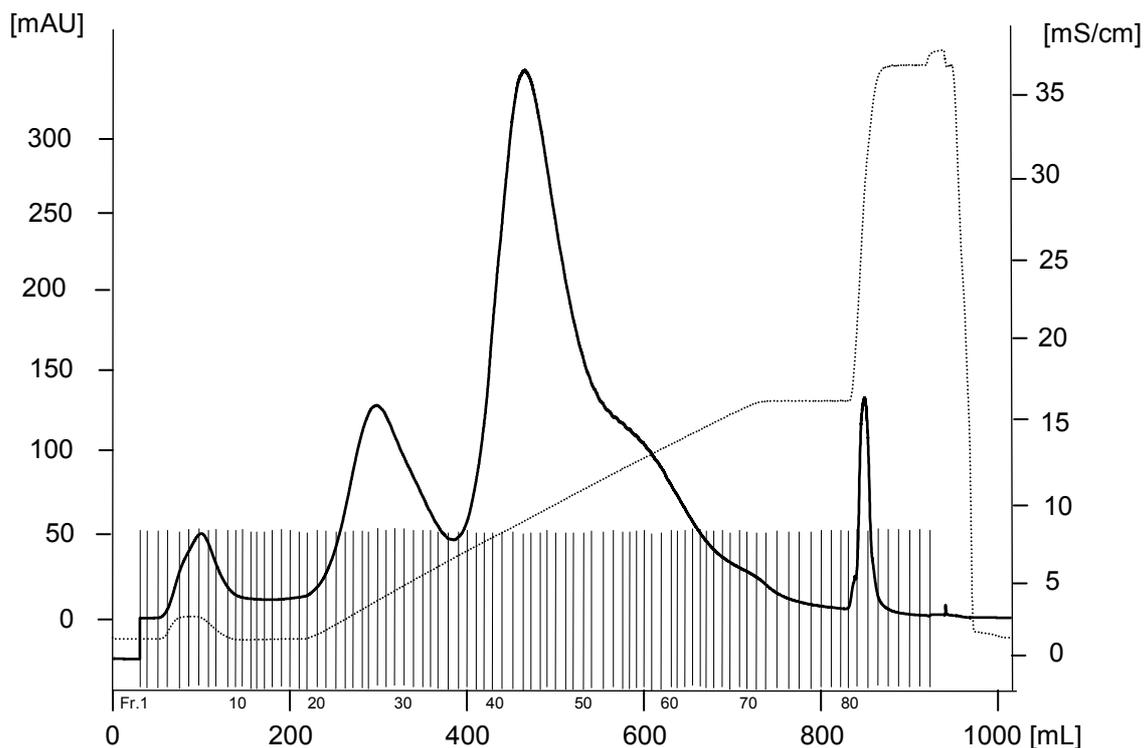
Wirkstoff	Rattenserum			Hundeserum		
	$v_0$ [ $\mu\text{U}$ ]	$k$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [min]	$v_0$ [ $\mu\text{U}$ ]	$k$	$t_{1/2}$ [h]
Sagopilone	101	0,47	1,5	kein Abbau in 6 h		
Drospirenon	6,1	0,012	57	1,7	$0,003 \text{ min}^{-1}$	4,3
MPA	1,7	0,10	6,9	0,019	$0,013 \mu\text{U}$	12,5
PRASL	0,34	0,013	53	kein Abbau in 12 h		

### 3.3 Proteinisolierung und –reinigung aus Ratten- und Hundeserum

#### 3.3.1 Typische Chromatogramme der vier Proteintrennungungsverfahren

##### 3.3.1.1 IEC

Für eine typische IEC wurden 6 mL Rattenserum aufgetragen (2.4.1; **Abbildung 15**).

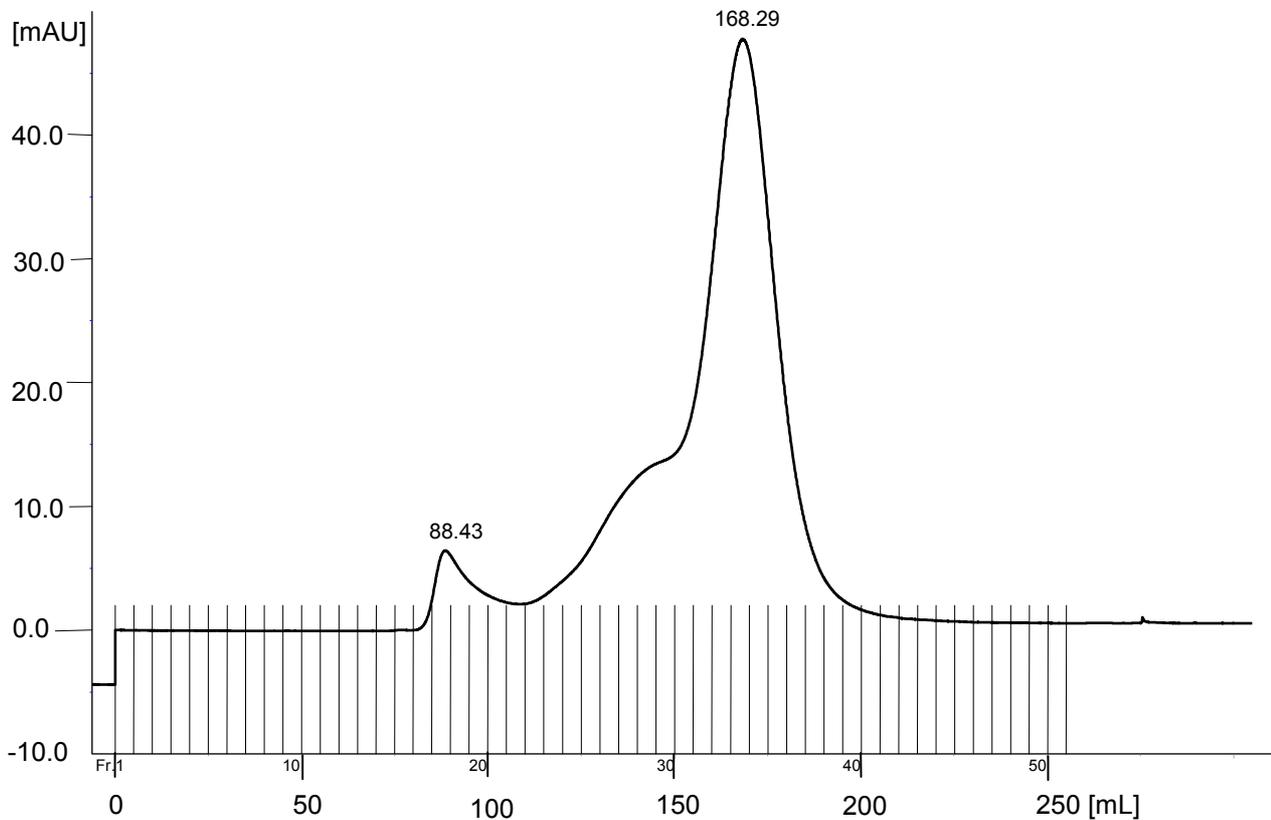


**Abbildung 15:** IEC-Chromatogramm einer Rattenserum-Probe; linke Ordinate: UV-Absorption [mAU] bei 280 nm (—); rechte Ordinate: Leitfähigkeit [mS/cm] (····); Abszisse: Elutionsvolumen [mL]; vertikale Linien: Fraktionen (Fr.) mit Nummern

Es wurden im Wesentlichen folgende Peaks in der IEC festgestellt: ein Initialpeak kurz nach Probenauftrag (Fraktionen 3-11), ein Peak kurz nach Beginn der Elution mit NaCl (Fraktionen 20-36, entsprach ca. 10-61 mM NaCl), ein Hauptpeak in den Fraktionen 37-52 (entsprach ca. 61-122 mM NaCl), eine Schulter (Fraktionen 53-78, entsprach 122-200 mM NaCl) und ein Reinigungspeak in den Fraktionen 80-84. Für die IEC von Hundeserum ergab sich ein ähnliches UV-Chromatogramm (nicht gezeigt). Allerdings war der Initialpeak deutlich größer, der Hauptpeak war zweigipflig und schloss die anschließende Schulter mit ein.

### 3.3.1.2 SEC

Ein Fraktionspool aus einer IEC von Rattenserum wurde in einer typischen SEC untersucht (2.4.2; **Abbildung 16**).



**Abbildung 16:** SEC-Chromatogramm eines IEC-Fraktionspools aus Rattenserum; Achsenbeschriftung und Linien wie in **Abbildung 15**. Eingetragen sind die Elutionsvolumina [mL] zweier Peakmaxima.

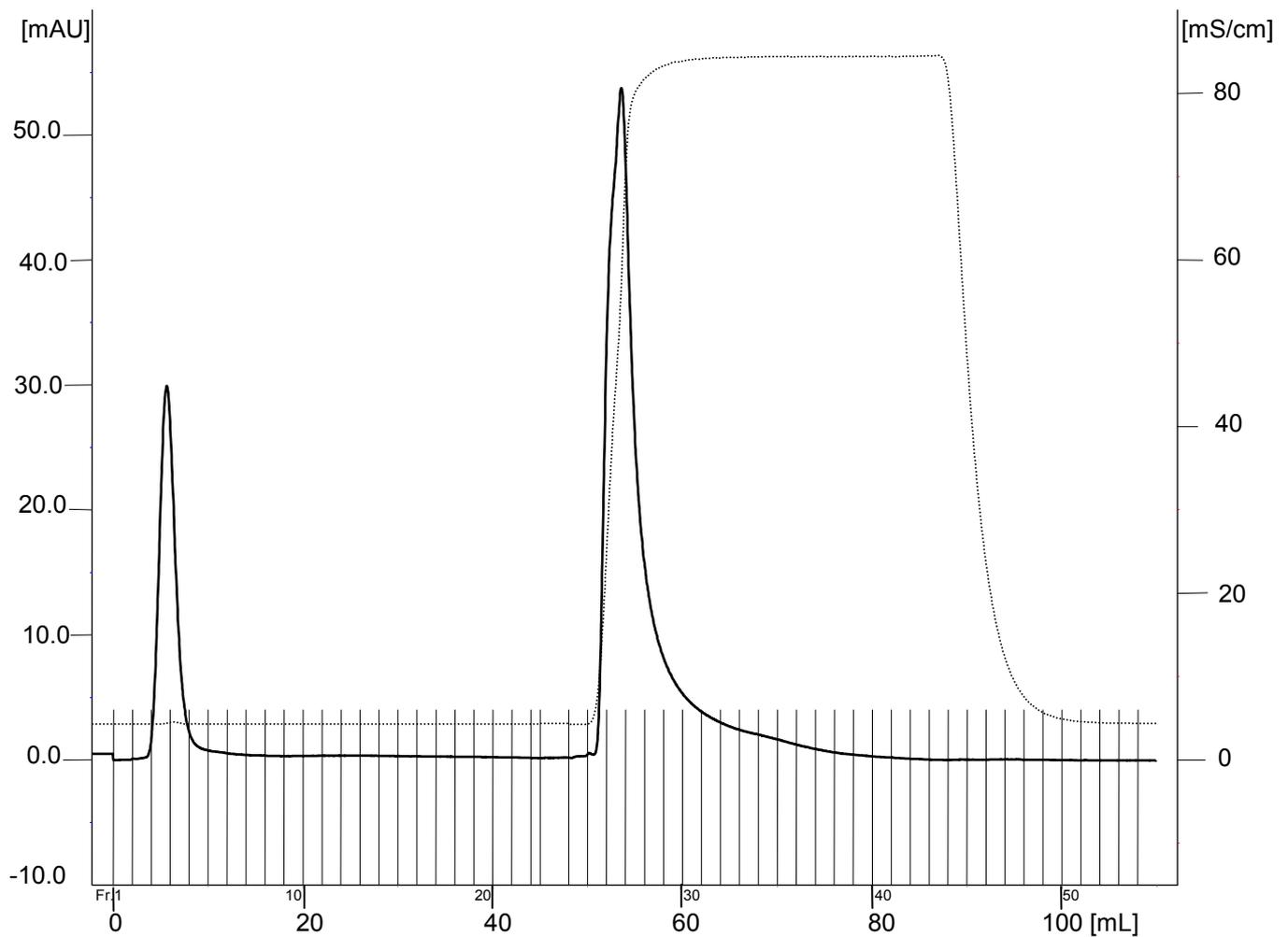
Es wurden ein kleiner Peak bei ca. 88 mL (Fraktionen 17-22), eine Schulter in den Fraktionen 23-30 und ein Hauptpeak bei 168 mL (Fraktionen 31-40) gefunden. Der Hauptpeak entsprach der Molmasse 70 kDa. Andere SEC-Chromatogramme wiesen ebenfalls jeweils einen kleinen Peak bei 80-85 mL (entsprachen Molmassen von größer als 670 kDa) und einen Hauptpeak bei 160-170 mL (entsprachen 94-66 kDa) auf.

Die SEC der IEC-Fraktionen aus Hundeserum wies ein vergleichbares UV-Chromatogramm auf (nicht gezeigt). Der Hauptpeak lag jedoch bei etwa 140 mL (entsprach 195 kDa).

### 3.3.1.3 Albumin-AC

In einer typischen Albumin-AC (2.4.3; **Abbildung 17**) wurden zwei Peaks gefunden: ein Peak, der direkt nach dem Auftragen von der Säule eluiert wurde (Fraktionen 1-5), und ein weiterer, der erst während der Elution mit 1,5 M NaCl erschien (Fraktionen 25-37).

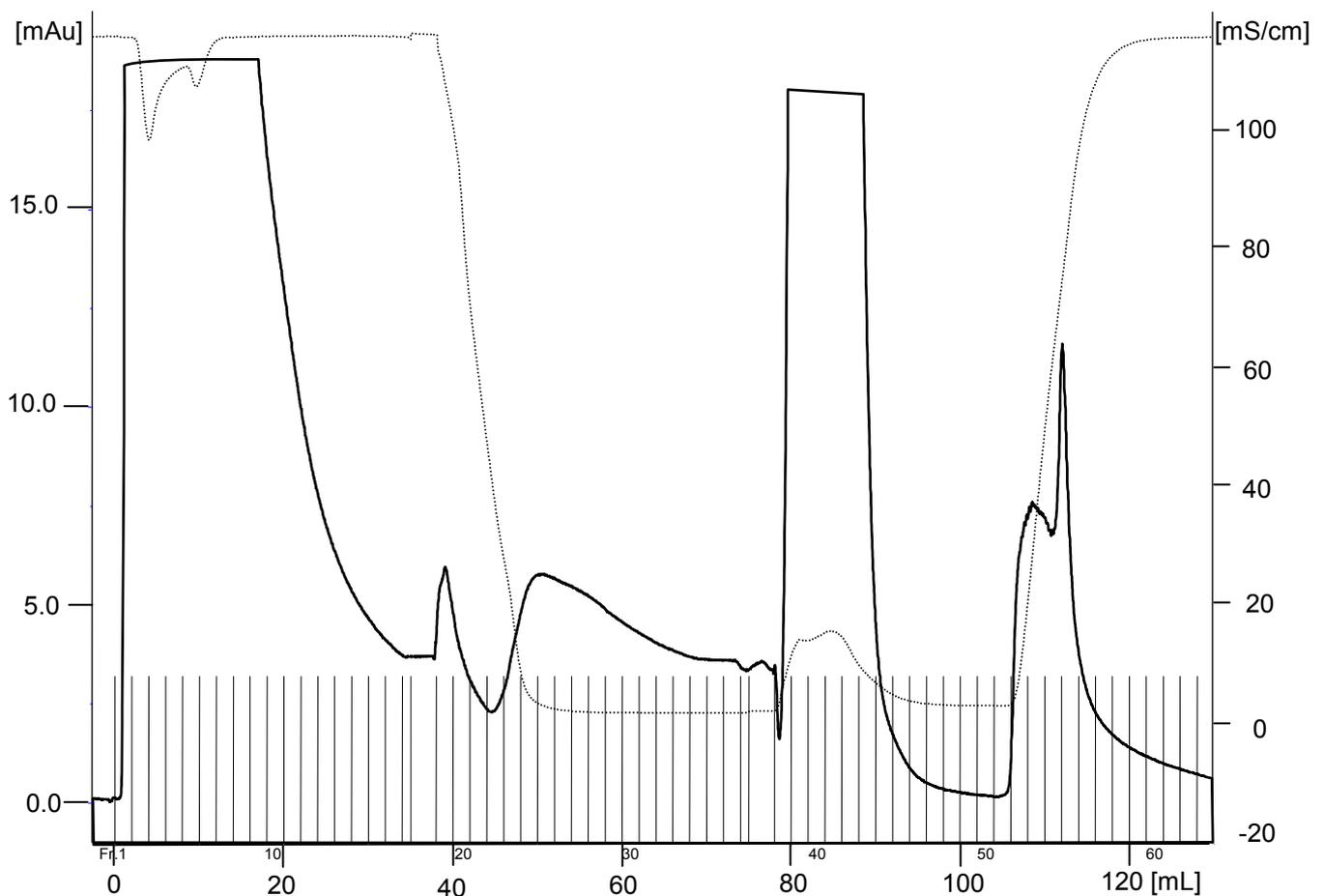
Die Albumin-AC für SEC-Fractionen aus Hundeserum war bezüglich des UV-Chromatogramms identisch (nicht gezeigt).



**Abbildung 17:** Chromatogramm einer Albumin-AC eines SEC-Fraktionspools aus Rattenserum; Achsenbeschriftung und Linien wie in **Abbildung 15**

### 3.3.1.4 PON-AC

In einer typischen PON-AC von Rattenserum war in den Fraktionen 1-17, d. h. kurz dem Auftragen, stets ein sehr großer Peak zu sehen (**Abbildung 18**; hier nicht voll gezeigt). Beim Waschen der Säule ohne NaCl erschienen ein kleiner, schmaler Peak (Fraktionen 19-22) und dann ein breiterer Peak (Fraktionen 23-36). Während der Elution mit Natriumdesoxycholat wurde ein breiter Peak eluiert, der zweigipflig war (Fraktionen 39-41 und 42-47; in **Abbildung 18** nicht voll gezeigt). Abschließend trat ein Peak beim Rekonstituieren der Ausgangsbedingungen (Fraktionen 51-61) auf.



**Abbildung 18:** Chromatogramm einer PON-AC einer Rattenserum-Probe (UV-Kurve: vergrößerter Ausschnitt; Peaks z. T. manuell abgeschnitten); Achsenbeschriftung und Linien wie in **Abbildung 15**

Für Hundeserum wurde ein vergleichbares UV-Chromatogramm der PON-AC gefunden (nicht gezeigt).

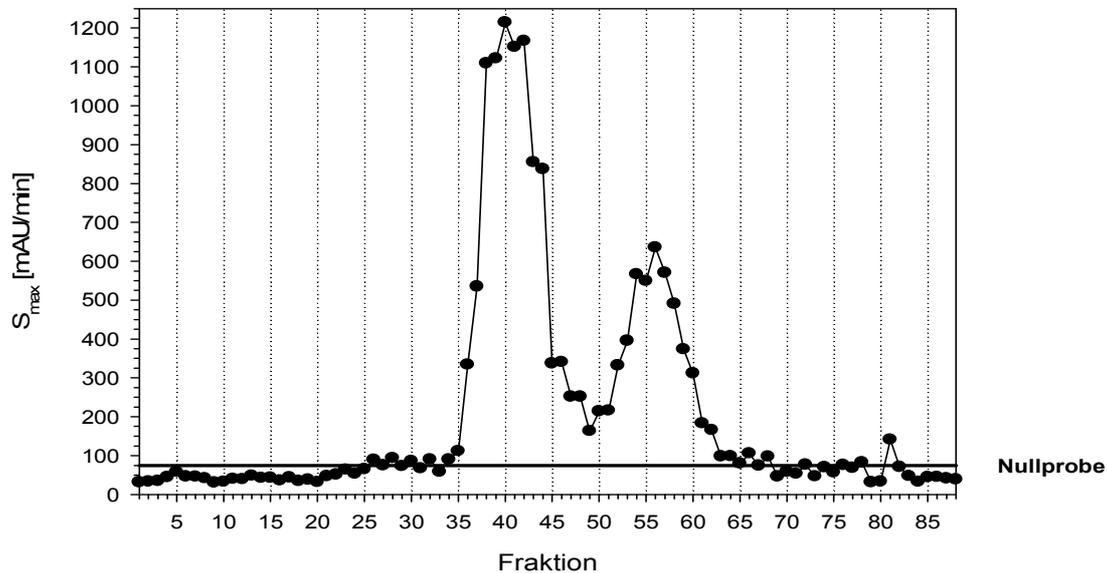
### 3.3.2 Kinetischer Assay der isolierten Fraktionen mit NPA

Im Folgenden wird ein NPA-Assay von Fraktionen, die aus einer Proteintrennung gewonnen wurden, als ein typisches Beispiel für alle weiteren Proteintrennungen herausgegriffen. Rattenserum wurde mittels IEC (siehe 2.4.1) getrennt und alle Fraktionen im kinetischen Assay, wie unter 2.4.5 beschrieben, untersucht.

Es wurden zwei Maxima festgestellt, eines in Fraktion 40 und ein zweites in Fraktion 56 (**Abbildung 19**). Daneben gab es noch ein kleines Maximum in Fraktion 81. Die IEC, die dem Diagramm in **Abbildung 19** zu Grunde lag, war nicht dieselbe, die das Chromatogramm in **Abbildung 15** lieferte. Daher waren die Fraktionen etwas verschoben. Trotzdem ließ sich festhalten, dass das erste Aktivitätsmaximum in etwa dem Hauptpeak des UV-Chromatogramms der IEC entsprach. Analog stimmten die Schulter im Chromatogramm mit dem zweiten Aktivitätsmaximum in Fraktion 56 und der Reinigungspeak der IEC mit dem Aktivitätspeak in Fraktion 81 überein. Der gesamte Bereich der Fraktionen 35-63 sowie 80-83 wurde mittels der PAGE-Techniken (2.4.6) sowie der Aktivitätsassays mit Sagopilone, Drospironon, MPA und PRASL (2.4.7) weiter untersucht. Für die Fraktionen aus der SEC bzw. Albumin-AC von Rattenserum wurde die Aktivität im NPA-Assay analog bestimmt und ausgewertet. Bei der SEC wurde ebenfalls das Aktivitätsmaximum des NPA-Assays im Hauptpeak des UV-Chromatogramms gefunden. Für die Albumin-AC zeigte der Peak, der direkt nach dem Auftragen eluiert wurde, die größte Aktivität im NPA-Assay. Der zweite Peak wies eine wesentlich kleinere Aktivität im kinetischen Assay auf. In der PON-AC von Rattenserum stimmten die Peaks aus dem UV-Chromatogramm mit denen aus dem NPA-Assay in ihrer Lage weitgehend überein, allerdings waren sie schmaler. Die Peaks in den Fraktionen 1-8, 20-30 und 39-44 hatten jeweils in etwa dieselbe Aktivität im NPA-Assay. Es wurde nur eine geringe Aktivität der Fraktionen 54-57 gefunden.

Bezogen auf Hundeserum ergab der NPA-Assay der IEC-Fraktionen ein mit dem UV-Chromatogramm übereinstimmendes Bild: einen kleinen Aktivitätspeak jeweils beim Probenauftrag und zu Beginn der Elution mit NaCl, einen Hauptaktivitätspeak und ein kleines Aktivitätsmaximum im Reinigungspeak. In den SEC-Fraktionen aus einer IEC von Hundeserum wurde im NPA-Assay keine Aktivität mehr festgestellt. Daher wurde entsprechend der UV-Kurve der SEC (an Stelle der Aktivitätsverteilung im NPA-Assay) entschieden, welche Fraktionen weiter untersucht wurden. Gleiches galt für

die Albumin-AC der SEC-Fractionen aus Hundeserum. Auf Grund des im Vergleich zu Rattenserum ähnlichen UV-Chromatogramms für die PON-AC von Hundeserum wurde hierfür kein NPA-Assay durchgeführt. Alle PON-AC-Fractionen, die einen Peak im UV-Chromatogramm aufwiesen, wurden weiter untersucht.

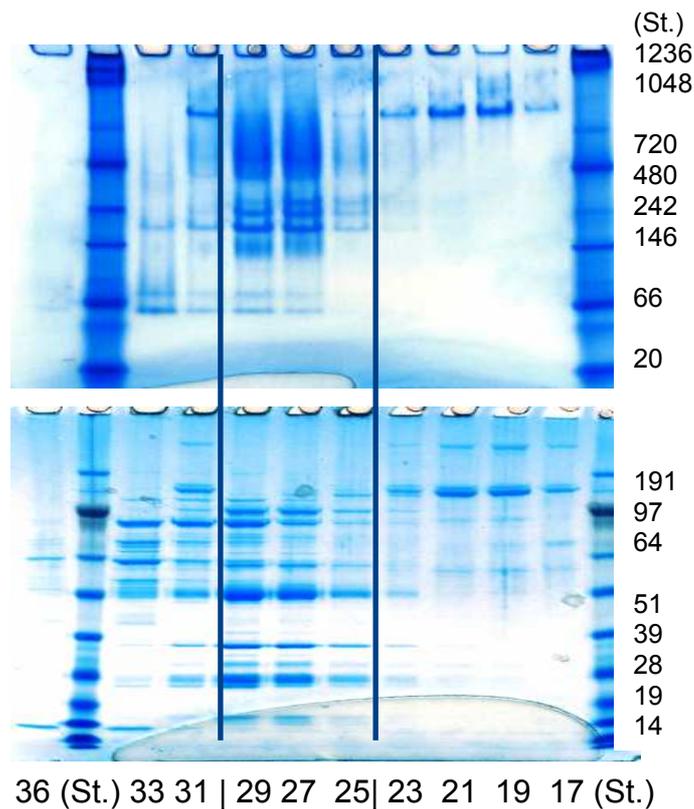


**Abbildung 19:** Aktivität der Fraktionen einer IEC einer Rattenserum-Probe im kinetischen NPA-Assay

### 3.3.3 Qualitatives Poolen mittels SDS-PAGE und nativer PAGE

Im Folgenden wird ein Beispiel gezeigt, wie Fraktionen, die im NPA-Assay (2.4.5) aktiv waren, mittels SDS- und nativer PAGE auf ihre Reinheit untersucht wurden, um für den Aktivitätsassay mit den vier Wirkstoffen (2.4.7) in qualitativer Hinsicht gepoolt zu werden.

In diesem Beispiel wurde eine IEC von Hundeserum (2.4.1) durchgeführt. Die im NPA-Assay (2.4.5) und Aktivitätsassay (2.4.7; hier für MPA) aktiven IEC-Fractionen wurden einer SEC (2.4.2) unterworfen und die daraus gewonnenen, im NPA-Assay aktiven SEC-Fractionen mittels beider PAGE-Techniken (2.4.6) untersucht. Nach 2.4.7 qualitativ gepoolt wurden hier die Fraktionen 17-23, 24-29 und 30-36 (**Abbildung 20**) und diese als jeweils ein SEC-Fraktionspool weiter behandelt.

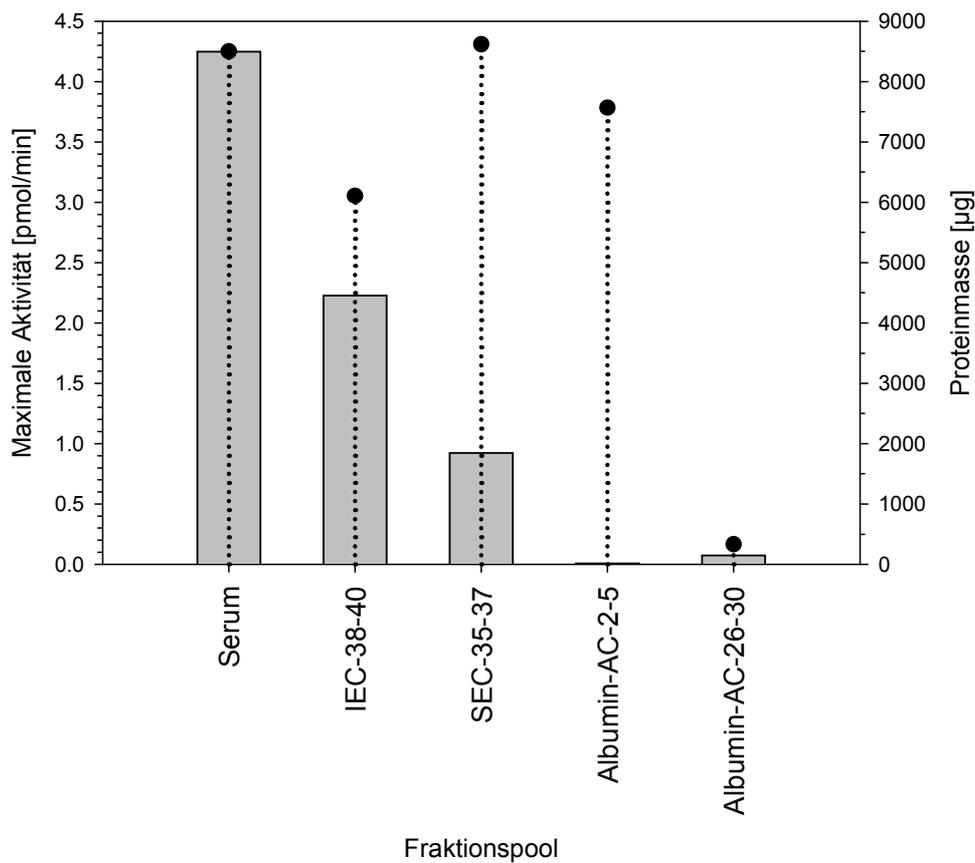


**Abbildung 20:** Gel einer nativen PAGE (oben) und SDS-PAGE (unten) von Fraktionen einer SEC eines IEC-Fraktionspools aus Hundeserum, Fr.: Fraktion, (St.): Proteinstandard (rechts: molare Massen in kDa), Färbung: siehe 2.4.6. Vertikale Balken grenzen einen qualitativ gleichartigen Pool ab.

### 3.3.4 Assay der isolierten Fraktionen aus den Proteintrennungsverfahren mit den vier Wirkstoffen

#### 3.3.4.1 *Sagopilone*-Assay der isolierten Fraktionen aus Rattenserum

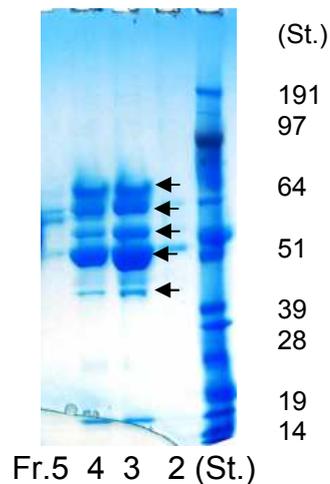
Die Fraktionen mit Esteraseaktivität für *Sagopilone* aus Rattenserum wurden sequenziell mittels IEC (2.4.1), SEC (2.4.2) und Albumin-AC (2.4.3) isoliert und gereinigt. Untersuchungen zur Aktivität der IEC- und SEC-Fraktionen im NPA-Assay (2.4.5) und zu ihrer Reinheit (PAGE, 2.4.6) wurden durchgeführt (Daten nicht gezeigt). In der IEC waren die Fraktionen 38-40 und in der SEC die Fraktionen 35-37 für *Sagopilone* aktiv und wurden jeweils weiter untersucht. Für die Albumin-AC wurden die beiden Fraktionspools 2-5 und 26-30 untersucht.



**Abbildung 21:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für Sagopilone aktiven IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fractions-pools aus Rattenserum; Punkte: maximale Aktivität [pmol/min]; Balken: Proteinmasse [µg]

**Tabelle 9:** Überblick über nach 2.4.7 für Sagopilone aktive IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fractions aus Rattenserum

Fractions pool	Serum	IEC-38-40	SEC-35-37	Albumin-AC-2-5	Albumin-AC-26-30
Inkubationszeitpunkte [min]	0; 1; 5; 30; 60	0; 5; 60	0; 5; 60	0; 5; 60	0; 5; 60
Maximale Aktivität [pmol/min]	4,251	3,053	4,309	3,783	0,166
Proteinmasse [µg]	8498,6	4454,9	1845,4	16,1	145,3
Spezifische Aktivität [pmol/(min·mg)]	0,50	0,69	2,33	235,06	1,14
Anreicherung	1,0	1,4	4,7	470,0	2,3
Ausbeute [%]	100,0	12,0	16,9	4,5	0,2

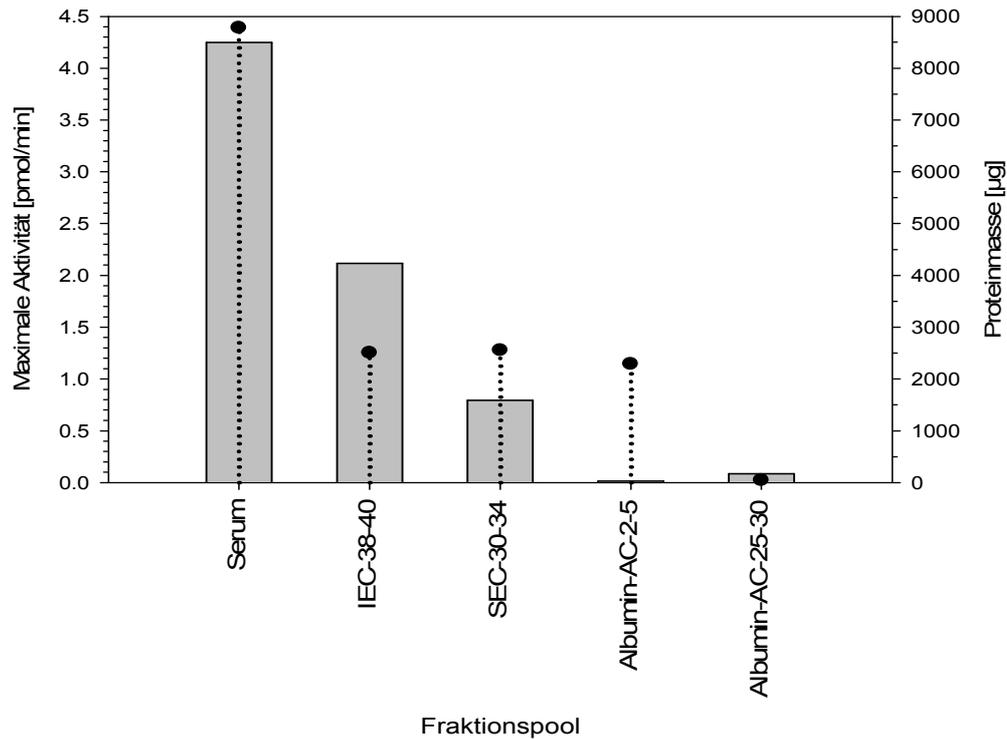


**Abbildung 22:** Gel einer SDS-PAGE der für Sagopilone aktiven Albumin-AC-Fractionen (Fr.) 2-5 aus Rattenserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.1

Durch die Isolierung und dreistufige Reinigung der für Sagopilone aktiven Fraktionen aus Rattenserum wurde eine etwa 470-fache Anreicherung an Aktivität erzielt (**Tabelle 9**), da die Proteinmenge ausgehend von Serum über die IEC und SEC bis zur Albumin-AC (Fraktionspool 2-5) kontinuierlich reduziert wurde (**Abbildung 21**). Die Aktivität ging bis zur Albumin-AC weitestgehend verloren und ergab im Fraktionspool 2-5 eine Ausbeute von ca. 5 %. In der Albumin-AC war der Peak, der kurz nach dem Auftragen die Säule verließ (Fraktionspool 2-5), derjenige mit der höheren Aktivität bezüglich des Sagopiloneumsatzes im Vergleich zum später eluierten Peak (Fraktionspool 26-30). In den Albumin-AC-Fractionen 2-5 fanden sich im Wesentlichen folgende, mittels SDS-PAGE gefundene Proteinbanden [kDa]: 80; 70; 59; 48 und 39 (**Abbildung 22**: Pfeile v. o.). Die Fraktionen 26-30 zeigten hauptsächlich eine intensive Bande bei 59 kDa. Für alle weiteren Untersuchungen wurde der Albumin-AC-Fraktionspool 2-5 verwendet.

### 3.3.4.2 Drospirenon-Assay der isolierten Fraktionen aus Rattenserum

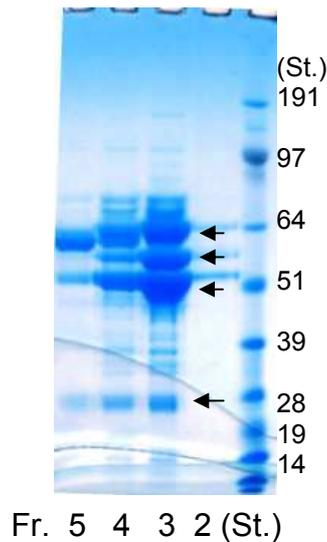
Für Drospirenon war der IEC-Fraktionspool 38-40 aktiv und wurde zur SEC eingesetzt. Anschließend wurde der aktive SEC-Fraktionspool 30-34 zur Albumin-AC verwendet und die erhaltenen Albumin-AC-Fraktionspools 2-5 und 25-30 untersucht.



**Abbildung 23:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für Drospirenon aktiven IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionspools aus Rattenserum; Punkte: maximale Aktivität [pmol/min]; Balken: Proteinmasse [µg]

**Tabelle 10:** Überblick über nach 2.4.7 für Drospirenon aktive IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fractionen aus Rattenserum

Fraktionspool	Serum	IEC-38-40	SEC-30-34	Albumin-AC-2-5	Albumin-AC-25-30
Inkubationszeitpunkte	0; 10 min; 30 min; 1 h; 2 h	0; 1 h; 4 h	0; 1 h; 4 h	0; 1 h; 4 h	0; 1 h; 4 h
Maximale Aktivität [pmol/min]	4,388	1,252	1,277	1,145	0,021
Proteinmasse [µg]	8498,6	4234,4	1586,9	26,7	173,3
Spezifische Aktivität [pmol/(min·mg)]	0,52	0,30	0,80	42,85	0,12
Anreicherung	1,0	0,6	1,6	83,0	0,2
Ausbeute [%]	100,0	4,8	4,9	1,3	0,02



**Abbildung 24:** Gel einer SDS-PAGE der für Drospirenon aktiven Albumin-AC-Fractionen (Fr.) 2-5 aus Rattenserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.2

Bei der dreistufigen Reinigung der für Drospirenon aktiven Fraktionen aus Rattenserum trat bei der ersten Trennstufe (IEC) ein deutlicher Aktivitätsverlust auf, wobei die verbliebene Aktivität bis zur SEC erhalten wurde (**Abbildung 23**). Insgesamt wurden im Albumin-AC-Fraktionspool 2-5 eine Ausbeute an Aktivität von ca. 1 % und eine etwa 83-fache Anreicherung erzielt (**Tabelle 10**). Wiederum war der zuerst eluierte Peak der Albumin-AC (Fraktionen 2-5) derjenige mit der Hauptaktivität. Die SDS-PAGE dieses Fraktionspools ergab vorwiegend folgende Proteinbanden [kDa]: 68; 57; 48 und 23 (**Abbildung 24**, Pfeile v. o.). Für alle weiteren Untersuchungen wurde der Albumin-AC-Fraktionspool 2-5 verwendet.

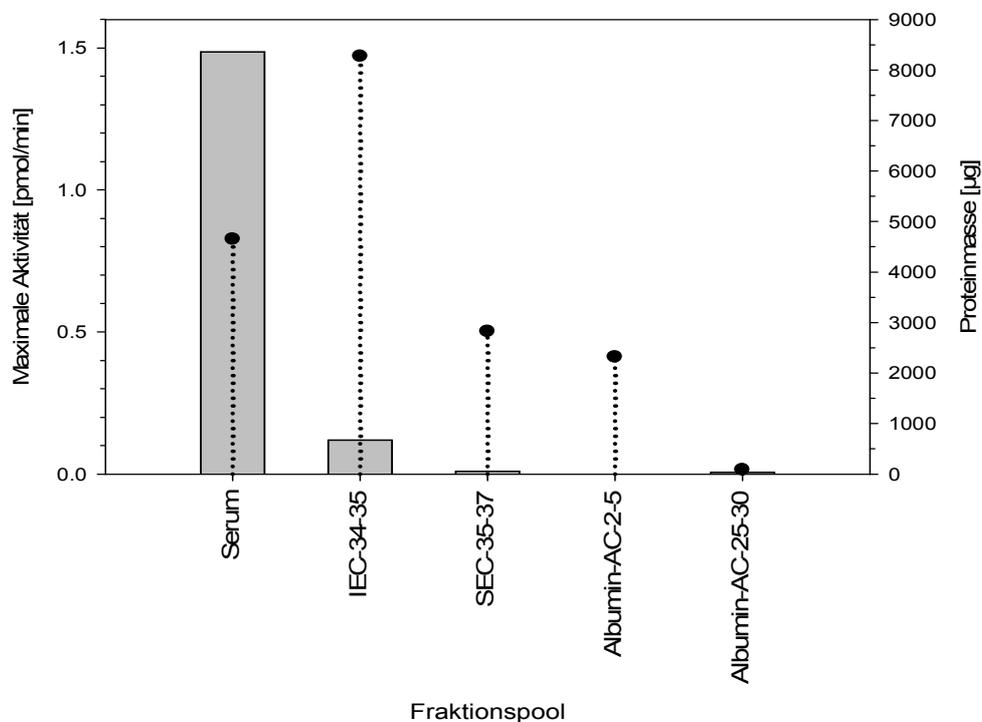
Daneben wurde Rattenserum mittels PON-AC (2.4.4) getrennt und die Fraktionspools 19-30 auf ihre Aktivität im Drospirenon-Assay untersucht. Es wurde genau dieser Pool verwendet, weil zu dem Untersuchungszeitpunkt schon die Anwesenheit von Paraoxonase 1 (PON1) in diesen PON-AC-Fractionen experimentell belegt war (siehe 3.4.1.2). Auf Grund der relativ geringen Aktivität wurden drei PON-AC-Läufe durchgeführt und jeweils die Fraktionen 19-30 gepoolt. Es wurde eine nur geringe Aktivität für Drospirenon gefunden (**Tabelle 11**). Die Ausbeute lag bei ca. 2 % und die Aktivität wurde nicht wesentlich angereichert.

**Tabelle 11:** Überblick über nach 2.4.7 für Drospirenon aktive PON-AC-Fractionen aus Rattenserum

Fraktionspool	Serum	PON-AC-19-30
Inkubationszeitpunkte	0; 10 min; 30 min; 1 h; 2 h	0; 6 h; 10 h
Maximale Aktivität [pmol/min]	4,388	0,252
Proteinmasse [µg]	7675,2	365,6
Spezifische Aktivität [pmol/(min·mg)]	0,572	0,689
Anreicherung	1,0	1,2
Ausbeute [%]	100,0	1,7

### 3.3.4.3 MPA-Assay der isolierten Fraktionen aus Rattenserum

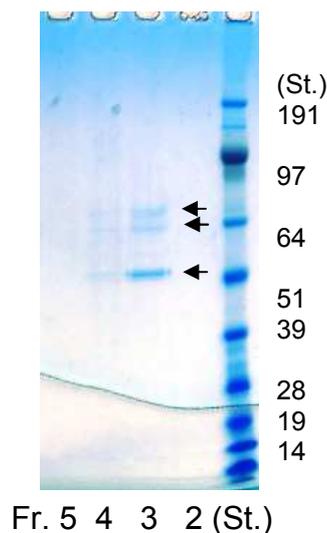
Der IEC-Fraktionspool 34-35 war für MPA aktiv und wurde für die SEC verwendet. In der SEC war der Pool 35-37 aktiv und wurde zur Albumin-AC eingesetzt. Diese resultierte in den Fraktionspools 2-5 und 25-30, die näher untersucht wurden.



**Abbildung 25:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für MPA aktiven IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionspools aus Rattenserum; Punkte: maximale Aktivität [pmol/min]; Balken: Proteinmasse [µg]

**Tabelle 12:** Überblick über nach 2.4.7 für MPA aktive IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fractionen aus Rattenserum

Fraktionspool	Serum	IEC-34-35	SEC-35-37	Albumin-AC-2-5	Albumin-AC-25-30
Inkubationszeitpunkte [min]	0; 1; 5; 10; 20	0; 5; 10	0; 5; 10	0; 5; 10	0; 5; 10
Proteinmasse [ $\mu\text{g}$ ]	8355,23	674,30	55,79	0,41	35,50
Maximale Aktivität [pmol/min]	0,826	1,470	0,502	0,412	0,015
Spezifische Aktivität [pmol/(min·mg)]	0,10	2,18	9,00	995,57	0,42
Anreicherung	1,0	22,0	90,9	10065	4,2
Ausbeute [%]	100,0	29,7	10,1	2,5	0,1



**Abbildung 26:** Gel einer SDS-PAGE der für MPA aktiven Albumin-AC-Fractionen (Fr.) 2-5 aus Rattenserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.3

Für MPA wurde eine deutliche Anreicherung in der dreistufigen Trennkaskade erreicht. Die Albumin-AC erzielte in den zuerst eluierten Fraktionen (2-5) eine Ausbeute von ca. 3 % und eine erhebliche Anreicherung mit dem Faktor 10065 (**Abbildung 25, Tabelle 12**). Die SDS-PAGE der aktiven Albumin-AC-Fractionen 2-5 ergab folgende, relativ schwache Proteinbanden [kDa]: 79, 70 und 52 (**Abbildung 26**: Pfeile v. o.). Der Fraktionspool 2-5 der Albumin-AC wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Außerdem wurde Rattenserum mittels PON-AC (2.4.4) getrennt und die Aktivität der Fraktionspools 19-30 im MPA-Assay bestimmt. Aus den bei Drospirenon angeführten Gründen (3.3.4.2) wurde genau dieser Pool untersucht.

Es wurde trotz der Verwendung des Fraktionspools aus drei PON-AC-Läufen nur eine geringe Aktivität erzielt (**Tabelle 13**): Die Ausbeute erreichte ca. 1 % und keine Anreicherung.

**Tabelle 13:** Überblick über nach 2.4.7 für MPA aktive PON-AC-Fraktionen aus Rattenserum

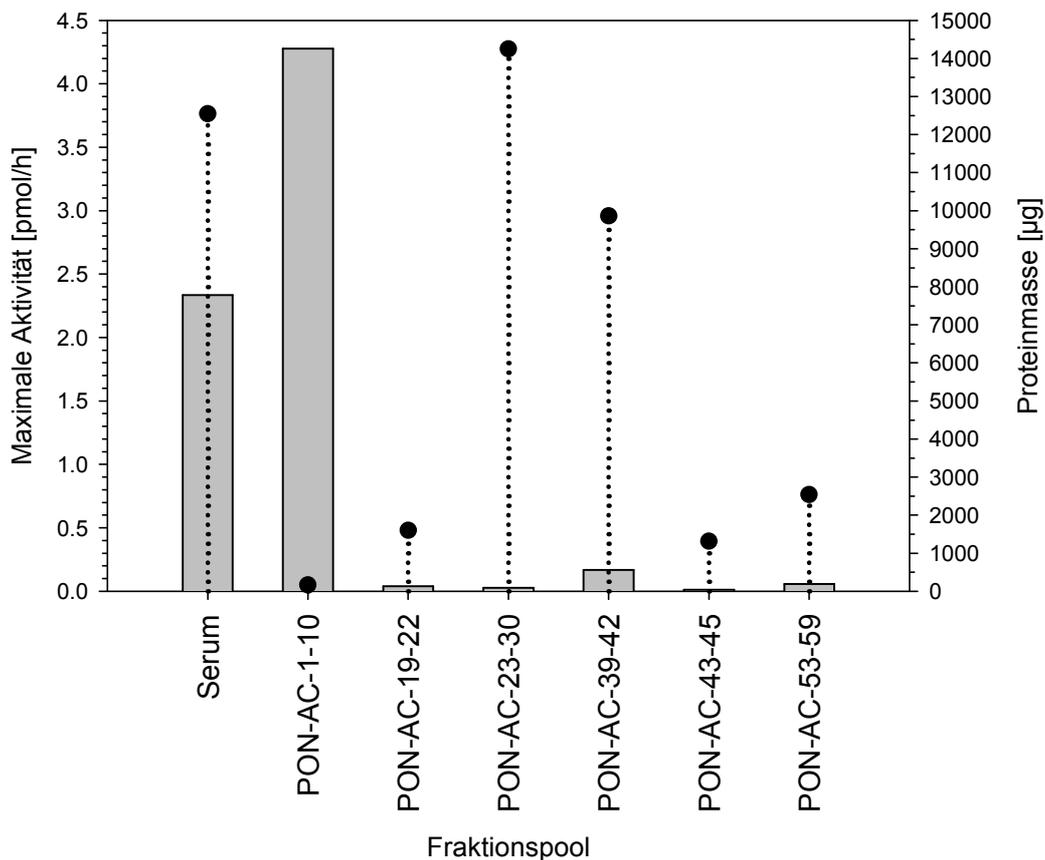
Fraktionspool	Serum	PON-AC-19-30
Inkubationszeitpunkte	0; 1 min; 5 min; 10 min; 20 min	0; 6 h; 10 h
Maximale Aktivität [pmol/min]	0,826	0,027
Proteinmasse [µg]	7675,2	417,0
Spezifische Aktivität [pmol/(min·mg)]	0,108	0,065
Anreicherung	1,0	0,6
Ausbeute [%]	100,0	1,0

#### **3.3.4.4 PRASL-Assay der isolierten Fraktionen aus Rattenserum**

Es wurde versucht, die Fraktionen mit Esteraseaktivität für PRASL mittels IEC (2.4.1) aus Rattenserum zu isolieren. Die gewonnenen Fraktionspools wiesen jedoch nur eine Ausbeute von unter 4 % sowie keine Anreicherung von Aktivität auf (Daten nicht gezeigt). Wegen der vergleichsweise meist höheren Ausbeute und Anreicherung an Aktivität der IEC-Fraktionen für Sagopilone, Drospirenon und MPA (vgl. **Tabelle 9**, **Tabelle 10** und **Tabelle 12**) wurde entschieden, die Reinigung der IEC-Fraktionspools für PRASL nicht weiter zu verfolgen.

Darüber hinaus wurde Rattenserum mittels PON-AC (2.4.4) getrennt.

Untersuchungen zur Aktivität der Fraktionen im NPA-Assay (2.4.5) und zur Reinheit (PAGE, 2.4.6) wurden durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Für die Fraktionspools 23-30 und 39-42 wurden die entsprechenden Fraktionen aus zwei PON-AC-Läufen gepoolt (2.4.7).

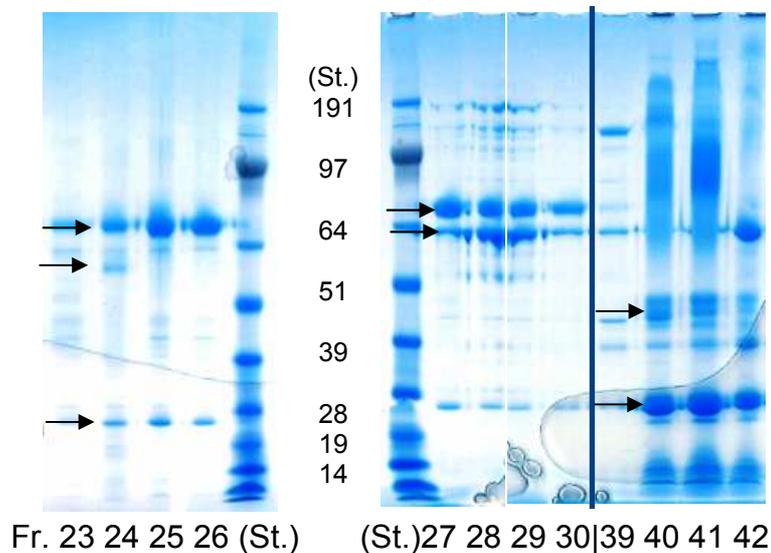


**Abbildung 27:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für PRASL aktiven PON-AC-Fraktionspools aus Rattenserum; Punkte: maximale Aktivität [pmol/h]; Balken: Proteinmasse [µg]

Die PON-AC-Fraktionspools 23-30 und 39-42 wiesen die größte Aktivität für PRASL auf (**Abbildung 27**). Diese Fraktionen entsprachen den Peaks des Waschens der Säule der PON-AC ohne NaCl (Fraktionspool 23-30) bzw. der Elution mit Natriumdesoxycholat (Fraktionspools 39-42; vgl. **Abbildung 18**). Im Pool 23-30 wurde eine Anreicherung von ca. Faktor 92 und eine Ausbeute von etwa 57 % erzielt (**Tabelle 14**). Die für den Fraktionspool 1-10 angegebene Proteinmenge war eventuell durch notwendige Verdünnung zu hoch bestimmt worden. Die SDS-PAGE der PON-AC-Fractionen 23-30 und 39-42 ergab im Wesentlichen folgende Proteinbanden [kDa]: 79-82; 61 und 23 (**Abbildung 28** links: Pfeile v. o.); 82; 70; 42 und 23 (**Abbildung 28** rechts: Pfeile v. o.). Die Fraktionen 40-42 zeigten relativ diffuse Banden bei etwa 100 und 42 kDa sowie im unteren Größenbereich (unter 14 kDa). Auf Grund der relativ geringen Proteinmenge sowie der geringen maximalen Aktivität der für PRASL aktiven PON-AC-Fraktionspools wurde für alle weiteren Untersuchungen (außer für den Western Blot gemäß 2.5.3) nicht mehr mit diesen Pools gearbeitet, sondern mit unfraktioniertem Rattenserum.

**Tabelle 14:** Überblick über nach 2.4.7 für PRASL aktive PON-AC-Fractionen aus Rattenserum

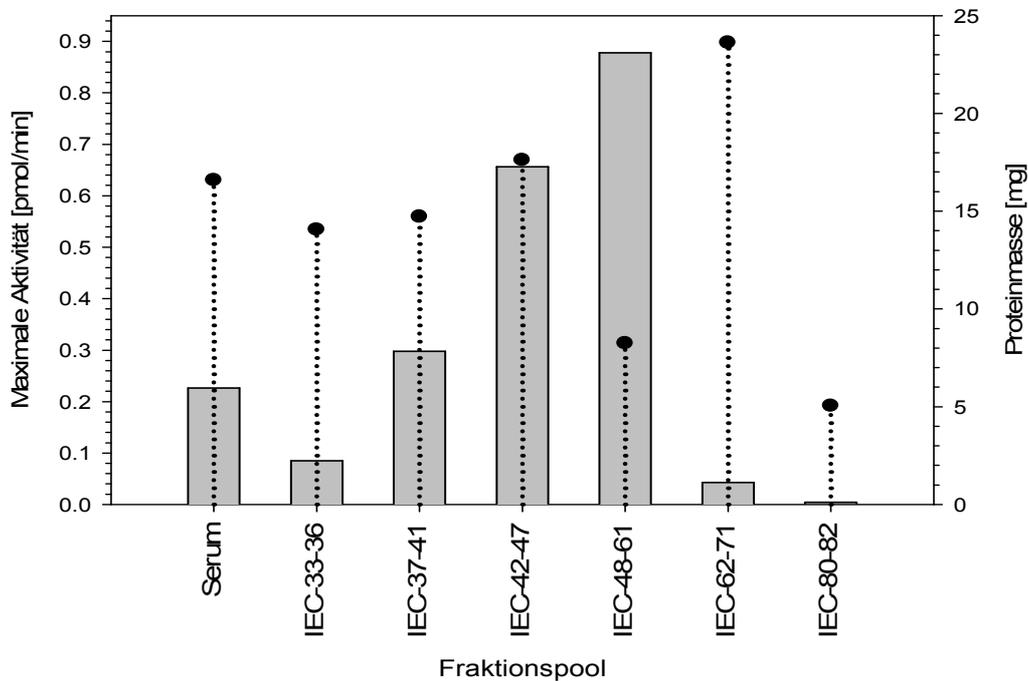
Fraktionspool	Serum	PON-AC-1-10	PON-AC-19-22	PON-AC-23-30	PON-AC-39-42	PON-AC-43-45	PON-AC-53-59
Inkubationszeitpunkte	0; 10 min; 30 min; 1 h; 2 h	0; 5 h; 10 h	0; 5 h; 10 h	0; 2 h; 4 h	0; 2 h; 4 h	0; 5 h; 10 h	0; 5 h; 10 h
Maximale Aktivität [pmol/h]	3,764	0,050	0,480	4,274	2,957	0,393	0,762
Proteinmasse [µg]	7782,2	14256,1	135,5	96,2	559,1	43,0	186,4
Spezifische Aktivität [pmol/(h·mg)]	0,484	0,004	3,544	44,411	5,289	9,135	4,090
Anreicherung	1,00	0,01	7,31	91,81	10,93	18,88	8,46
Ausbeute [%]	100,0	0,4	3,8	56,8	39,3	3,1	6,1



**Abbildung 28:** Gele einer SDS-PAGE der für PRASL aktiven PON-AC-Fractionen (Fr.) 23-30 und 39-42 aus Rattenserum; mittig: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.4. Der vertikale Balken grenzt einen qualitativ gleichartigen Bereich ab.

### 3.3.4.5 Drospirenon-Assay der isolierten Fraktionen aus Hundeserum

Hundeserum wurde mittels IEC getrennt (2.4.1) und die gepoolten Fraktionen im Drospirenon-Assay (2.4.7) untersucht.



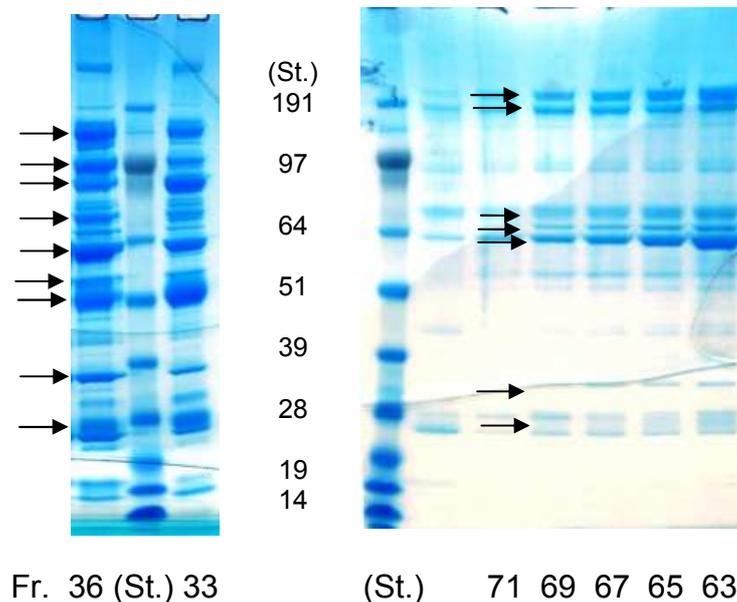
**Abbildung 29:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für Drospirenon aktiven IEC-Fraktionspools aus Hundeserum; Punkte: maximale Aktivität [pmol/min]; Balken: Proteinmasse [mg]

**Tabelle 15:** Überblick über nach 2.4.7 für Drospirenon aktive IEC-Fractionen aus Hundeserum

Fraktionspool	Serum	IEC-33-36	IEC-37-41	IEC-42-47	IEC-48-61	IEC-62-71	IEC-80-82
Inkubationszeitpunkte [h]	0; 1; 3; 6; 12	0; 3; 6	0; 3; 6	0; 3; 6	0; 3; 6	0; 3; 6	0; 3; 6
Maximale Aktivität [pmol/min]	0,630	0,534	0,559	0,669	0,313	0,897	0,192
Proteinmasse [mg]	5,96	2,23	7,84	17,27	23,11	1,13	0,11
Spezifische Aktivität [pmol/(min·µg)]	105,667	239,142	71,315	38,737	13,547	792,506	1755,061
Anreicherung	1,0	2,3	0,7	0,4	0,1	7,5	16,6
Ausbeute [%]	100,0	7,1	7,4	8,9	4,1	11,9	2,5

Der IEC-Fraktionspool 62-71 wies die höchste Aktivität im Drospirenon-Assay auf (**Abbildung 29**). Die Ausbeute betrug ca. 12 % und die Anreicherung ca. Faktor 8 (**Tabelle 15**). Die Aktivität fand sich ansonsten in fast alle anderen Pools auch mit relativ hoher Ausbeute wieder. Auf Grund einerseits einer starken Aufkonzentrierung

der Fraktionspools, andererseits einer eventuell zu hoch gemessenen Proteinkonzentration durch notwendige Verdünnung der Fraktionen für den BCA-Assay (2.4.8) war die Proteinmenge in den Fraktionen 37-61 größer als die des Serums. Es wurde versucht, die IEC-Fraktionspools 33-36 sowie 62-71 mittels der SEC (2.4.2) zu reinigen, da diese Pools die höchste Ausbeute und Anreicherung in der IEC erbrachten. Dieses Vorhaben war leider nicht erfolgreich: Es wurde keine Aktivität mehr in den SEC-Fraktionen im Drospirenon-Assay festgestellt. In der SDS-PAGE der IEC-Fraktionen 33-36 und 63-71 wurden folgende wesentliche Proteinbanden [kDa] gefunden: 137-144; 113; 102; 83; 69; 57; 51; 33 und 23-25 (**Abbildung 30** links: Pfeile v. o.); 165; 152; 80; 73; 67; 28 und 20-23 (**Abbildung 30** rechts: Pfeile v. o.). Daneben wurde ein Vergleich der SDS-PAGE-Gele der Fraktionen von zwei SEC-Läufen durchgeführt, und zwar einerseits von Fraktionen einer SEC, die zur Reinigung des IEC-Fraktionspools 33-36 diente, und andererseits von einer SEC, die zur Reinigung des IEC-Fraktionspools 62-71 ausgeführt wurde. Keine der am intensivsten gefärbten Proteinbanden war während der Reinigung der IEC-Pools in der SEC verloren gegangen (Gele nicht gezeigt).



**Abbildung 30:** Gele einer SDS-PAGE der für Drospirenon aktiven IEC-Fraktionen (Fr.) 33-36 und 63-71 aus Hundeserum; mittig: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.5

Des Weiteren wurde eine PON-AC von Hundeserum (2.4.4) durchgeführt. Aus der Auswertung des Western Blots (2.5.3) war zu dem Zeitpunkt bereits bekannt, welche Fraktionen der PON-AC PON1 enthielten (3.4.2.2). Daher wurden die Fraktionen

19-22, 39-45 und 52-59 aus insgesamt drei PON-AC-Läufen gepoolt und auf Aktivität im Drospirenon-Assay (2.4.7) untersucht.

**Tabelle 16:** Überblick über nach 2.4.7 für Drospirenon aktive PON-AC-Fractionen aus Hundeserum

Fraktionspool	Serum	PON-AC-19-22 und 39-45 und 52-59
Inkubationszeitpunkte [h]	0; 1; 3; 6; 12	0; 6; 10
Maximale Aktivität [pmol/min]	0,630	0,048
Proteinmasse [µg]	5962,1	597,4
Spezifische Aktivität [pmol/(min·mg)]	0,106	0,081
Anreicherung	1,0	0,8
Ausbeute [%]	100,0	2,3

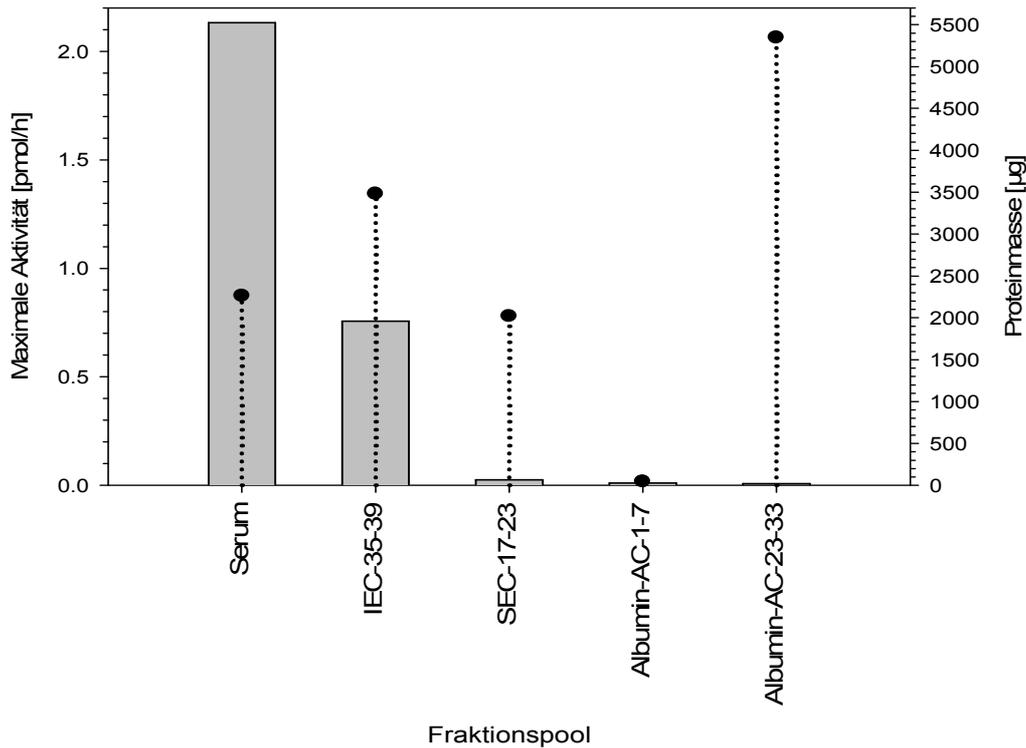
Es wurde nur eine relativ geringe Ausbeute an Aktivität in den untersuchten PON-AC-Fractionen gefunden: Sie lag bei ca. 2 % (**Tabelle 16**). Die Aktivität wurde nicht angereichert.

Um den Einfluss des pH-Wertes auf den Substratumsatz zu untersuchen, wurde die Inkubation mit den genannten PON-AC-Fractionen aus drei weiteren Läufen bei pH 8,5 (statt pH 7,4 gemäß 2.4.7) durchgeführt. Es wurde keine Erhöhung des Substratumsatzes erreicht.

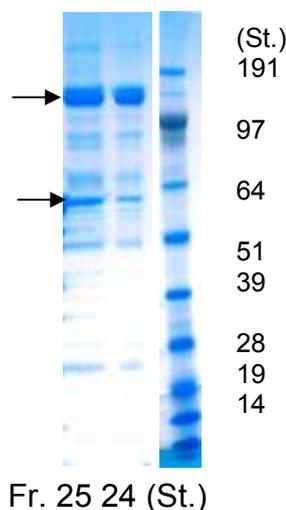
### 3.3.4.6 MPA-Assay der isolierten Fraktionen aus Hundeserum

Die für MPA aktiven Fraktionen wurden aus Hundeserum mittels IEC (2.4.1) isoliert und mittels SEC und Albumin-AC gereinigt. Für die IEC zeigten die Fraktionen 35-39 und für die SEC die Fraktionen 17-23 die höchste Aktivität und wurden jeweils weiter gereinigt. Anders als in den Ergebnissen der Isolierung der für Sagopilone (3.3.4.1), Drospirenon (3.3.4.2) und MPA (3.3.4.3) aktiven Fraktionen aus Rattenserum wies hier der Albumin-AC-Fraktionspool 23-33 die größte Aktivität im MPA-Assay auf (**Abbildung 31**). Die Ausbeute betrug ca. 12 % mit einer 644-fachen Anreicherung (**Tabelle 17**). Diese Fraktionen entsprachen der Elution der Albumin-AC-Säule mit 1,5 M NaCl (3.3.1.3; vgl. **Abbildung 17**). In der SDS-PAGE der Albumin-AC-

Fraktionen 24-25 wurden im Wesentlichen die folgenden Proteinbanden [kDa] gefunden: 140 und 71 (**Abbildung 32**: Pfeile v. o.). Für die Proteinidentifizierung (2.5.2) wurde die SDS-PAGE der Albumin-AC-Fraktionen 24-25 verwendet. Es ist zu bemerken, dass neben dem hier untersuchten IEC-Fraktionspool 35-39 auch der IEC-Pool 62-71 relativ hoch aktiv war. Eine Reinigung mittels SEC und Albumin-AC ergab wiederum eine hohe Ausbeute und Anreicherung an Aktivität im Albumin-AC-Pool 23-33 (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 31:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für MPA aktiven IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionspools aus Hundeserum; rote Punkte: maximale Aktivität [ $\text{pmol/h}$ ]; graue Balken: Proteinmasse [ $\mu\text{g}$ ]



**Abbildung 32:** Gel einer SDS-PAGE der für MPA aktiven Albumin-AC-Fraktionen (Fr.) 24-25 aus Hundeserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.6

**Tabelle 17:** Überblick über nach 2.4.7 für MPA aktive IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fractionen aus Hundeserum

Fraktionspool	Serum	IEC-35-39	SEC-17-23	Albumin-AC-1-7	Albumin-AC-23-33
Inkubationszeitpunkte [h]	0; 1; 4; 8; 12	0; 6	0; 6	0; 6	0; 6
Maximale Aktivität [pmol/h]	0,8729	1,3430	0,7790	0,0173	2,0633
Proteinmasse [ $\mu\text{g}$ ]	5522,8	1958,5	67,6	26,3	20,3
Spezifische Aktivität [pmol/(h·mg)]	0,158	0,686	11,532	0,659	101,831
Anreicherung	1,0	4,3	73,0	4,2	644,3
Ausbeute [%]	100,0	25,6	14,9	0,1	11,8

Daneben wurde Hundeserum mittels PON-AC (2.4.4) getrennt und die Fraktionen 19-22, 39-45 und 52-59 gepoolt (vgl. 3.3.4.5). Die PON-AC ergab eine hohe Ausbeute an Aktivität von ca. 22 % mit einer Anreicherung von ca. Faktor 7 (**Tabelle 18**).

**Tabelle 18:** Überblick über nach 2.4.7 für MPA aktive PON-AC-Fractionen aus Hundeserum

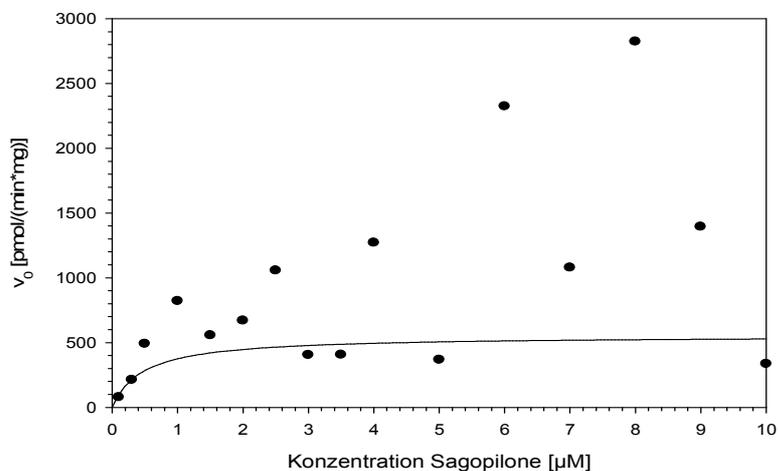
Fraktionspool	Serum	PON-AC-19-22 und 39-45 und 52-59
Inkubationszeitpunkte [h]	0; 1; 4; 8; 12	0; 6; 10
Maximale Aktivität [pmol/h]	0,873	0,639
Proteinmasse [ $\mu\text{g}$ ]	5962,1	637,3
Spezifische Aktivität [pmol/(h·mg)]	0,146	1,003
Anreicherung	1,0	6,9
Ausbeute [%]	100,0	22,0

### 3.3.5 $K_m$ - und $V_{max}$ -Wert-Bestimmung

Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte wurden für Sagopilone, Drospirenon und MPA in den für die jeweiligen Wirkstoffe aktiven Albumin-AC-Fractionen (3.3.4) bestimmt (**Tabelle 19**). Dazu wurden diese Fraktionen jeweils konzentriert und mit Wirkstoff inkubiert (2.4.9). Für PRASL erfolgte die Inkubation in unfraktioniertem Rattenserum aus den unter

3.3.4.4 dargelegten Gründen. Für jeden Wirkstoff wurde ein Michaelis-Menten-Diagramm erstellt (**Abbildung 33** bis **Abbildung 36**).

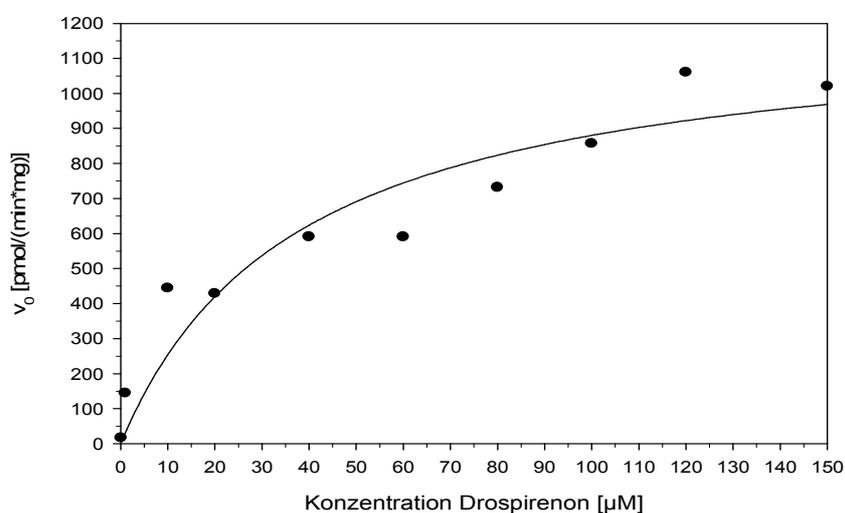
### 3.3.5.1 Sagopilone



**Abbildung 33:** Michaelis-Menten-Diagramm für Sagopilone

Bei Sagopilone streuten die ermittelten Initialgeschwindigkeiten ( $v_0$ ) besonders im höheren Konzentrationsbereich. Das schien an der trotz Verdünnung (2.4.9) noch relativ hohen Aktivität des Fraktionspools zu liegen. Diese erforderte kurze Inkubationszeiträume von 30 s bis 1 min, wobei für diese Inkubationszeitpunkte eine Toleranz von  $\pm 5$  s festgelegt wurde. Eine geringe Abweichung von diesem Toleranzbereich resultierte, für die hohen Substratkonzentrationen, in einer entsprechend großen Streuung des Substratumsatzes. Dieser Streuung wurde mit Hilfe einer gewichteten Regression (nach 2.4.9) begegnet.

### 3.3.5.2 Drospirenon



**Abbildung 34:** Michaelis-Menten-Diagramm für Drospirenon

### 3.3.5.3 MPA

Für MPA wurde die Regression auch ohne den Wert bei 12  $\mu\text{M}$  MPA durchgeführt. Diese ergab jedoch keine erheblich bessere Kurvenanpassung oder wesentlich abweichende Werte für  $K_m$  und  $V_{\max}$ . Es war aber eine gewichtete Regression (2.4.9) aus ähnlichen Gründen notwendig, wie bei Sagopilone (3.3.5.1) angeführt.

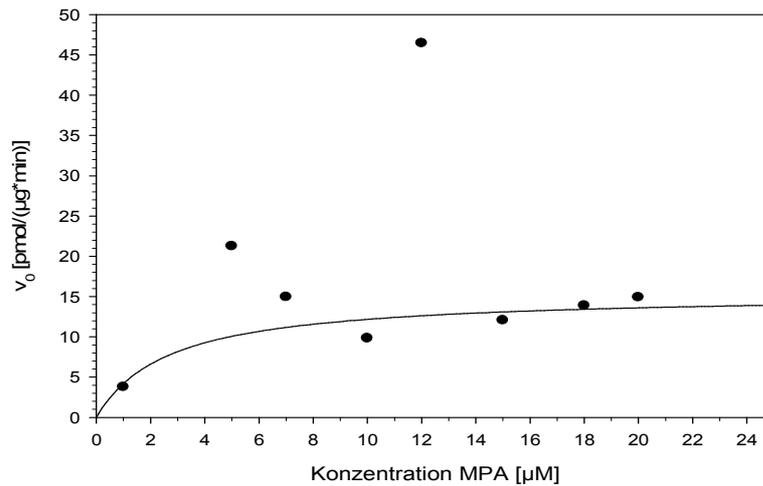


Abbildung 35: Michaelis-Menten-Diagramm für MPA

### 3.3.5.4 PRASL

Bei PRASL wurde die Regression auch ohne den Wert bei 200  $\mu\text{M}$  PRASL durchgeführt, allerdings ohne wesentlich bessere Kurvenanpassung oder stark differierende Werte für  $K_m$  und  $V_{\max}$ .

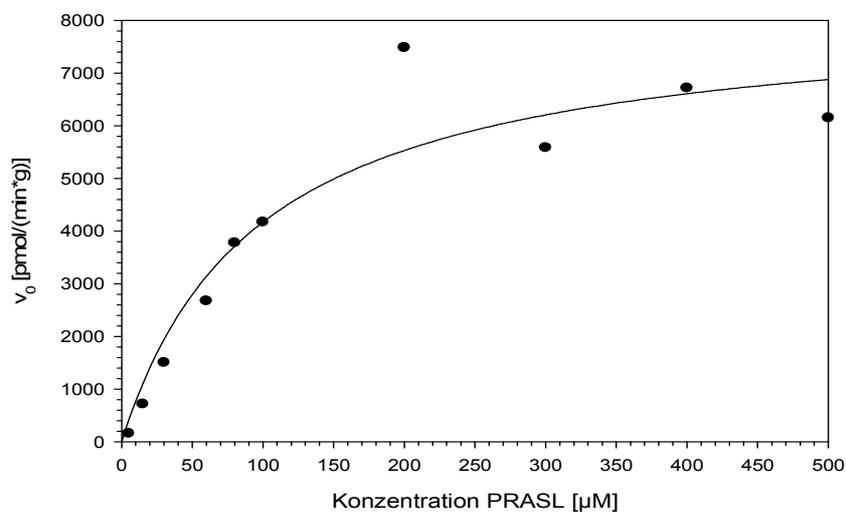


Abbildung 36: Michaelis-Menten-Diagramm für PRASL

**Tabelle 19:**  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte für Sagopilone, Drospirenon und MPA in den jeweils nach 2.4.7 aktiven Albumin-AC-Fraktionspools aus Rattenserum bzw. für PRASL in unfraktionierten Rattenserum

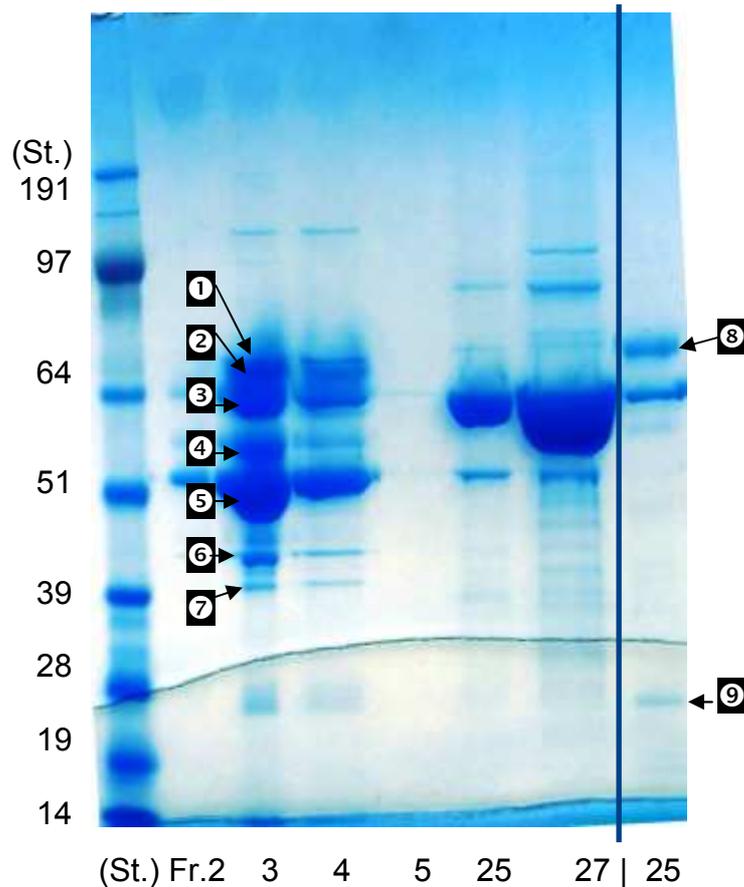
Wirkstoff	Sagopilone	Drospirenon	MPA	PRASL
$V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]	553	1212	15415	8
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	0,48	38	2,7	97

### 3.4 Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS, LC-ESI-MS und Western Blot

#### 3.4.1 Proteinidentifizierung in Rattenserum bzw. Fraktionen aus Rattenserum

##### 3.4.1.1 MALDI-TOF-MS

Es wurde eine SDS-PAGE (2.4.6.1) der für Sagopilone aktiven Albumin-AC-Fraktionen 2-5 (2.4.7) sowie zusätzlich für die Albumin-AC-Fraktionen 25 und 27 durchgeführt (**Abbildung 37**). Die am intensivsten gefärbten Proteinbanden im Gel der SDS-PAGE wurden mittels MALDI-TOF-MS (2.5.1) analysiert. Die hier untersuchten Fraktionen standen zugleich stellvertretend für die für Drospirenon und MPA aktiven Albumin-AC-Fraktionen, weil diese in der SDS-PAGE Proteinbanden größtenteils in vergleichbarer Position im jeweiligen Gel aufwiesen (vgl. **Abbildung 22** für Sagopilone, **Abbildung 24** für Drospirenon, **Abbildung 26** für MPA). Weiterhin wurde die Fraktion 25 aus der PON-AC von Rattenserum für die SDS-PAGE aufgetragen, da diese einer der für PRASL aktiven Fraktionen war (3.3.4.4). Bezüglich der für Sagopilone (Drospirenon und MPA) aktiven Albumin-AC-Fraktionen wurde in Fraktion 3 (Bande Nr. 3 in **Tabelle 20**) Carboxylesterase 1 der Ratte (*Rattus norvegicus*) bei etwa 70 kDa identifiziert, indem zwei Fragmente der tryptisch verdauten Peptide aus der SDS-PAGE-Gelbande über einzeln gemessene MS/MS-Spektren der bekannten Peptidsequenz von Ratten-Carboxylesterase 1 zugeordnet wurden. Der Proteinscore (als Maß für die Signifikanz der Zuordnung) betrug 144 und war somit signifikant ( $p < 0,05$ ) [89]. Die Albumin-AC-Fraktionen 25 und 27 wiesen hauptsächlich jeweils eine intensive Bande bei 70 kDa auf, bei der es sich vorwiegend nur um Serumalbumin handeln sollte, da diese Fraktionen kaum Aktivität für die drei Wirkstoffe zeigten.



**Abbildung 37:** Gel einer SDS-PAGE der für Sagopilone nach 2.4.7 aktiven Albumin-AC-Fractionen (Fr.) 2-5 sowie 25 und 27 und der für PRASL aktiven PON-AC-Fraktion 25 aus Rattenserum; links: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Bedeutung der Nummern (1 bis 9) und Pfeile: siehe Erläuterung (3.4.1.1). Der vertikale Balken grenzt die Albumin-AC-Fractionen (links im Bild) von der PON-AC-Fraktion (rechts im Bild) ab.

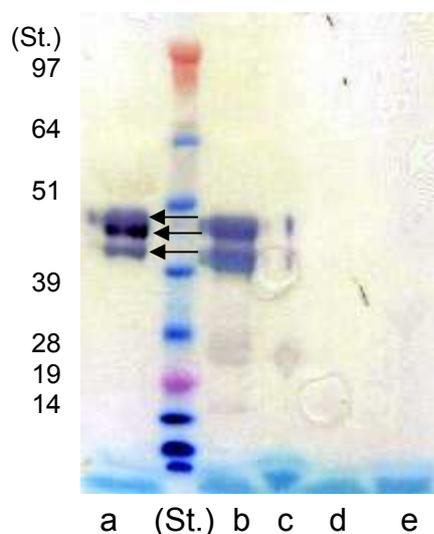
**Tabelle 20:** Durch MALDI-TOF-MS identifizierte Proteine aus der SDS-PAGE in **Abbildung 37**

Nr. (siehe <b>Abbildung 37</b> )	Molmasse [kDa]	Identifizierte Proteine (bei 3 und 9 mit NCBI-Nr., vgl. 2.5.1)
1	80	Ratten-Transthyretin, Kette A
2	76	Ratten-Transthyretin, Kette A
3	70	Ratten-Serumalbumin (gi 12402861); Ratten-Carboxylesterase 1 (gi 2506388)
4	59	Ratten-Serinprotease-Inhibitor-A3K-Präprotein
5	51	Ratten- $\alpha_1$ -Antiproteinase (Ratten- $\alpha_1$ -Antitrypsin)
6	39	Ratten-Apolipoprotein A-IV
7	36	Ratten-Apolipoprotein A-IV
8	80	Ratten- $\alpha_{1B}$ -Glykoprotein
9	23	Ratten-Apolipoprotein A-I (gi 6978515)

In der Fraktion 25 der PON-AC, die für PRASL aktiv war (3.3.4.4), wurde bei 23 kDa Apolipoprotein A-I (Apo A-I) identifiziert (Bande Nr. 9 in **Tabelle 20**). Dazu wurde ein Massenspektrum des tryptisch verdauten Peptidgemisches aus der SDS-PAGE-Gelbande aufgenommen und dieser sog. *peptide mass fingerprint* mit der Peptidsequenz von Apo A-I der Ratte verglichen. Dabei wurde ein signifikanter Proteinscore von 179 erreicht ( $p < 0,05$ ) [89]. Insgesamt wurden 18 Peptidfragmente der Apo-A-I-Sequenz zugeordnet, so dass sich insgesamt eine Übereinstimmung (sog. *sequence coverage*) von 55 % zwischen der gefundenen und der theoretischen Sequenz ergab.

### 3.4.1.2 Western Blot

Es wurde ein Western Blot (2.5.3) für das Gel der SDS-PAGE der PON-AC-Fraktionspools 19-22, 23-30, 39-42, 43-45 und 53-59 durchgeführt (**Abbildung 38**). Die stärkste Färbung wurde in den Fraktionspools 19-22 und (etwas schwächer) 23-30 erreicht, während die anderen Pools ungefärbt blieben. Die in **Abbildung 38** markierte, obere Bande lag bei etwa 45 kDa, die untere bei ca. 38 kDa. Die mittlere, am intensivsten gefärbte Bande des Pools 19-22 befand sich bei etwa 43 kDa. Auf einem anderen Gel (nicht gezeigt) wurden Negativkontrollen (AChE, BChE, Schweineleber-Esterase, proteinfreier Probenpuffer, vgl. 2.5.3) mit dem Ergebnis analysiert, dass diese Proben keine Färbung zeigten. In den PON-AC-Fraktionspools 19-22 und 23-30, die für PRASL aktiv waren (3.3.4.4), wurde also PON1 nachgewiesen.

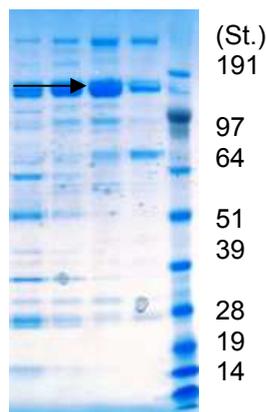


**Abbildung 38:** Western Blot eines Gels der SDS-PAGE der PON-AC-Fractionen 19-22 (a), 23-30 (b), 39-42 (c), 43-45 (d) und 53-59 (e) aus Rattenserum; links: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: siehe Erläuterung 3.4.1.2

### 3.4.2 Proteinidentifizierung in Hundeserum bzw. Fraktionen aus Hundeserum

#### 3.4.2.1 LC-ESI-MS

Es wurde eine SDS-PAGE der für MPA aktiven SEC-Fraktionen (2.4.7) aus Hundeserum durchgeführt. Die im Gel der SDS-PAGE der SEC-Fraktionen 17-23 gefundene Proteinbande bei ca. 138 kDa (Pfeil in **Abbildung 39**) wurde auch im SDS-PAGE-Gel der Albumin-AC-Fraktionen, die von diesem SEC-Fraktionspool stammten, wiedergefunden (**Abbildung 32**: erster Pfeil v. o.). Die markierte Bande der SEC-Fraktion 19 (**Abbildung 39**) wurde nach tryptischen Verdau mittels LC-ESI-MS (2.5.2) untersucht und mittels eines *peptide mass fingerprint*  $\alpha_2$ -Makroglobulin (NCBI-Nr. gi|73997689, vgl. 2.5.1) des Hundes (*Canis familiaris*) gefunden. Der Proteinscore lag bei 1941 ( $p < 0,05$ ) und war damit signifikant [89]. Die *sequence coverage* betrug 20 %, wobei 38 Peptide zugeordnet wurden (vgl. 3.4.1.1).



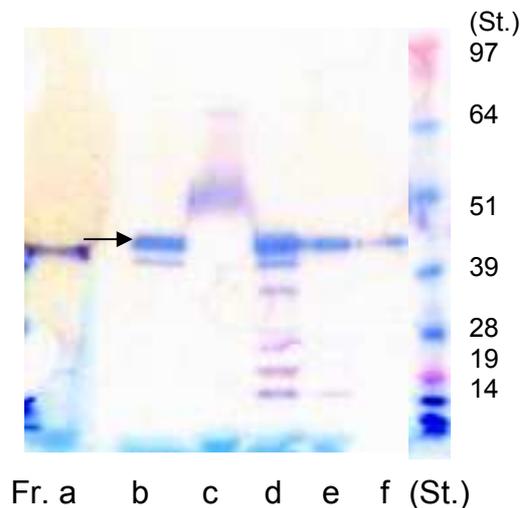
Fr. 23 21 19 17 (St.)

**Abbildung 39:** Gel einer SDS-PAGE der für MPA aktiven SEC-Fraktionen (Fr.) 17-23 aus Hundeserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe siehe 2.4.6.1); Pfeil: Erläuterung siehe 3.4.2.1

#### 3.4.2.2 Western Blot

Ein Western Blot (2.5.3) wurde für das Gel der SDS-PAGE der PON-AC-Fraktionspools 19-22, 23-30, 39-42, 43-45, 52-59 aus Hundeserum durchgeführt (**Abbildung 40**). Die intensivste Färbung wurde in der markierten 41-kDa-Bande der Pools 19-22 und 39-42 festgestellt (**Abbildung 40**: Pfeil). Etwas weniger intensiv war die Bande in den Fraktionspools 43-45 und 52-59 (in vergleichbarer Position) gefärbt.

Für den Pool 23-30 wurde eine relativ diffuse Bande bei etwa 49 kDa gefunden, die geringer gefärbt war. Hundeserum wurde als Positivkontrolle aufgetragen und zeigte bei ca. 41 kDa eine intensiv gefärbte Bande. Die Fraktionen 19-22, 39-45 und 52-59 enthielten also PON1 und wurden daher für die Inkubation mit Drospirenon und MPA (2.4.7) eingesetzt (vgl. 3.3.4.5 und 3.3.4.6).



**Abbildung 40:** Western Blot eines Gels der SDS-PAGE einer Hundeserum-Probe (a), der PON-AC-Fraktionen 19-22 (b), 23-30 (c), 39-42 (d), 43-45 (e) und 52-59 (f) aus Hundeserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeil: siehe Erläuterung 3.4.2.2

## 3.5 Inhibitorscreening

### 3.5.1 Screening in isolierten Fraktionen aus Rattenserum

Im Inhibitorscreening der Albumin-AC-Fraktionen aus Rattenserum, die für Sagopilone, Drospirenon und MPA aktiv waren (2.6.2), erwiesen sich BNPP und Pefabloc SC für alle Fraktionspools als potente Inhibitoren, da beide Inhibitoren bereits in einer Konzentration von jeweils 1 mM im Ansatz eine Inhibition von mindestens 80 % erzielten (**Tabelle 21**). Für den Albumin-AC-Pool, der für Sagopilone aktiv war, zeigten außerdem 0,1 mM Aldrithiol-2, 1 mM APMSF, 20 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM NBS, 10 mM TBA und 1 mM TLCK hinreichende Inhibition (ca. 50-75 % Inhibition). Darüber hinaus war es für NaF, TBA und TLCK möglich, deren Wirksamkeit durch 10-fache Konzentrationserhöhung noch deutlich zu steigern (um ca. 30-50 % bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert).

**Tabelle 21:** Inhibitionswerte [%] (bezogen die jeweilige Positivkontrolle nach 2.6.2) aus dem Inhibitorscreening in konzentrierten Albumin-AC-Pools aus Rattenserum für Sagopilone, Drospirenon und MPA. Inhibitionswerte unter 50 % wurden als „<50“, fehlende Werte als „n.d.“ (Inkubation nicht durchgeführt) angegeben.

Inhibitor (Konzentration im Ansatz)	Inhibition [%]		
	Sagopilone	Drospirenon	MPA
Aldrithiol-2 (0,1 mM)	54,8	<50	<50
APMSF (1 mM)	57,0	<50	<50
BNPP (1 mM)	89,8	98,1	93,1
BNPP (5 mM)	85,7	n.d.	95,0
EDTA (10 mM)	<50	96,1	98,0
EDTA (20 mM)	74,7	n.d.	97,2
NaF (10 mM)	60,7	n.d.	n.d.
NaF (100 mM)	78,1	n.d.	n.d.
NBS (1 mM)	72,1	93,4	73,3
NBS (2 mM)	59,9	n.d.	77,4
Pefabloc® SC (1 mM)	80,4	90,2	83,9
Pefabloc® SC (10 mM)	86,1	n.d.	95,1
Pefabloc® SC (100 mM)	74,4	n.d.	95,8
TAME (1 mM)	<50	<50	50,5
TAME (10 mM)	n.d.	n.d.	51,2
TBA (10 mM)	53,6	<50	<50
TBA (100 mM)	79,2	n.d.	n.d.

Inhibitor (Konzentration im Ansatz)	Inhibition [%]		
	Sagopilone	Drospirenon	MPA
TLCK (1 mM)	51,5	<50	<50
TLCK (10 mM)	75,7	n.d.	n.d.
Zinksulfat (1 mM)	<50	<50	50,5
Zinksulfat (10 mM)	n.d.	n.d.	58,7
Zinksulfat (100 mM)	n.d.	n.d.	96,4

In dem für Drospirenon aktiven Albumin-AC-Pool waren neben BNPP und Pefabloc SC EDTA und NBS stärker wirksam als in dem für Sagopilone aktiven Pool. Bei dem für MPA aktiven Albumin-AC-Pool waren ebenfalls EDTA und NBS wirksam: Die Effizienz von 10 mM EDTA war vergleichbar mit der in dem für Drospirenon aktiven Pool, dagegen war 1 mM NBS etwa gleich wirksam wie in dem für Sagopilone aktiven Pool. Zusätzlich wurde für den MPA aktiven Pool eine relativ geringe Wirksamkeit von 1 mM TAME und 1 mM Zinksulfat gefunden, die bei TAME durch Konzentrationserhöhung nur geringfügig gesteigert wurde, während die Wirksamkeit für 100 mM Zinksulfat erheblich anstieg. Wie für den Drospirenon aktiven Pool waren Aldrithiol-2, APMSF, TBA und TLCK in dem für MPA aktiven Pool nicht ausreichend wirksam.

### 3.5.2 Screening in unfraktioniertem Rattenserum

Im Inhibitorscreening von unfraktioniertem Rattenserum (2.6.2) wurden für Sagopilone, Drospirenon und MPA vorwiegend die Inhibitoren eingesetzt, die im Screening der jeweiligen Albumin-AC-Fractionen (**Tabelle 21**) ausreichend wirksam waren. Daneben wurden auch Inhibitoren für das Screening eingesetzt, die zu Vergleichszwecken untersucht wurden.

Für Sagopilone wurde eine hohe Wirksamkeit der Serinhydrolase-Inhibitoren BNPP und Pefabloc SC gefunden, die bereits bei einer Konzentration von jeweils 1 mM eine Inhibition von über 92 % aufwiesen (**Tabelle 22**). Dies war übereinstimmend mit der hohen Wirksamkeit von BNPP und Pefabloc SC in den Albumin-AC-Fractionen für Sagopilone (**Tabelle 21**). Durch Konzentrationserhöhung wurde die Effizienz von BNPP und Pefabloc SC nicht gesteigert. Eine noch höhere Konzentration (100 mM) von Pefabloc SC in Rattenserum resultierte in einer initialen Fällung; deswegen wurde diese Probe nicht ausgewertet. Des Weiteren waren jeweils 10 mM NaF, TBA und TLCK in Rattenserum sowie in den Albumin-AC-Fractionen (3.5.1) ausreichend wirksam. Durch 10-fache Konzentrationserhöhung wurde für NaF und TBA, wie in den Albumin-AC-Pools, eine Steigerung der Wirksamkeit um ca. 10-25 % (bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert) erreicht. Anders als im Albumin-AC-Pool waren Aldrithiol-2, EDTA und NBS in Rattenserum nicht ausreichend wirksam. Daneben wurde, wie im Albumin-AC-Fraktionspool, für Kupfer(II)-sulfat, TAME und Zinksulfat keine ausreichende Effizienz erzielt.

**Tabelle 22:** Inhibitionswerte [%] (bezogen die jeweilige Positivkontrolle nach 2.6.2) aus dem Inhibitorscreening in Rattenserum für Sagopilone, Drospirenon, MPA und PRASL. Inhibitionswerte unter 50 % wurden als „<50“, fehlende Werte als „n.d.“ (Inkubation nicht durchgeführt) angegeben.

Inhibitor (Konzentration im Ansatz)	Inhibition [%]			
	Sagopilone	Drospirenon	MPA	PRASL
Aldrithiol-2 (0,1 mM)	<50	<50	<50	62,5
BNPP (1 mM)	97,4	64,0	90,7	n.d.
BNPP (5 mM)	95,4	55,0	94,8	<50
EDTA (20 mM)	<50	67,6	<50	99,0
EGTA (10 mM)	n.d.	<50	n.d.	94,0
Kupfer(II)-sulfat (1 mM)	<50	<50	<50	70,0
NaF (10 mM)	74,2	n.d.	n.d.	n.d.
NaF (100 mM)	92,7	50,6	56,5	97,5
Pefabloc® SC (1 mM)	92,1	61,8	92,3	n.d.

Inhibitor (Konzentration im Ansatz)	Inhibition [%]			
	Sagopilone	Drospirenon	MPA	PRASL
Pefabloc® SC (10 mM)	89,8	66,1	93,2	<50
TAME (10 mM)	<50	<50	<50	65,4
TBA (10 mM)	87,1	n.d.	n.d.	n.d.
TBA (100 mM)	95,8	99,4	<50	98,6
TLCK (10 mM)	82,9	<50	n.d.	66,2
Zinksulfat (10 mM)	<50	<50	54,9	79,1

Für Drospirenon wurde die hohe Wirksamkeit von BNPP, EDTA und Pefabloc SC im Albumin-AC-Pool (3.5.1) für Rattenserum bestätigt. Allerdings lagen die Inhibitionswerte in Rattenserum deutlich unterhalb der Werte des Albumin-AC-Pools. Durch Konzentrationserhöhung wurde die Wirksamkeit von BNPP und Pefabloc SC nicht oder nur geringfügig gesteigert. Wie bei Sagopilone wurde die hohe Effizienz von NBS im Albumin-AC-Pool für Rattenserum nicht gefunden. Dagegen wurde die fehlende ausreichende Wirksamkeit von Aldrithiol-2, APMSF, EGTA, Kupfer(II)-sulfat, TAME und Zinksulfat im Albumin-AC-Pool für Rattenserum bestätigt. Weiterhin wurde für 100 mM TBA eine hohe Effizienz in Rattenserum festgestellt, während 100 mM NaF gering und 10 mM TLCK nicht ausreichend wirksam waren.

Bei MPA waren, wie im Albumin-AC-Pool (3.5.1) BNPP und Pefabloc SC hoch wirksam. 1 mM Pefabloc SC war in Rattenserum um ca. 10 % wirksamer als im Albumin-AC-Pool. Wie bei Sagopilone wurde die hohe Wirksamkeit von EDTA und NBS im Albumin-AC-Pool für Rattenserum nicht erreicht. Die fehlende ausreichende oder nur geringe Effizienz von Aldrithiol-2, APMSF, Kupfer(II)-sulfat und TAME im Fraktionspool wurde für Rattenserum bestätigt. Die geringe Wirksamkeit von 10 mM Zinksulfat im Albumin-AC-Pool wurde für Rattenserum auch gefunden. Eine höhere Konzentration von Zinksulfat (100 mM) ergab in Rattenserum eine Fällung; diese Probe wurde daher nicht ausgewertet. 100 mM NaF waren, wie bei Drospirenon, in Rattenserum nur gering wirksam. Anders als bei Drospirenon waren 100 mM TBA für MPA in Rattenserum nicht wirksam.

Für PRASL war die hohe Wirksamkeit von EDTA und EGTA in Rattenserum aufgefallen. Dagegen waren BNPP und Pefabloc SC nicht ausreichend wirksam. Des Weiteren zeigten Aldrithiol-2, Kupfer(II)-sulfat, TAME und Zinksulfat in Rattenserum eine höhere Effizienz für PRASL als für die drei anderen Wirkstoffe. Die Wirksamkeit von je 100 mM NaF und TBA war vergleichbar für Sagopilone in Rattenserum. 10 mM TLCK waren für PRASL effizienter wirksam als für Drospirenon in Rattenserum, aber geringer als für Sagopilone. Für APMSF und NBS wurde bezogen auf PRASL, in Übereinstimmung mit den anderen Wirkstoffen, keine Wirksamkeit festgestellt.

### **3.5.3 Screening in unfraktioniertem Hundeserum**

In Hundeserum wurde das Inhibitorscreening für die beiden in dieser Matrix instabilen Wirkstoffe Drospirenon und MPA ausgeführt (2.6.2).

**Tabelle 23:** Inhibitionswerte [%] (bezogen die jeweilige Positivkontrolle nach 2.6.2) aus dem Inhibitorscreening in Hundeserum für Drospirenon und MPA. Inhibitionswerte unter 50 % wurden als „<50“ angegeben.

Inhibitor (Konzentration im Ansatz)	Inhibition [%]	
	<b>Drospirenon</b>	<b>MPA</b>
APMSF (10 mM)	58,7	75,8
BNPP (5 mM)	<50	70,2
EDTA (20 mM)	95,6	<50
EGTA (10 mM)	95,4	<50
Kupfer(II)-sulfat (1 mM)	73,6	<50
NaF (100 mM)	94,2	<50
Pefabloc® SC (10 mM)	78,9	82,3
TBA (100 mM)	93,9	<50
TLCK (10 mM)	75,0	88,1
Zinksulfat (1 mM)	69,4	<50

Für Drospirenon fiel die hohe Effizienz von EDTA bzw. EGTA in Hundeserum auf (**Tabelle 23**), die deutlich über der in Rattenserum lag (**Tabelle 22**). Pefabloc SC war in Hundeserum für Drospirenon stärker wirksam als in Rattenserum. BNPP war dagegen in Hundeserum nicht ausreichend wirksam, aber in Rattenserum. Die Wirksamkeit von Kupfer(II)-sulfat, NaF und TLCK für Drospirenon in Hundeserum lag über der in Rattenserum. 100 mM TBA waren in Hundeserum vergleichbar wirksam wie in Rattenserum. 1 mM Zinksulfat in Hundeserum war effizienter wirksam als 10 mM in Rattenserum. Die Inkubation von 10 mM Zinksulfat in Hundeserum ergab eine Fällung und wurde somit nicht ausgewertet. Anders als in Rattenserum zeigte APMSF in Hundeserum geringe, aber ausreichende Wirksamkeit für Drospirenon. Hingegen waren NBS und TAME sowohl in Hunde- als auch in Rattenserum nicht ausreichend wirksam.

Für MPA ließ sich feststellen, dass BNPP, NaF, Pefabloc SC und Zinksulfat in Hundeserum weniger wirksam als in Rattenserum waren. Wie in Rattenserum waren EDTA, Kupfer(II)-sulfat, NBS, TAME, TBA in Hundeserum nicht ausreichend

wirksam. Eine ausreichende Wirksamkeit in Hundeserum wurde für je 10 mM APMSF und TLCK gefunden.

Im Vergleich zu Drospirenon im Hundeserum fiel für MPA die fehlende ausreichende Wirksamkeit von EDTA, EGTA, Kupfer(II)-sulfat, NaF, TBA und Zinksulfat auf, während APMSF, BNPP, Pefabloc SC und TLCK für MPA besser wirksam waren.

# **DISKUSSION**

## 4. Diskussion

### 4.1 Bestimmung der Serumesterase-Aktivität mittels HPLC-Esterase-Assay sowie pH-Stat-Titration

#### 4.1.1 HPLC-Esterase-Assay

Die Esteraseaktivität von Ratten- und Hundeserum wurde mittels der radioaktiv markierten Substrate  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid und  $^{14}\text{C}$ -NPA verglichen.

ATC-Iodid ist als Substrat der ChE, d. h. AChE und BChE, einsetzbar, obwohl das natürliche Substrat der AChE Acetylcholin ist. Für BChE ist bis jetzt kein physiologisches Substrat bekannt. Dennoch kann für die gemeinsame Aktivitätsbestimmung von AChE und BChE ATC eingesetzt werden, da beide Enzyme dieses Substrat umsetzen können und man dies auch quantitativ auswerten kann [11,18,90,91].

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde eine etwas höhere Initialgeschwindigkeit der Spaltung von  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid in Hundeserum als in Rattenserum gefunden (91 vs. 88 mU; siehe **Tabelle 6**). Der Unterschied wurde auch in der jeweiligen Halbwertszeit angedeutet, war aber nicht signifikant. Der Abbau von  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid verlief in Serum beider Spezies im Inkubationszeitraum nach einer Kinetik nullter Ordnung, d. h. die Umsatzgeschwindigkeit blieb im Wesentlichen konstant. Folglich lag die verwendete Substratkonzentration (1 mM) über den  $K_m$ -Werten der  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid-spaltenden Esterasen. In Übereinstimmung damit wurde für Hundeserum ein  $K_m$ -Wert von 0,18 mM (bezogen auf Acetylcholinchlorid) [92] und für Ratten-BChE 0,06 mM (bezogen auf ATC) berichtet [18].

Bezieht man die Initialgeschwindigkeit auf das eingesetzte Serumvolumen (100  $\mu\text{L}$ ), resultiert eine Aktivität von ca. 0,91  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  in Hundeserum bzw. 0,88  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  in Rattenserum. Für Hundeserum wurde in der Literatur eine Aktivität von 1,02 bis 1,2  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  bezogen die Spaltung von Acetylcholinchlorid angegeben [92,93]. Acetylcholinchlorid weist eine etwas höhere Umsatzrate (gemessen an  $k_{\text{cat}}$  bei humaner BChE [90]) als das hier eingesetzte Thioanalogon Acetylthiocholin auf. Daher lag der hier ermittelte Wert der Spaltung von  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid bezogen auf Hundeserum geringfügig unter berichteten Werten [93].

Die Literaturangabe zur Aktivität in Rattenserum (0,36  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  [93]) wich deutlich von der hier gefundenen Aktivität ab. Es wurde eine etwa 3- bis 3,5-fach

höhere Aktivität von Hundeserum verglichen mit Rattenserum in Bezug auf die Spaltung von Acetylcholinsalzen beschrieben [93,94]. Dabei wurde jedoch insbesondere für die Ratten nicht angegeben, von welchem Geschlecht und von welchem Zuchtstamm der Tiere das Plasma oder Serum untersucht wurde. Plasma und Serum unterschieden sich nach Augustinsson [94] nicht in der Esteraseaktivität für zahlreiche Spezies bezogen auf die Spaltung verschiedener Substrate. Es ist aber bekannt, dass bei Ratten, anders als bei Hunden [92], auf Grund einer starken endokrinen Regulation die Aktivität der Serum-ChE bei weiblichen Tieren etwa um den Faktor 2,6 bis 4 höher als bei männlichen Tieren liegt [95,96]. Weiterhin kann die Aktivität der AChE und BChE bis zu Faktor 2 zwischen verschiedenen Zuchtstämmen von Ratten und die BChE-Aktivität auch interindividuell innerhalb eines Stamms variieren [97]. Illsley *et al.* [96] haben eine Aktivität von etwa  $0,37 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten und  $1,4 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  bei weiblichen Ratten dieses Stamms ermittelt, wobei ATC-Iodid als Substrat verwendet wurde. Wenn man unter Berücksichtigung eines äquimolaren Gemisches aus Serum von männlichen und weiblichen Tieren (so wie es in dieser Arbeit nach 2.2.1 verwendet wurde) den Mittelwert aus diesen beiden Aktivitäten berechnet, gelangt man zu etwa  $0,89 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ , der den hier ermittelten Wert von  $0,88 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  bestätigt. Der arithmetische Mittelwert kann hier gebildet werden, da das Serumvolumen (und die darin enthaltene Enzymmenge) direkt proportional zur Esteraseaktivität ist [54]. Ein Einfluss durch die Betrachtung zweier verschiedener Stämme (Sprague-Dawley und Wistar) scheint hier nicht relevant zu sein, da Edwards *et al.* [97] für Sprague-Dawley-Ratten eine 1,2-fach höhere Aktivität der Serum-AChE im Vergleich zu Wistar-Ratten, aber zugleich eine doppelt so große Aktivität der Serum-BChE für Wistar-Ratten berichteten. Dies bedeutet, dass sich für die hier durchgeführte Bestimmung der *Gesamt*-ChE-Aktivität mittels  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid der Unterschied zwischen Sprague-Dawley- und Wistar-Ratten nivelliert.  $^{14}\text{C}$ -NPA ist ein unspezifisches Substrat für CE, PON, ChE sowie weitere Proteine mit sog. *esterase-like activity*, d. h. Proteine, die mit NPA reagieren, aber eigentlich keine Esterasen sind (wie z. B. Albumin, Insulin und  $\alpha$ -Chymotrypsin) [83,98-101]. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde, gemessen an der Initialgeschwindigkeit, eine geringfügig höhere Aktivität der Spaltung von  $^{14}\text{C}$ -NPA in Rattenserum im Vergleich zu Hundeserum gefunden (289 vs. 236 mU; siehe **Tabelle 6**). Die Halbwertszeit (bezogen auf die initiale Krümmung der jeweiligen Abbaukurve)

war in Rattenserum wesentlich kleiner als in Hundeserum (0,4 vs. 1,2 min). Der Abbau von  $^{14}\text{C}$ -NPA verlief in Serum beider Spezies nach einer Kinetik erster Ordnung, d. h. er war über die Zeit nicht konstant, sondern konzentrationsabhängig. In Rattenserum lag dies wahrscheinlich an der zu geringen Substratkonzentration (1 mM), die auf Grund des initialen hohen Substratumsatzes zu einer Depletion des Substrats führte und die Abbaukurve im weiteren Zeitverlauf abflachte. Offensichtlich lag die verwendete Substratkonzentration unterhalb der  $K_m$ -Werte der  $^{14}\text{C}$ -NPA-spaltenden Esterasen. Für eine aus Rattenserum gereinigte CE wurde (bezogen auf NPA) ein  $K_m$ -Wert von 2,3 mM berichtet [102]. Der gleiche Wert wurde von McCracken *et al.* [103] für Phenylacetat, einem typischen PON-Substrat mit höherer Umsatzrate als NPA [104], ermittelt. Daher kann für die hier verwendete Substratkonzentration von 1 mM  $^{14}\text{C}$ -NPA ein nicht-linearer Abbau in Rattenserum erklärt werden. Eine andere Ursache für den exponentiellen Abbau könnte die schnelle Acetylierung (sog. *initial burst*) von Esterasen durch  $^{14}\text{C}$ -NPA sein, wobei der reaktivierende, deacylierende Reaktionsschritt langsamer als die Acylierung verläuft und die Abbaukurve deshalb mit zunehmender Zeit ein Plateau erreicht. Dies wurde z. B. für  $\alpha$ -Chymotrypsin [13] sowie humanes Serumalbumin [105] beschrieben und unterstreicht die unspezifische Spaltung von NPA durch schnelle Reaktion mit zahlreichen Proteinen.

Für Hundeserum wurde (bezogen auf NPA) ein  $K_m$ -Wert von 0,13 mM angegeben [92]. Daher sollte der Abbau von  $^{14}\text{C}$ -NPA in Hundeserum linear verlaufen. Man könnte tatsächlich durch die in **Abbildung 6** dargestellten Punkte für Hundeserum auch eine Gerade legen ( $R^2=0,949$ ), jedoch würde der Kurvenverlauf dabei visuell nicht ausreichend beschrieben. Der nicht-lineare Abbau in Hundeserum könnte durch die im Vergleich zu Rattenserum geringere Umsatzrate (gemessen an  $V_{\max}$ ) von NPA erklärt werden. Ecobichon hat einen  $V_{\max}$ -Wert von 0,28  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  für NPA in Hundeserum berichtet [92], während McCracken *et al.* einen Wert von 290  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  für Phenylacetat in Rattenplasma angegeben haben [103]. Daraus ist ersichtlich, dass NPA in Hundeserum wesentlich langsamer als Phenylacetat und wahrscheinlich auch langsamer als NPA in Rattenserum gespalten wird. Die Abbaukurve von  $^{14}\text{C}$ -NPA in Hundeserum flacht also in den hiesigen Untersuchungen mit längerer Inkubationszeit ab, weil nach der schnellen, unspezifischen Acylierungsreaktion die Konzentration der  $^{14}\text{C}$ -NPA-spaltenden Enzyme und Proteine, die noch nicht mit  $^{14}\text{C}$ -NPA reagiert haben, abnimmt und die

Reaktion trotz des Substratüberschusses in eine Kinetik erster Ordnung übergeht. Der wesentliche Grund liegt in der schnellen Acylierung NPA-spaltender Enzyme, die dann viel langsamer deacyliert werden, so dass es zu einer scheinbaren Enzymdepletion kommt. Zusätzlich trägt der im Vergleich zu Rattenserum langsamere Substratumsatz (gemessen an  $V_{max}$ ) zum flachen Kurvenverlauf bei. Auf Grund des initial schnellen, dann abflachenden Abbaus von  $^{14}\text{C}$ -NPA in Rattenserum und des nicht-linearen Abbaus in Hundeserum ergaben sich zwischen den Werten der drei letzten Inkubationszeitpunkte signifikante Unterschiede.

Berechnet man die Aktivität bezogen auf die  $^{14}\text{C}$ -NPA-Spaltung in Ratten- und Hundeserum pro eingesetztem Serumvolumen (100  $\mu\text{L}$ ), erhält man 2,89  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  in Rattenserum und 2,36  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  in Hundeserum. Für Rattenplasma wurde eine Aktivität von 2,5  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  bezogen auf *p*-Nitrophenylbutyrat angegeben [106] und der hier gefundene Wert damit bestätigt. Im Gegensatz dazu berichtete Ecobichon einen Aktivität von 0,12  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  bezogen auf die NPA-Spaltung in Hundeserum [92]. Dazu ist anzumerken, dass die für die hier ermittelte Initialgeschwindigkeit ein Substratumsatz von bis zu etwa 30 % akzeptiert wurde und daher die Aktivität möglicherweise zu hoch lag. Vergleicht man allerdings die Aktivität von Rattenserum im Vergleich zu Hundeserum in der hiesigen Untersuchung, wurde der geringe Unterschied von etwa Faktor 1,1-1,2 auch von Augustinsson berichtet [94].

Zusammenfassend lässt sich für  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid sagen, dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivität von Ratten- und Hundeserum ergeben hat. Das Substrat wurde in Serum beider Spezies mit einer Kinetik nullter Ordnung abgebaut. Allenfalls tendenziell wies Hundeserum eine höhere Aktivität als Rattenserum auf. In der Literatur war dieser Unterschied deutlich zu Tage getreten, allerdings wurde nicht auf die genaue Herkunft des Plasmas oder Serums eingegangen, wobei dies für ChE erforderlich zu sein scheint und die Diskrepanz erklären kann.

Für den Abbau von  $^{14}\text{C}$ -NPA wurde im fortgeschrittenen Reaktionsverlauf ein signifikanter Unterschied gefunden: In Hundeserum lag die umgesetzte Stoffmenge an  $^{14}\text{C}$ -NPA unter der in Rattenserum. Bezogen auf die Initialgeschwindigkeit hingegen war, in Übereinstimmung mit einer Literaturangabe, die Aktivität in Rattenserum geringfügig höher als in Hundeserum (etwa Faktor 1,2).  $^{14}\text{C}$ -NPA wurde in Serum beider Spezies nach einer Kinetik erster Ordnung umgesetzt. In Rattenserum schien dies an einer Substratdepletion zu liegen, während in

Hundeserum wahrscheinlich die Konzentration von Enzymen bzw. Proteinen, die noch  $^{14}\text{C}$ -NPA spalten konnten, mit zunehmender Inkubationszeit abfiel und der Substratumsatz (bezogen auf  $V_{\max}$ ) ohnehin niedriger als in Rattenserum war.

#### 4.1.2 Die pH-Stat-Titration

Die pH-Stat-Titration wurde mit MeOct als einem Substrat für CE durchgeführt. Es wurden zahlreiche Substrate für CE beschrieben, vor allem lipophile Ester von Monocarbonsäuren sowie Glyceryltriester [91,107-109]. MeOct ist ein solcher lipophiler, aliphatischer Monoester. Es wurde mit der ursprünglichen Absicht ausgesucht, einen HPLC-Assay mit dem radioaktiv markierten Substrat zu entwickeln. MeOct stellte sich als ein Kompromiss zwischen ausreichender Aktivität gegenüber CE [110,111] und niedrigem Dampfdruck (gemessen an dem relativ hohen Siedepunkt von ca.  $193^{\circ}\text{C}$ ) [112] dar, denn für diese lipophilen Monoester wäre in gewissen Maße eine Verdampfung bereits bei Raumtemperatur zu erwarten. Diese war auch tatsächlich organoleptisch durch den Geruch wahrnehmbar und wäre gerade in Hinblick auf eine radioaktive Markierung des Moleküls aus Strahlenschutzgründen kritisch. Letztlich war die Etablierung eines HPLC-Assays auf Grund von Stabilitätsproblemen der Reaktionsansätze insbesondere während der Lagerung im Autosampler der HPLC-Anlage nicht erfolgreich. Es wurde daher auf die radioaktive Markierung verzichtet und die pH-Stat-Titration als bekannte Methode eingesetzt (siehe 2.2.2) [113].

Bei der hier durchgeführten pH-Stat-Titration wurde eine wesentlich höhere Initialgeschwindigkeit für die Spaltung von MeOct in Rattenserum im Vergleich zu Hundeserum festgestellt (3,8 vs. 0,11 U; siehe 3.1.2). Dieser erhebliche Aktivitätsunterschied von Faktor 35 wurde in geringerer Ausprägung (Faktor 15) auch von Augustinsson für den Vergleich der Spaltung von Triacetin (Triacetylglycerol) oder Isoamylbutyrat in Ratten- und Hundeserum gefunden [94].

Bezieht man die hier bestimmte Initialgeschwindigkeit auf das eingesetzte Serumvolumen (1,5 mL), erhält man für Rattenserum  $2,5 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  und für Hundeserum  $0,07 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ . Die Größenordnung dieser Aktivität wurde für Rattenserum durch Tsujita *et al.* bestätigt: Sie fanden  $3,14 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  bezogen auf die Spaltung von Methylbutyrat (MeBut) [114]. Für Hundeserum hingegen wurde, ebenfalls bezogen auf MeBut, ein Wert von  $1,2 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$  durch Richter *et al.* ermittelt [115]. Allerdings räumten diese Autoren die Fehlerhaftigkeit ihrer Methode

insbesondere bei kleinen Aktivitätswerten ein, so wie es z. B. bei der Bestimmung der MeBut-Spaltung durch CE in Hundeserum der Fall ist [115].

In Rattenserum verlief der Abbau von MeOct über die Zeit linear. Folglich lag der  $K_m$ -Wert unterhalb der verwendeten Substratkonzentration (50 mM). Übereinstimmend damit wurde für eine aus Rattenserum isolierte CE ein  $K_m$ -Wert von 7 mM bezogen auf MeBut angegeben [114]. Für Hundeserum wurde in der Literatur kein  $K_m$ -Wert beschrieben. Es wäre allerdings zu erwarten, dass der Abbau bei einer solch hohen Substratkonzentration über die Zeit konstant verlaufen sollte [110]. Dies traf aber hier vermutlich aus methodischen Gründen nicht zu: Die automatische Bürette gibt bei Feststellung eines pH-Wert-Abfalls stets einen kleinen Überschuss an NaOH-Lösung in das Reaktionsgemisch. Ist die Enzymkonzentration, d. h. das Serumvolumen, zu klein, erkennt das System den geringen Substratumsatz nicht und die Abbaukurve bleibt auf einem Plateau stehen. Zusätzlich trägt wahrscheinlich die generell geringe Aktivität der MeOct-Spaltung in Hundeserum zu diesem Reaktionsverlauf bei. Richter *et al.* [115] jedenfalls haben einen nahezu linearen Verlauf über 30–40 min erwähnt, wobei sie aber ein Serumvolumen von 0,2 mL in 4 mL Reaktionsansatz (d. h. 5 % [V/V]) verwendeten (statt der hier zu 50 mL Substratlösung zugegebenen 1,5 mL Serum, d. h. ca. 3 % [V/V]).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Rattenserum eine wesentlich höhere Aktivität der Spaltung von MeOct gegenüber Hundeserum aufwies (etwa Faktor 35). Ein gravierender Unterschied wurde auch in der Literatur beschrieben. Der Abbau verlief in Rattenserum nach einer Kinetik nullter Ordnung, während in Hundeserum ein exponentieller Kurvenverlauf gegen eine Asymptote gefunden wurde. Neben der eingeschränkten Sensitivität der hier angewandten pH-Stat-Titrationstechnik war vermutlich auch das zu geringe Serumvolumen eine Ursache für den Verlauf des Abbaus von MeOct in Hundeserum.

## **4.2 Vergleich der Serumesterase-Aktivität bezüglich der vier Wirkstoffe**

### **4.2.1 Vergleich der Aktivität von frisch gewonnenem und tiefgefrorenem Rattenserum**

Die Esteraseaktivität von Rattenserum, das zum einen nach der Gewinnung (2.1.3.1) für ca. 14 Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurde (sog. tiefgefrorenes Serum) oder zum anderen nach der Gewinnung, mit Zwischenlagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$ , innerhalb eines

Arbeitstages verwendet wurde (sog. Frischserum oder frisch gewonnenes Serum), wurde durch Inkubation mit Sagopilone, Drospirenon, MPA und PRASL (2.3.1) verglichen. Es sollte festgestellt werden, ob für die geplanten Proteintrennungsverfahren aus Serum an Stelle von Frischserum auch tiefgefrorenes Serum verwendet werden kann. Dies würde eine erhebliche Verbesserung der Planung und Durchführung der Proteinisolierungsschritte bedeuten, da man dann einen zeitlich größeren Spielraum zwischen Serumgewinnung und Proteintrennung zur Verfügung hätte. Dies wäre gerade im Hinblick auf eine größere Menge an gewonnenem Serum sinnvoll, weil diese nicht vollständig während eines Arbeitstages weiterverarbeitet werden könnte.

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde für Sagopilone, bezogen auf die Initialgeschwindigkeit sowie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (3.2.1), eine etwa 1,3- bis 1,7-fach höhere Aktivität des Frischserums im Vergleich zu tiefgefrorenem Serum gefunden. Der Unterschied wurde auch im gepaarten t-Test bei zwei Inkubationszeitpunkten als signifikant bestätigt. Für Drospirenon ergab sich ein ähnliches Bild: Frischserum war etwa 1,6-fach stärker aktiv als tiefgefrorenes Serum, wobei für die drei letzten Inkubationszeitpunkte ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Bei MPA hingegen wurde eine etwa 1,2- bis 1,6-fach größere Initialgeschwindigkeit sowie Reaktionsgeschwindigkeitskonstante in tiefgefrorenem Serum festgestellt. Für drei Inkubationszeitpunkte wurde ein signifikanter Unterschied gefunden. Bezüglich PRASL wurde eine höhere Initialgeschwindigkeit für Frischserum, aber zugleich eine kleinere Halbwertszeit in tiefgefrorenem Serum ermittelt. Keiner dieser Unterschiede wurde im gepaarten t-Test bestätigt.

Die Stabilität und damit auch Aktivität von Enzymen ist entscheidend von den Lagerungsbedingungen abhängig. Es wurde über eine sog. *cold denaturation* berichtet, d. h. Enzyme können im Prinzip aus drei Gründen während des Einfrierens ihre Stabilität und Aktivität verlieren [116]:

- *Zerfall der Enzyme in Untereinheiten bei niedrigen Temperaturen*  
Bei Abnahme der Temperatur werden hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Enzymmolekülstruktur abgeschwächt, so dass die Untereinheiten desaggregieren. Eine Reorganisation ist möglich, aber relativ wenig wahrscheinlich [117]. Daher kann die Aktivität nach dem Erwärmen verloren gegangen sein.

- *pH-Wert-Änderung beim Gefrieren*

Während des Einfriervorgangs trennt sich zunächst Wasser in Form von Eiskristallen ab. Dadurch werden die Proteine und alle anderen gelösten Bestandteile in der verbleibenden Lösung konzentriert. Anschließend fällt die am schlechtesten lösliche Komponente aus. Wenn dies ein Puffersalz ist, wird sich der pH-Wert drastisch ändern. Bei Phosphatpuffern geht der pH-Wert meist vom leicht basischen oder neutralen in den sauren Bereich. Eine hohe Proteinkonzentration wirkt allerdings der pH-Wert-Änderung entgegen, da die Proteine selbst als Puffer wirken können. Trotzdem wird für eine Langzeitlagerung eine Temperatur von möglichst weit unter  $-25^{\circ}\text{C}$  empfohlen, weil hier auch die Proteine auskristallisieren und dadurch eine Denaturierung vermieden werden kann. Vor der Präzipitation von Puffersalzen kann sich der pH-Wert der Lösung beim Einfrieren auf Grund der Temperaturabhängigkeit des  $\text{pK}_a$ -Werts ändern. Für Tris-HCl ist z. B. eine Zunahme des  $\text{pK}_a$ -Werts mit fallender Temperatur beschrieben. Dadurch wird sich der pH-Wert einer Tris-HCl-gepufferten Lösung beim Abkühlen bzw. Gefrieren erhöhen.

- *Eiskristallbildung*

Beim Einfrieren von wässrigen Proteinlösungen entstehen Eiskristalle, die die Proteine bei der Bildung ihrer makromolekularen Kristallstruktur behindern oder diese sogar beschädigen können.

Aus diesen Überlegungen heraus lässt sich die Abnahme der Enzymaktivität in Bezug auf die Spaltung von **Sagopilone** und **Drospirenon** erklären. Offensichtlich unterliegen die Enzyme, die diese Wirkstoffe abbauen, einer *cold denaturation*. Eine solche Abnahme der Enzymaktivität wurde z. B. auch für PON in Humanserum beschrieben [118,119]. Allerdings verlief der Abbau des Enzyms bei Lagerung des Serums bei  $-20^{\circ}\text{C}$  nur relativ langsam: Die Aktivität war nach einem Monat konstant, fiel dann nach insgesamt 26 Monaten auf etwa 74 % der Ausgangsaktivität ab [118]. ChE in Humanplasma hingegen wies nach siebenwöchiger Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  [120] sowie nach bis zu sechsmonatiger Lagerung bei  $-40^{\circ}\text{C}$  keinen Aktivitätsverlust auf [121]. Dass es in Serum oder Plasma lagerungsabhängig zum Abbau von Proteinen kommt, zeigten Li *et al.* [11]: Mausserum wurde für 2 Jahre bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und dann mittels nativer PAGE mit Frischserum verglichen. Dabei traten für BChE einige neue Banden im Gel auf (sog. *storage bands*), deren Entstehung u. a. auf Proteolyse zurückgeführt wurde [11,122].

Für **MPA** wurde in den hier durchgeführten Untersuchungen eine höhere Aktivität in tiefgefrorenem Serum in Vergleich zu Frischserum gefunden. Dieses Phänomen wurde bereits für zahlreiche andere Enzyme berichtet. So zeigte beispielsweise die Aldolase in Rinderplasma nach viermonatiger Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eine um 4 % höhere Aktivität im Vergleich zum Zeitpunkt der Gewinnung [123]. Im gleichen Zeitraum und bei gleicher Lagerung war außerdem die  $\gamma$ -Glutamyltransferase in Rinderserum um 7 % stärker aktiv als zur Zeit der Probengewinnung [123]. Weiterhin wies die Alanin-Aminotransferase (ALAT) in Schafplasma bzw. –serum nach viermonatiger Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eine um etwa 20 bis 23 % höhere Aktivität auf (bezogen auf den Ausgangszeitpunkt) [124]. Als eine mögliche Ursache dieser Aktivitätszunahme bei der Lagerung von Serum oder Plasma wurde die Freisetzung der entsprechenden Enzyme aus Thrombocyten diskutiert [124]. Zwar werden Thrombocyten bei der Plasma- bzw. Serumherstellung durch Zentrifugation größtenteils abgetrennt, jedoch verbleibt, in Abhängigkeit von der Zentrifugationsdauer, Umdrehungszahl und Konstruktion der Monovette, ein nicht unerheblicher Teil im Überstand [125]. Diese nicht separierten, im Serum oder Plasma vorliegenden Thrombocyten können dann beim Gefrieren intrazelluläre Enzyme wahrscheinlich durch Ruptur der Zellmembran freisetzen. Dies wurde durch die Feststellung bestärkt, dass insbesondere die Aktivität von ALAT in Schafplasma bzw. –serum bei Lagerung bei  $+20^{\circ}\text{C}$  oder  $+4^{\circ}\text{C}$  um etwa 1 bis 10 % pro Tag (bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert zu Beginn des Beobachtungszeitraum von 7 Tagen) zunahm [124]. Jedoch wurde für ChE keine Veränderung der Aktivität in Schafplasma bzw. –serum nach viermonatiger Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  beschrieben [124]. Für Rattenserum wurde aber festgestellt, dass mit zunehmender Zeit zwischen der Gewinnung der Blutprobe und der Herstellung der Serumprobe die Aktivität der Lactatdehydrogenase, Malatdehydrogenase und Aspartat-Aminotransferase in Serum signifikant anstieg [126]. Dasselbe Bild ergab sich für die Gewinnung von Rattenplasma, allerdings war die Höhe des Anstiegs kleiner [126]. Eine Freisetzung der Enzyme aus Thrombocyten wurde hier ebenso als Grund angegeben. Caisey *et al.* [127] und Breuer *et al.* [128] haben die Liste der Enzyme, die während der Gerinnung von Rattenblut aus Thrombocyten freigesetzt werden, noch um einige andere erweitert. In Bezug auf Esterasen wurde für Rattenserum eine etwa 12- bis 15-fach höhere Aktivität für die Spaltung von Phenyllaureat, einem CE-Substrat, im Vergleich zu Citratplasma beschrieben, wobei der Unterschied signifikant war [129].

Dass Thrombocyten Esterasen enthalten, wurde zahlreich beschrieben: Dufer *et al.* haben in den Granula der Thrombocyten Esteraseaktivität bezogen auf die Spaltung von  $\alpha$ -Naphthylacetat, einem unspezifischen Esterasesubstrat, nachgewiesen [130]. Diese Esteraseaktivität wurde nicht Proteasen zugeordnet, sondern Enzymen, die CE-Eigenschaften hatten [131]. Des Weiteren konnte die Esteraseaktivität auch für Tributyrin (Tributylglycerol), einem CE-Substrat, und NPA in Thrombocyten gezeigt werden [80]. Allerdings wurde berichtet, dass diese Esteraseaktivität um bis zu 80 % verloren ging, wenn man die Thrombocyten z. B. durch Einfrier-Auftau-Zyklen oder Homogenisation lysierte [80]. Folglich würden die Esterasen durch die Lyse der Thrombocyten freigesetzt und größtenteils, aber nicht vollständig inaktiviert werden. Demzufolge wäre die hier gefundene größere Aktivität von MPA-spaltenden Esterasen in tiefgefrorenem Serum verglichen mit Frischserum möglicherweise durch folgendes Szenario zu erklären: Bei der Gewinnung der Serumprobe gerinnt das Rattenblut in den verwendeten Plastik-Monovetten (2.1.3.1) nicht vollständig [126,127], d. h. es bleiben intakte Thrombocyten im Blut zurück, die durch Zentrifugation nicht vollständig abgetrennt werden und dadurch im überstehenden Serum vorliegen. Dieser Überstand wird manuell abgenommen und eingefroren. Beim Einfrieren lysieren die Thrombocyten und setzen dabei intrazelluläre Esterasen frei. Da diese im Vergleich zu extrazellulären Enzymen von Natur aus relativ instabil gegenüber äußeren Einflüssen sind [116], fällt die Zunahme der Esteraseaktivität im tiegefrorenem, dann aufgetauten Serum nur vergleichsweise gering aus, so wie es für MPA auch zutraf (3.2.1). Allerdings war eine Zunahme der Aktivität in Bezug auf die Spaltung der drei anderen Wirkstoffe in tiefgefrorenem Serum gegenüber Frischserum nicht zu verzeichnen. Dies wiederum kann an der unterschiedlichen Substratspezifität der spaltenden Enzyme liegen, d. h., dass die freigesetzten Esterasen eine höhere Spezifität für MPA als für die drei anderen Wirkstoffe hatten. Für **PRASL** wurde kein signifikanter Unterschied in der Aktivität zwischen Frischserum und tiefgefrorenem Serum gefunden. Hier schienen die PRASL-spaltenden Esterasen eine ausreichende Stabilität gegenüber dem Gefriervorgang aufzuweisen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich die Aktivität von frisch gewonnenem Rattenserum verglichen mit tiefgefrorenem Serum in Bezug auf die Spaltung der vier Wirkstoffe z. T. signifikant unterschied: Für Sagopilone und Drospirenon wurde eine höhere Aktivität des Frischserums gefunden, wobei dies auf eine teilweise

Denaturierung von Esterasen im Zuge eines Einfrier-Auftau-Zyklus zurückgeführt wurde. MPA wurde in tiefgefrorenem Serum stärker als in Frischserum umgesetzt. Die Ursache hierfür lag möglicherweise an einer gefrierbedingten Freisetzung von Esterasen aus Thrombocyten. Bei PRASL wurde kein Unterschied in der Aktivität zwischen Frischserum und tiefgefrorenem Serum konstatiert. Offensichtlich zeigten die für PRASL spezifischen Esterasen eine genügend hohe Resistenz gegenüber einem Einfrier-Auftau-Prozess.

Als Schlussfolgerung wurde für die Proteintrennungsverfahren stets Rattenserum bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert, da der Aktivitätsunterschied für 92 % aller Differenzen zwischen Frischserum und tiefgefrorenem Serum unter 10 % lag (**Abbildung 12**) und daher tiefgefrorenes Serum als ausreichend aktiv betrachtet wurde. Die weitere Verarbeitung mittels IEC (2.4.1) oder PON-AC (2.4.4) erfolgte in einem Zeitraum von bis zu 14 Tagen.

#### 4.2.2 Vergleich der Aktivität von frisch gewonnenem Ratten- und Hundeserum

Frisch gewonnenes Ratten- bzw. Hundeserum wurde mit den vier Wirkstoffen inkubiert, um die speziesspezifische Aktivität der beiden Matrices zu vergleichen. Generell ist festzuhalten, dass Rattenserum für alle untersuchten Wirkstoffe eine höhere Aktivität als Hundeserum aufzeigte. So wurden Sagopilone bzw. PRASL nach sechs- bzw. zwölfstündiger Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  in Hundeserum nicht umgesetzt. Der Abbau von Drospirenon bzw. MPA in Hundeserum verlief etwa 4- bzw. 90-fach langsamer als in Rattenserum (**Tabelle 8**). Bereits aus den hier durchgeführten Untersuchungen zur  $^{14}\text{C}$ -NPA- und MeOct-Spaltung (4.1.1 und 4.1.2) ist ersichtlich geworden, dass Hundeserum eine geringere Aktivität unspezifischer Esterasen sowie der CE als Rattenserum aufweist.

Beim *in-vivo*-Metabolismus bzw. *in-vitro*-Abbau (in Plasma oder Serum) von Wirkstoffen mit einer Estergruppe wird häufig von einer höheren Aktivität von Esterasen bei Nagetieren (z. B. Ratten und Mäusen) im Vergleich zu Nichtnagern (z. B. Hunden und Menschen) ausgegangen [19,132,133]. So wurde beispielsweise für Irinotecan (7-Ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, CPT-11) in Rattenserum eine 40-fach stärkere Umsetzung als in Humanserum angegeben [134]. Isocarbacyclinmethylester wurde in Rattenplasma innerhalb von 1 min vollständig hydrolysiert, während die Halbwertszeit der Esterspaltung in

Humanplasma ca. 31 min betrug [22]. Als Ursache hierfür wurde eine höhere CE-Aktivität in Rattenplasma im Vergleich zu Humanplasma genannt [22]. Des Weiteren wurde für Paclitaxel-2'-ethylcarbonat eine höhere Stabilität in Humanserum verglichen zu Ratten- und Mausserum berichtet [135]. Rattenplasma hat sich als wesentlich höher aktiv in Hinblick auf die Spaltung von Peptidester-Prodrugs im Vergleich zu Humanplasma erwiesen [136]. Darüber hinaus wurde auch für einige Insektizide aus der Gruppe der Pyrethroide gezeigt, dass diese nur in Rattenserum, aber nicht in Humanserum hydrolysiert werden [137].

Nachfolgend werden die hier gefundenen Ergebnisse mit Literaturangaben verglichen. Oftmals fehlten Literaturdaten für Hundeserum oder –plasma, weshalb in einigen Fällen die entsprechende Humanmatrix als Surrogat zur Abschätzung der Esteraseaktivität in der Hundematrix herangezogen wurde. Dies ist insofern möglich, als dass in den nachfolgend genannten Studien belegt wurde, dass sich Hundeplasma und Humanplasma (bzw. Serum der beiden Spezies) in ihrer Aktivität bezogen auf die Hydrolyse von Esterwirkstoffen nur gering unterschieden.

Insbesondere galt dies für den Vergleich der Aktivität von Hunde- oder Humanplasma zu Rattenplasma (oder Serum). Eine vergleichbare Aktivität von Hunde- und Humanplasma (oder Serum) wurde z. B. für die Spaltung von Sagopilone in einem internen Bericht der Bayer Schering Pharma AG, von Epothilon D [138], von Isocarbacyclinmethylester [22] und von bestimmten Prodrugs von Peptidwirkstoffen [136] berichtet. Auch bei qualitativer Untersuchung des Serums bzw. Plasmas von Hund und Mensch in Hinblick auf die Esteraseaktivität fiel eine weitgehende Übereinstimmung vor allem in der (im Vergleich zu Rattenserum bzw. –plasma) geringeren Konzentration von CE auf [19,94,139].

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde für **Sagopilone** gefunden, dass es in frisch gewonnenem Rattenserum relativ schnell abgebaut wurde: Nach 1 h bei 37°C war kaum Wirkstoff nachweisbar (**Abbildung 8**). Dagegen fand in Hundeserum kein messbarer Abbau im Inkubationszeitraum von 6 h statt (**Tabelle 8**). Dieser Unterschied wurde auch in einem internen Bericht der Bayer Schering Pharma AG beschrieben. Epothilone zeigten typischerweise eine Instabilität in Serum von Nagern [27]. Dies traf z. B. auf Epothilon B und Desoxyepohtilone B (Epothilon D) zu [32,140]. Chou *et al.* haben z. B. für Epothilon D eine *in-vitro*-Halbwertszeit von 20 min in Mausplasma gefunden [33]. Dagegen wurde Epothilon D nach 8-stündiger Inkubation in Hundeplasma bei 37°C nicht abgebaut [138]. Die Halbwertszeit für

Epothilon D in Rattenplasma lag für 1 mg/L bei 5,7 min [138], während in den hiesigen Untersuchungen für Sagopilone in Rattenserum bei 3  $\mu$ M (d. h. etwa 1,6 mg/L) eine Halbwertszeit von 1,5 min gefunden wurde (**Tabelle 8**). Die Ergebnisse von Wang *et al.* [138] bestätigen die hier gefundenen, auch wenn man berücksichtigen muss, dass bei Wang *et al.* und in den hier durchgeführten Untersuchungen einerseits unterschiedliche Matrices eingesetzt wurden (Plasma vs. Serum) und andererseits Epothilon D und Sagopilone zwar strukturverwandt, aber nicht chemisch identisch sind (vgl. Strukturformel von Sagopilone [**Abbildung 1**] und Epothilon D [138]).

Der Abbau von Sagopilone in Rattenserum erfolgte nach einer Kinetik erster Ordnung (**Abbildung 8**). Dies wurde auch für den Abbau von Epothilon D in Mausplasma grafisch bestätigt [140].

In den hier durchgeführten Untersuchungen zum Abbau von **Drospirenon** in Ratten- bzw. Hundeserum wurde eine wesentlich höhere Aktivität des Rattenserums gefunden: Nach 2 h bei 37°C lagen in Rattenserum nur 40 % nicht umgesetztes Drospirenon vor, während in Hundeserum nach 3 h dieser Anteil noch 75 % betrug (**Abbildung 13**). Diese Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit internen Berichten der Bayer Schering Pharma AG. Dort wurde für tiefgefrorenes und dann aufgetautes Rattenplasma bei einer Inkubation von 3 h bei Raumtemperatur ein Anteil von 45 % nicht umgesetztes Drospirenon gefunden. Hundematrix wurde leider nicht untersucht. In frisch gewonnenem Humanplasma wurde nach einer Inkubation von 24 h bei Raumtemperatur nur etwa 10 % Drospirenon umgesetzt. Dieses Ergebnis der geringeren Aktivität von Humanplasma gegenüber Rattenplasma bestätigt die hier gefundene geringere Aktivität von Hundeserum gegenüber Rattenserum. Krattenmacher hat als Hauptmetaboliten von Drospirenon in Humanplasma das Wirkstoffmolekül mit einem geöffneten Lactonring sowie mit einer 4,5-Dihydrierung in Ring A und einer Sulfatkonjugation an der 3-OH-Gruppe angegeben [41]. Eine strukturell mit Drospirenon verwandte Verbindung ist Spironolacton, das ebenso ein Steroidgerüst mit einem  $\gamma$ -Butyrolactonring aufweist. Billecke *et al.* haben beschrieben, dass humane PON1 *in vitro* Spironolacton umsetzte [141]. Bei Stabilitätsuntersuchungen von Spironolacton in Humanplasma wurde für eine einstündige *in-vitro*-Inkubation bei 37°C nur ein geringer Abbau festgestellt (ca. 11 % Umsatz bezogen auf den Ausgangswert) [142]. In Rattenplasma hingegen wurden 34 % Spironolacton innerhalb von 5 min bei 37°C gespalten; die Halbwertszeit betrug

12 min [6]. Nimmt man Humanserum als mögliches Surrogat für Hundeserum (oder Plasma) an [136], werden die hier gefundenen Ergebnisse der höheren Stabilität von Drospirenon in Hundeserum gegenüber Rattenserum durch die Literaturberichte gestützt.

Drospirenon wurde in den hier durchgeführten Untersuchungen in Ratten- und Hundeserum nach einer Kinetik erster Ordnung umgesetzt (**Abbildung 13**). Dies war übereinstimmend mit einem internen Bericht der Bayer Schering Pharma AG bezogen auf den Abbau von Drospirenon in Ratten- und Humanplasma.

Für **MPA** wurde in den hier durchgeführten Untersuchungen in Rattenserum ein wesentlich stärkerer Abbau als in Hundeserum gefunden. Nach 10-minütiger Inkubation bei 30°C in Rattenserum wurden etwa 66 % MPA (bezogen auf die Ausgangskonzentration) umgesetzt, während in Hundeserum dieser Anteil nach 4 h bei 37°C etwa 19 % betrug (**Abbildung 14**). In einem internen Bericht der Bayer Schering Pharma AG wurden für Hundeplasma vergleichbare Ergebnisse wie die hier ermittelten beschrieben. Für Rattenserum wurde in einem internen Bericht festgestellt, dass MPA nach Inkubation von über 2 min in Rattenplasma bei 37°C nicht mehr nachweisbar war. Unter Berücksichtigung, dass verschiedene Matrices verwendet wurden und sich die angewandte Analytik sowie die Inkubationstemperatur unterschieden, bestätigen diese internen Ergebnisse die hier gefundenen. Ein anderer, mit MPA strukturell verwandter Steroidester ist z. B. Methylprednisolon-21-hemisuccinat, das bei Inkubation in Rattenserum mit einer Konzentration von 1 mM bei 37°C einen Umsatz von 16 mU/mL ergab [143]. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde eine Initialgeschwindigkeit der MPA-Spaltung in Rattenserum von 1,7  $\mu$ U gefunden (**Tabelle 8**), die, bezogen auf das eingesetzte Serumvolumen (100  $\mu$ L), einer Aktivität von 0,017 mU/mL entspricht. Die Diskrepanz erklärt sich vermutlich dadurch, dass für Methylprednisolon-21-hemisuccinat eine höhere Substratkonzentration als für MPA verwendet wurde (1 mM [143] vs. 0,2  $\mu$ M in 2.3.2). Dadurch ist ein höherer Substratumsatz für Methylprednisolon-21-hemisuccinat zu erwarten, da der  $K_m$ -Wert für Steroidester bei 2 mM und höher liegt [103,144]. Für Hundeserum wurde kein Vergleichswert für Methylprednisolon-21-hemisuccinat gefunden. Für Humanserum wurde berichtet, dass es Methylprednisolon-21-hemisuccinat nicht in merklichen Maß umsetzte, während eine aus Rattenplasma gereinigte CE dies tat [145]. Für Beclomethason-17 $\alpha$ ,21-dipropionat wurde von Würthwein *et al.* eine Halbwertszeit von 4,7 h in

Humanplasma gefunden [146]. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Vergleichbarkeit der Esteraseaktivität von Hunde- und Humanplasma (oder Serum) in Bezug auf zahlreiche Substrate wurde für MPA in einem internen Bericht der Bayer Schering Pharma AG eine erheblich höhere Aktivität von Humanplasma im Vergleich zu Hundeplasma gefunden. Daher scheint für MPA ein vereinfachender Schluss von der Stabilität in Humanplasma auf Hundeplasma (oder Serum) nicht möglich zu sein. Zumindest die hohe Aktivität von Rattenplasma für den Abbau von Steroid-21-estern u. a. Steroidestern wurde in der Literatur bestätigt [23,145].

Der Abbau von MPA verlief in den hier durchgeführten Untersuchungen in Rattenserum, übereinstimmend mit einem internen Bericht der Bayer Schering Pharma AG mit Rattenplasma, nach einer Kinetik erster Ordnung (**Abbildung 14**). Dies wurde darüber hinaus auch für die Untersuchung des Abbaus von Beclomethason-17 $\alpha$ ,21-dipropionat in Humanplasma gefunden [146]. In Hundeserum wurde hier ein Abbau von MPA mit einer Kinetik nullter Ordnung konstatiert (**Abbildung 14**). Dies war übereinstimmend mit einem internen Bericht zur Untersuchung von Hundeplasma. Die Ursache hierfür kann in einem im Vergleich zu Ratten- und Humanplasma (oder Serum) kleineren  $K_m$ -Wert liegen, so dass die Esterasen bei einer Substratkonzentration von 0,2  $\mu$ M (siehe 2.3.2) bereits abgesättigt waren und der Abbau über die Zeit konstant verlief.

Für **PRASL** wurde nach zweistündiger Inkubation in Rattenserum bei 37°C ein Umsatz von 45 % festgestellt, während Hundeserum keine Aktivität innerhalb eines Inkubationszeitraums von 12 h zeigte (**Abbildung 11, Tabelle 8**). Diese Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit einem internen Bericht der Bayer Schering Pharma AG. Andere Wirkstoffe mit einem Lactonring, wie z. B. Lovastatin oder Simvastatin, wiesen ebenfalls eine höhere Instabilität in Rattenplasma im Vergleich zu Hundeplasma auf [147,148], wobei der Umsatz der beiden Statine in Rattenplasma deutlich über dem von PRASL lag (jeweils etwa 10 %/min [147,148] vs. ca. 1 %/min; vgl. **Abbildung 11**). Für die Statine unterschied sich die Lactonase- (d. h. PON-)Aktivität zwischen Hunde- und Humanplasma und zwischen Ratten- und Mausplasma (oder Serum) nicht wesentlich [147-149]. Daher kann Humanplasma als Surrogat für Hundeplasma in Bezug auf die PON-Aktivität herangezogen werden. Für das PON-Substrat Prulifloxacin wurde ein höherer Umsatz in Rattenserum gegenüber Humanserum gefunden [150]. Teiber *et al.* haben für  $\delta$ -6E,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraenlacton eine etwas höhere Aktivität der spaltenden PON in Mausplasma

verglichen mit Humanplasma berichtet [151]. Für Homocysteinthiolacton wurde ebenso ein höherer Umsatz in Rattenserum als in Humanserum gefunden [149,152]. Daher bestätigen die Literaturberichte die in den hier durchgeführten Untersuchungen ermittelte höhere Aktivität der PRASL-Spaltung in Rattenserum im Vergleich zu Hundeserum.

Der hier gefundene Abbau von PRASL nach einer Kinetik erster Ordnung wurde in einem internen Bericht der Bayer Schering Pharma AG sowie Untersuchungen mit Lovastatin oder Simvastatin verifiziert [147,148].

Fasst man die gewonnenen Erkenntnisse aus der vergleichenden Untersuchung der Wirkstoffstabilität in Ratten- und Hundeserum zusammen, lässt sich festhalten, dass Sagopilone (mit seinem relativ großen Lactonring) die geringste Stabilität von allen hier betrachteten Wirkstoffen in Rattenserum aufwies. Danach folgend ist MPA (ein Steroid-17 $\alpha$ ,21-diester) zu nennen. Drospirenon und PRASL (mit jeweils einem fünfgliedrigen Lactonring) waren etwa gleich stabil in dieser Matrix. In Bezug auf Hundeserum wurde für Sagopilone und PRASL, im Gegensatz zu Rattenserum, kein Abbau im jeweiligen Inkubationszeitraum festgestellt. MPA erwies sich, anders als in Rattenserum, als stabilerer Wirkstoff in Hundeserum als Drospirenon. Für beide Wirkstoffe lag der Umsatz in Hundeserum weit unter dem in Rattenserum. Die hier gefundene, höhere Esteraseaktivität in Rattenserum gegenüber Hundeserum wurde in Hinblick auf die Spaltung der vier Wirkstoffe (oder von strukturell verwandten Substanzen) durch interne Berichte der Bayer Schering Pharma AG und durch Literaturberichte gestützt.

### **4.3 Proteinisolierung und –reinigung aus Ratten- und Hundeserum**

#### **4.3.1 Proteintrennungsverfahren**

Die Isolierung und Reinigung von Proteinen mit Esteraseaktivität aus Ratten- und Hundeserum erfolgte durch IEC, SEC und Albumin-AC sowie durch PON-AC. Die Auswahl der drei Schritte bis zur Albumin-AC ist insbesondere durch einen Bericht von Tsuji *et al.* [134] getroffen worden, der die Isolierung einer Irinotecan-spaltenden CE aus Rattenserum beschreibt. Hier wurde als erster Schritt die direkte Applikation von Rattenserum auf eine DEAE-Säulenmatrix genannt. Dieser initiale Trennschritt wurde in der hier durchgeführten Untersuchung mittels einer DEAE-Cellulosematrix

(DEAE-Sephacel, siehe 2.4.1) ausgeführt. Die IEC erlaubt eine weitreichende Bindung von bei pH 7,6 zumeist elektrisch negativ geladenen Serumproteinen [57], darunter BChE und CE [90,134], an die elektrisch positiv geladene DEAE-Matrix und damit eine gewisse Konzentrierung der zu isolierenden Proteine. Durch den linearen Salzgradienten werden die gebundenen Proteine je nach elektrischer Ladung und damit Affinität zur Matrix sequenziell von der Säule eluiert und fraktioniert aufgefangen. Die Fraktionen, die in den Assays mit den vier Wirkstoffen (2.4.7) als die am stärksten aktiven festgestellt wurden, wurden für die SEC (2.4.2) vorbereitet. Durch die Gelfiltration (SEC) kann das in der IEC gewonnene Proteingemisch weiter gereinigt werden, da hier die Proteine vor allem nach ihrer Molmasse getrennt werden. Sephacryl S-300 HR wurde ausgesucht, da, im Vergleich zu anderen verfügbaren, preiswerten Matrices, der von Sephacryl S-300 vorgegebene Trennbereich von 10 bis 1500 kDa [153] am besten mit dem gewünschten Bereich von 40 bis 500 kDa übereinstimmte. Um die Albuminmenge in den aktiven SEC-Fraktionen weiter zu reduzieren, wurde eine Albumin-AC mittels einer sog. Blue-Sepharose-Matrix (HiTrap Blue HP, siehe 2.4.3) durchgeführt. Diese Matrix zeichnet sich durch hohe Affinität zu Albumin,  $\alpha_2$ -Macroglobulin und Nucleotid-abhängigen Enzymen aus [116,154]. Albumin bindet an die Matrix und wird dann durch eine hohe Salzkonzentration im Eluenten von der Säule getrennt. Die IEC und SEC wurden bei 4°C ausgeführt [vgl. 134]. Die Albumin-AC hingegen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, da bei der Affinitätschromatografie an Farbstoff-gekoppelten Matrices (wie hier Cibacron Blue F3G-A) u. a. hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Säulenmatrix auftreten und diese bei Raumtemperatur gegenüber einer Kühlung bei 4°C verstärkt werden [116,155].

In der Literatur wurden zahlreiche Methoden zur Isolierung und Reinigung von Esterasen aus Rattenserum beschrieben. Meistens wurde als einer der ersten Schritte eine fraktionierte Präzipitation mit Ammoniumsulfat und anschließend eine IEC durchgeführt [102,156-159]. In den hiesigen Untersuchungen wurde auf eine Ammoniumsulfat-Fällung verzichtet, da dieser Arbeitsschritt eine zusätzliche Belastung (Dialyse oder Ultrafiltration) der zu isolierenden Proteine bedeutet hätte [156,157,160]. Zum Risiko der Kontamination von Ammoniumsulfat mit Hydrolase-inaktivierenden Schwermetallsalzen kann die Zugabegeschwindigkeit von Ammoniumsulfat zu Serum die Proteinintegrität beeinflussen [161,162]. Zur Minimierung der Reinigungsschritte wurde für die hiesige Proteintrennung Serum

unmittelbar auf eine IEC-Säule aufgetragen [134,163-165]. Nach der IEC wurden die aktiven Fraktionen mittels Ultrafiltration auf relativ kleines Volumen von 0,5 mL konzentriert (2.4.2), da das Probenvolumen in der Gelfiltration die Trennung (und insbesondere deren Auflösung) stark beeinflusst [166]. Die SEC wurde hier, bezogen auf die Proteine aus der IEC, auch zur Molmassenabschätzung durchgeführt [167]. Der SEC wurde eine Albumin-AC angeschlossen [116], um Albumin abzureichern [168-171].

Für die Reinigung der PON aus Ratten- bzw. Hundeserum wurde die PON-AC (2.4.4) durchgeführt. Diese Methode wurde gewählt, weil in der IEC von Rattenserum keine oder kaum Aktivität in Bezug auf die Spaltung von PRASL gefunden wurde (siehe 3.3.4.4). Bei einer Literaturrecherche wurde ein Bericht zur Reinigung von PON aus Humanserum gefunden [172]. Humanserum wurde mit einer Agarosematrix, an die der Farbstoff Cibacron F3G-A gebunden war, in einem Puffer mit 3 M NaCl versetzt und gewaschen. Der hohe Salzgehalt verhinderte die Adsorption von Albumin an die Matrix, erlaubte aber die Bindung der PON. Die Matrix wurde dann von NaCl frei gewaschen und die PON in einer Säulenchromatografie mit einem Puffer, der 0,1 % Natriumdesoxycholat enthielt, eluiert. Dieses Verfahren wurde für die hiesige Untersuchung zu einer reinen Säulenchromatografie modifiziert (2.4.4) [173]. Die Säulenchromatografie ermöglicht gegenüber der sog. *batch chromatography* eine kontinuierliche Beobachtung und Dokumentation des Elutionsprozesses [174]. Eine weitere Reinigung der für PRASL aktiven Fraktionen (2.4.7) wurde nicht durchgeführt, da die Proteinmenge und die Aktivität bereits nach diesem Trennschritt relativ gering waren (3.3.4.4). Andere Verfahren zur Isolierung PON1-haltiger Fraktionen beschrieben die direkte Adsorption an eine IEC-Matrix, u. a. unter Einsatz von Triton X-100, Calciumchlorid und EDTA in den Eluenten [175-178]. In der hier durchgeführten Untersuchung wurde ebenfalls eine IEC an einer DEAE-Sephacel-Matrix (2.4.1) unter Zusatz von 0,1 % (V/V) Triton X-100 und 1 mM Calciumchlorid versuchsweise getestet, ergab aber nur eine geringe absolute und spezifische Aktivität der PRASL-Spaltung (Daten nicht gezeigt).

#### **4.3.2 Assay der isolierten Fraktionen aus den Proteintrennungsverfahren mit den vier Wirkstoffen**

Die Proteintrennungsverfahren dienten der Isolierung der Fraktionen mit der für die vier Wirkstoffe spezifischen Esteraseaktivität aus Ratten- bzw. Hundeserum. Die

dreistufige Reinigung mittels IEC (2.4.1), SEC (2.4.2) und Albumin-AC (2.4.3) war im Vergleich zur PON-AC (2.4.4) wesentlich effektiver, da hier Anreicherungen der Aktivität von etwa bis zu Faktor 10000 (für den MPA-aktiven Fraktionspool aus Rattenserum; siehe **Tabelle 12**) erzielt wurden. Die PON-AC war zur Isolierung PRASL-spaltender Fraktionen aus Rattenserum am effektivsten und erreichte eine etwa 92-fache Konzentrierung der Aktivität (siehe **Tabelle 14**). Dies bedeutet, dass die angewandten Verfahren in der Lage waren, die jeweilige Esteraseaktivität (d. h. die entsprechenden Enzyme) aus dem Serum zu isolieren und anzureichern. Daraus lässt sich schließen, dass die Überlegungen, die zur Anwendung gerade dieser Methoden geführt haben (vgl. 4.3.1), hier erfolgreich bestätigt wurden. Somit sollte für die Spaltung von Sagopilone, Drospirenon und MPA in Rattenserum CE oder BChE hauptsächlich verantwortlich sein. Dies wurde dadurch bekräftigt, dass die Reinigung mittels PON-AC für Drospirenon- und MPA-spaltenden Enzyme aus Rattenserum kaum oder keine Anreicherung ergab (Faktor 1,2 für Drospirenon [siehe **Tabelle 11**] und Faktor 0,6 für MPA [siehe **Tabelle 13**]). PON sollte daher für die Spaltung von Drospirenon und MPA in Rattenserum eine untergeordnete Bedeutung haben, wie zumindest für MPA im späteren Inhibitorscreening bestätigt wurde (3.5.2). Für **PRASL** hingegen war die PON-AC erfolgreich und lässt daher auf eine erhebliche Beteiligung der PON an der Spaltung von PRASL in Rattenserum schließen.

Die für **Sagopilone**, **Drospirenon** und **MPA** aktiven Fraktionen der Albumin-AC von Rattenserum eluierten zuerst von der Cibacron-Säule, gefolgt von einem meist größeren Peak (**Abbildung 17**). Dies ist in Übereinstimmung mit einem Bericht von Tsujita *et al.*, die beschrieben, dass eine CE und BChE aus Rattenserum nicht an Cibacron gebunden wurden, aber stattdessen Albumin [114]. Somit wird die Annahme unterstützt, dass es sich bei dem in der Albumin-AC zuerst eluierten Peak um eine CE oder BChE handelte.

Bei der Betrachtung von Hundeserum fiel die relativ hohe Anreicherung von **Drospirenon**-spaltenden Enzymen in der IEC auf (siehe **Tabelle 15**), die aber im weiteren Lauf der Reinigung mittels SEC verloren ging. Um methodische Fehler auszuschließen wurde die Prozedur ein zweites Mal durchgeführt, ergab aber wiederum keine Aktivität der SEC-Fraktionen. Weil vermutet wurde, dass PON an der Spaltung von Drospirenon in Hundeserum hauptsächlich beteiligt war (und dies auch im späterem Inhibitorscreening gezeigt wurde [siehe 3.5.3 und **Tabelle 23**]),

wurde die PON-AC ausgeführt. Diese erzielte leider keine Anreicherung (siehe **Tabelle 16**). Die Ursache der geringen Aktivität der PON-AC-Fractionen kann darin liegen, dass Hundeserum nur eine geringe Aktivität gegenüber PON-Substraten aufweist (vgl. die hier durchgeführte Untersuchung mit  $^{14}\text{C}$ -NPA (4.1.1) und [92]). Für relativ kleine Lactone vom Typ des Spironolactons, Drospirenons oder der Statine kann man von einem geringeren Umsatz pro Menge an PON im Vergleich zu offenkettigen, aromatischen Estern (wie z. B. Phenylacetat) ausgehen [141,179-181]. Weiterhin kommt der Speziesunterschied dazu [92,103,182,183]: So unterschied sich der  $V_{\max}$ -Wert und die katalytische Effizienz (d. h.  $V_{\max}/K_m$ ) von PON-Substraten (4.1.1) für Ratten- und Hundeplasma erheblich [92,103]. PON-Substrate (wie Phenylacetat oder kleine Lactone) haben einerseits meist eine höhere Affinität (d. h. kleineren  $K_m$ -Wert) zu ihren spezifischen Enzymen bei Menschen (oder Hunden) verglichen mit Ratten, andererseits liegt ihr maximaler Umsatz (d. h. ihr  $V_{\max}$ -Wert) meist unter dem der entsprechenden Enzyme bei Ratten. Der geringe Umsatz von Drospirenon (mit einer Inkubationskonzentration von  $10\ \mu\text{M}$ ; siehe 2.4.7) durch die hier gereinigten PON-AC-Fractionen könnte auch auf eine Substratinhibition zurückgeführt werden, die bereits im mikromolaren Bereich der Substratkonzentration auftreten kann [138]. Ein methodisches Artefakt spielte wahrscheinlich ebenso eine wichtige Rolle: Fünfgliedrige Lactone (wie Drospirenon) mit geöffnetem Ring recycelieren relativ schnell (selbst in basischen Lösungen) wieder zum Lacton [151,184]. Bei Lactonwirkstoffen hat der pH-Wert der Probenlösung einen großen Einfluss auf die Stabilität des Wirkstoffs (vgl. Topotecan [185]). Die mit Drospirenon inkubierten Proben wurden bis zur HPLC-Analyse in Eluens A (d. i. 75 % wässrige Pufferlösung (pH 7,5) und 25 % Methanol [V/V]; siehe **Tabelle 1**) gelagert. Daher ist eine Lactonisierung des geöffneten Lactonrings nicht auszuschließen [186]. Bei den Proben, die PRASL enthielten, wurde diese Lactonisierung experimentell gezeigt (Daten nicht gezeigt) und durch Lagerung in ACN verhindert (2.3.1).

Die Anreicherung sowie die Ausbeute der Aktivität der Drospirenon-spaltenden Enzyme war aus Rattenserum etwas größer als aus Hundeserum (vgl. **Tabelle 11** vs. **Tabelle 16**). Dieser Vergleich unterstützt die oben erwähnte Überlegung der höheren Aktivität (gemessen an  $V_{\max}$ ) der PON für Lactone in Rattenserum im Vergleich zu Hundeserum. Die geringe Anreicherung von Drospirenon-spaltenden Enzymen durch die PON-AC schließt aus den oben erläuterten Gründen nicht aus,

dass PON nicht an der Spaltung von Drospirenon in Ratten- oder Hundeserum beteiligt sein könnte.

**Abbildung 29** zeigte, dass sich die Aktivität der Drospirenon-spaltenden Enzyme in der IEC von Hundeserum im Prinzip über alle Fraktionen verteilte. Dies unterstützt die Annahme, dass hier PON involviert war. PON kann *via high-density lipoprotein*- (HDL-)Partikeln an einen Anionenaustauscher binden [172,173,178]. Für die Elution ist ein Detergens erforderlich, das hier nicht eingesetzt wurde (da diese IEC *per se* nicht zur PON-Isolierung vorgesehen war). Deshalb fand eine asymmetrische Elution von der IEC-Säule statt. Die nachfolgend gewonnenen SEC-Fraktionen wiesen auf Grund des fehlenden, stabilisierenden Detergens keine Aktivität mehr auf.

Für **MPA** wurde durch die dreistufige Reinigung von Hundeserum eine hohe Anreicherung von Aktivität erzielt (**Tabelle 17**). CE oder BChE waren, wie in Rattenserum, wahrscheinlich an der MPA-Spaltung in Hundeserum beteiligt. Für die PON-AC-Fraktionen wurde, anders als bei Drospirenon, eine höhere Anreicherung aus Hundeserum als aus Rattenserum ermöglicht (siehe **Tabelle 13** vs. **Tabelle 18**). Weiterhin lag die Anreicherung von MPA-spaltenden Enzymen in Rattenserum *unter*, dagegen in Hundeserum *über* der Anreicherung von Drospirenon-spaltenden Enzymen (siehe **Tabelle 13** vs. **Tabelle 11**, dagegen **Tabelle 18** vs. **Tabelle 16**).

Die Anreicherung von MPA-spaltenden Enzymen durch die PON-AC von Hundeserum war höher als in Rattenserum. Wahrscheinlich war aber nicht PON für die Aktivität verantwortlich, da dies in Widerspruch zu späteren Ergebnissen des Inhibitorscreenings (3.5.3) stehen würde. Es wurde nämlich berichtet, dass neben PON bei der Cibacron-Affinitätschromatografie (2.4.4) von Serum auch eine Serinhydrolase, und zwar Plättchen-aktivierender Faktor- (PAF-)Acetylhydrolase (PAF-AH), gleichzeitig isoliert werden kann [187,188]. PAF-AH ist eine Serinhydrolase mit Phospholipase-A<sub>2</sub>-Aktivität, d. h. sie spaltet vor allem Acylreste aus der *sn*-2-Position von Phospholipiden ab [187-192]. Steroidester, wie MPA, wurden in der Literatur zwar nicht als PAF-AH-Substrate beschrieben [193,194], aber Stafforini berichtete, dass die Spaltung von PAF durch PAF-AH in Gegenwart von Acetylsalicylsäure (ASS) um 10 % inhibiert wurde [192]. Möglicherweise kann PAF-AH also mit strukturell verschiedenen Substraten interagieren. Dass PON Steroidester spalten kann, wurde bis jetzt nur von Teiber *et al.* für bestimmte Estradiol-3,17 $\beta$ -diester gezeigt [195]. PON war in der Lage, hier die 3-Estergruppe zu hydrolysieren (indem bevorzugt ein Acetylrest abgespalten wurde), aber nicht die

17 $\beta$ -Estergruppe. Als eine Voraussetzung für die Spaltung durch PON wurde die Anwesenheit einer Doppelbindung in Nachbarschaft zur Estergruppe gesehen [179,196]. Daher erscheint eine PON-katalysierte Spaltung von MPA, einem Steroid-17 $\beta$ ,21-diester, wenig wahrscheinlich. Tatsächlich haben Myers *et al.* gefunden, dass Methylprednisolon-21-acetat nicht durch PON umgesetzt wurde [197]. Insofern ist die hohe Aktivität der PON-AC-Fractionen in Bezug auf die MPA-Spaltung in Hundeserum wahrscheinlich nicht auf PON, sondern auf eine Serinhydrolase, wie z. B. PAF-AH, zurückzuführen. Die höhere Anreicherung von MPA durch die PON-AC von Hundeserum als von Rattenserum und genau die umgekehrte Situation für Drospirenon sind somit erklärbar: Für MPA ist die hohe Anreicherung wahrscheinlich auf die Kontamination einer Serinhydrolase in den PON-AC-Fractionen zurückzuführen, während PON Drospirenon möglicherweise umsetzte, aber die Lactonisierung während der Probenlagerung die Aktivität artifiziell erniedrigte.

**Sagopilone** als ein 16-gliedriges  $\omega$ -Pentadecanolacton wurde nicht hinsichtlich der Spaltung durch geeignete PON-AC-Fractionen untersucht, weil es als wenig wahrscheinlich erschien, dass PON an der Sagopilone-Spaltung beteiligt sein könnte. Zwar wurde für die Ringerweiterung vom  $\gamma$ -Valerolacton (Fünfring) zum  $\delta$ -Valerolacton (Sechsring) eine Zunahme des Umsatzes durch PON gezeigt [181; vgl. auch 179], aber für  $\epsilon$ -Caprolacton (ein siebengliedriger Ring) nahm die PON-Aktivität wieder ab [141]. Größere Ringe werden vermutlich kaum oder nicht umgesetzt. Spätere Inhibitionsstudien bekräftigten dies für Sagopilone (3.5.2).

Die für die hier durchgeführten Untersuchungen gefundenen Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten wurden in ihrer Größenordnung auch von anderen Autoren berichtet, die eine IEC als einer der ersten Trennschritte angewandt haben. Hashinotsune *et al.* haben für eine Rattenserum-CE eine etwa 130-fache Anreicherung mit einer Ausbeute von ca. 6 % erreicht [102]. Tsuji *et al.* berichteten für eine Irinotecan-spaltende CE aus Rattenserum eine Anreicherung von Faktor 450 und eine Ausbeute von 0,14 % [134]. Die erzielten Anreicherungen der für Sagopilone, Drospirenon und MPA spezifischen Esterasen aus Rattenserum von Faktor 83 (**Tabelle 10**) bis über 10000 (**Tabelle 12**) mit Ausbeuten von ca. 1-5 % (**Tabelle 10** und **Tabelle 9**) belegen somit die Qualität und Eignung der hier verwendeten Proteintrennungsvorgänge. Für Hundeserum wurde kein Beispiel für die Isolierung einer Serumesterase berichtet. Für die Isolierung von PON-haltigen Fractionen aus Rattenserum haben Pond *et al.* nur eine relativ geringe Anreicherung von Faktor 1,5

mit einer Ausbeute von 9 % beschrieben [176]. Allerdings verwendeten sie eine IEC und eine nachfolgende SEC zur PON-Reinigung. Andere Autoren erzielten wesentlich höhere Anreicherungen bei der Isolierung der PON aus Humanserum (etwa 50-fach) mit Ausbeuten von ca. 35 % [172,173]. Daher lag die hier für PRASL aus Rattenserum erzielte Anreicherung von Faktor 92 mit einer Ausbeute von 57 % in dieser Größenordnung [173,178].

Kurz zusammenfassend lässt sich aus der Isolierung und Reinigung von Esterasen aus Ratten- bzw. Hundeserum schließen, dass in Rattenserum eine Serinesterase (CE oder BChE) für die Spaltung von Sagopilone, Drospirenon und MPA maßgeblich verantwortlich sein sollte. Für PRASL hingegen wurde eine wesentliche Beteiligung von PON an der Hydrolyse in Rattenserum geschlussfolgert. In Ratten- und insbesondere Hundeserum erwies sich PON als möglicherweise involviertes Enzym bei der Spaltung von Drospirenon. Für MPA erschien die PON-katalysierte Hydrolyse in Hundeserum als wenig wahrscheinlich, währenddessen eine Serinhydrolase (wie z. B. PAF-AH) eher eine Rolle spielen könnte.

Auf die Auswertung der SDS-PAGE-Gele wird unter 4.4.1 eingegangen.

### 4.3.3 $K_m$ - und $V_{max}$ -Wert-Bestimmung

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden die isolierten, gereinigten Fraktionen aus Rattenserum, die für die Sagopilone-, Drospirenon- und MPA-Spaltung aktiv waren, sowie für PRASL unfraktioniertes Rattenserum enzymkinetisch charakterisiert. Dazu wurden die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte bestimmt (siehe 3.3.5).

Für **Sagopilone** wurde ein  $K_m$ -Wert von 0,48  $\mu\text{M}$  und ein  $V_{max}$ -Wert von 553  $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  ermittelt (**Tabelle 19**). Daraus ergibt sich eine katalytische Effizienz ( $V_{max}/K_m$ ) von ca. 1,2  $\text{mL}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ . Die katalytische Konstante  $k_{cat}$  und die Spezifitätskonstante  $k_{cat}/K_m$  [198] wurden nicht berechnet, da die Enzymkonzentration nicht ermittelt wurde. Die nachfolgenden Vergleiche wurden für bekannte BChE- und CE-Substrate durchgeführt, da in den hiesigen Untersuchungen (4.3.2) angedeutet wurde, dass Sagopilone, Drospirenon und MPA durch BChE oder CE gespalten wurden. Eine enzymkinetische Charakterisierung von mit Sagopilone strukturell vergleichbaren Verbindungen wurde leider in der Literatur nicht beschrieben. Daher werden im Folgenden aliphatische und aromatische Carbonsäureester betrachtet. Für eine aus Rattenserum gereinigte CE wurde ein  $K_m$ -Wert für MeBut von 7 mM [114] und für NPA 2 bis 6 mM angegeben [102,106]. Für

bestimmte Pyrethroide (*trans*-Permethrin und Bioresmethrin) wurden wesentlich kleinere  $K_m$ -Werte von etwa 20  $\mu\text{M}$  für eine gereinigte Rattenserum-CE berichtet [137]. Eine Literaturrecherche hat ergeben, dass die  $K_m$ -Werte für BChE und CE meist im mikromolaren bis unteren millimolaren Bereich zu finden sind [182,199-202]. Dagegen wurde für eine aus Rattenserum gereinigte, Irinotecan-spaltende CE ein  $K_m$ -Wert von 0,19  $\mu\text{M}$  ermittelt [134]. Insofern ist der hier gefundene Wert (0,48  $\mu\text{M}$ ) durchaus plausibel und kennzeichnet eine relativ hohe Affinität von Sagopilone zu CE oder BChE. Ein Vergleich des ermittelten  $V_{\max}$ -Werts mit Literaturdaten ist insbesondere auf Grund methodischer Unterschiede in der Enzymreinigung und  $V_{\max}$ -Wertbestimmung problematisch. Daher kann ein konsistenter Vergleich der katalytischen Potenz des Enzyms hier, in Ermangelung der Kenntnis der Enzymkonzentration, nur durch die sog. katalytische Effizienz (d. h.  $V_{\max}/K_m$ ) erfolgen. Für die Pyrethroide *trans*-Permethrin bzw. Bioresmethrin wurde für eine gereinigte Rattenserum-CE ein  $V_{\max}/K_m$ -Wert von 0,8 bzw. 1,5  $\text{mL}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  [137] und für MeBut 3,3  $\text{mL}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  [114] ermittelt. Insofern erscheint der hier gefundene Wert für Sagopilone von 1,2  $\text{mL}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  plausibel und kann, als Ergebnis einer Literaturrecherche, als mittlere katalytische Effizienz in Bezug auf andere CE- oder BChE-Substrate eingeordnet werden [20,182,202-207].

Für **Drospirenon** wurde ein  $K_m$ -Wert von 38  $\mu\text{M}$  und ein  $V_{\max}$ -Wert von 1212  $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  gefunden (**Tabelle 19**). Daraus ergibt sich ein  $V_{\max}/K_m$ -Wert von ca. 32  $\mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ . In der Literatur wurden keinen enzymkinetischen Daten für Steroidlactone oder andere Lactone in Bezug auf die Spaltung durch BChE oder CE angegeben. Dass Drospirenon ein Substrat der BChE oder CE ist, scheint auf Grund einiger Literaturberichte zur Lactonaseaktivität zumindest für die CE zuzutreffen [13,151,186,208]. So wurde für die Lactone Lovastatin, Simvastatin und Mevastatin beschrieben, dass diese durch CE *in vivo* gespalten werden [83,209-214]. *In vitro* wurde aber für Mevastatin keine Spaltung durch humane CE, wohl aber eine Bindung an dieses Enzym beschrieben, die in einer Inhibition resultierte [209]. BChE interagiert mit Lactonen: Lovastatin und Simvastatin führten dabei zur Inhibition [215]. Insofern ist die Beteiligung einer CE (oder BChE) für die Spaltung von Drospirenon in Rattenserum und in den hier charakterisierten Albumin-AC-Fractionen möglich. Der  $K_m$ -Wert von 38  $\mu\text{M}$  ordnet Drospirenon als ein Substrat mit mittlerer Affinität (bezogen auf die oben genannten Vergleiche) für CE (oder BChE) ein. Die

katalytische Effizienz ( $32 \mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ) liegt dabei im unteren Bereich für CE (oder BChE).

Bei **MPA** lag der hier gefundene  $K_m$ -Wert bei  $2,7 \mu\text{M}$  und der  $V_{\text{max}}$ -Wert bei ca.  $15 \text{ nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  (**Tabelle 19**). Der daraus berechnete  $V_{\text{max}}/K_m$ -Wert von  $5,7 \text{ mL}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  befand sich im mittleren Bereich bezogen auf andere CE- oder BChE-Substrate (siehe oben) und im oberen Bereich bezogen auf andere Steroid-21-monoester [13,144,197,216,217]. Der  $K_m$ -Wert lag im unteren Bereich für Substrate der CE oder BChE (siehe oben). Dagegen wies MPA eine etwas höhere Affinität zu CE oder BChE als andere Steroid-21-ester auf [83,216,217].

Für **PRASL** wurde bei der Inkubation in unfraktioniertem Rattenserum ein  $K_m$ -Wert von  $97 \mu\text{M}$  und ein  $V_{\text{max}}$ -Wert von  $8 \text{ pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  ermittelt (**Tabelle 19**). Der  $V_{\text{max}}/K_m$ -Wert beträgt demnach  $0,08 \mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  und war der kleinste gefundene Wert in diesen Untersuchungen. Zugleich war der  $K_m$ -Wert der größte in diesen Untersuchungen. Aus den gefundenen Ergebnissen (4.3.2) wurde ersichtlich, dass PON hauptsächlich an der PRASL-Spaltung in Rattenserum und in den PON-AC-Fractionen verantwortlich sein sollte. Für aromatische Lactone vom Phthalidtyp (wie bei PRASL) wurde leider keine enzymkinetische Charakterisierung der Spaltung durch PON in der Literatur beschrieben. Eine Literaturrecherche für strukturell verwandte Lactone sowie andere PON-Substrate ergab eine mittlere PON-spezifische Substrataffinität für PRASL [103,141,183,218]. Die hier für die PRASL-Spaltung ermittelte Effizienz lag z. T. weit unter der für andere PON-Substrate [103,141,183,218]. Dies liegt wahrscheinlich einerseits an der Inkubation mit gereinigter PON1 [141] statt der hier durchgeführten Inkubation in Vollserum (2.4.9) [183,218]. Andererseits beeinflussen die strukturellen Unterschiede der Substrate die Enzymaktivität sowie (bei Lactonen) die Neigung zur Recyclisierung [151].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Sagopilone im Vergleich zu anderen CE- oder BChE-Substraten eine hohe Affinität zu CE oder BChE mit einer mittleren katalytischen Effizienz ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) aufwies. In diesem Kontext wurden für Drospirenon eine mittelgroße Affinität und nur eine geringe Effizienz gefunden. Bei MPA fanden sich eine tendenziell höhere Affinität und auch eine höhere Effizienz als bei anderen Steroid-21-monoester in Bezug auf ihre Spaltung durch CE oder BChE. Hingegen lag für PRASL eine mittelgroße Affinität und nur geringe katalytische Effizienz des Umsatzes in Rattenserum im Vergleich zu anderen PON-Substraten vor.

## 4.4 Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS, LC-ESI-MS und Western Blot

### 4.4.1 Proteinidentifizierung in Rattenserum bzw. Fraktionen aus Rattenserum

#### 4.4.1.1 Identifizierung von Ratten-Carboxylesterase 1 durch MALDI-TOF-MS

Die Proteinbanden der für Sagopilone aktiven Albumin-AC-Fraktionen wurden nach einer SDS-PAGE aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und die Peptide mittels MALDI-TOF-MS analysiert (2.5.1). Als eine bekannte Esterase wurde hierbei Ratten-Carboxylesterase 1 in der für Sagopilone aktiven Fraktion 3 der Albumin-AC identifiziert (3.4.1.1; **Tabelle 20**). Außer für Serumalbumin (siehe unten) wurde für die anderen identifizierten Proteine keine Esteraseaktivität beschrieben. Dass aber CE und nicht Albumin als für die Esteraseaktivität hauptsächlich verantwortlich zu sehen sind, ergibt sich aus der Feststellung, dass die Albumin-AC-Fraktionen 25 und 27 bzw. der als zweites von der Albumin-AC-Säule eluierende Fraktionspool wesentlich mehr Albumin enthielten, aber dafür kaum Aktivität. Dies ist bezüglich der Proteinmenge qualitativ aus **Abbildung 17** und **Abbildung 19** und bezüglich der maximalen und spezifischen Aktivität quantitativ für Sagopilone aus **Tabelle 9** ersichtlich. Somit lässt sich die Aktivität in diesem in der Albumin-AC zuerst eluierenden Fraktionspool der CE zuordnen. Die entsprechenden Fraktionspools für Drospirenon und MPA wurden zwar nicht mittels MALDI-TOF-MS untersucht, doch wurden in der jeweiligen SDS-PAGE auch eine Proteinbande bei 68 kDa (für Drospirenon, **Abbildung 24**) und bei 70 kDa (für MPA, **Abbildung 26**) gefunden, die bezüglich ihrer Lage mit der Bande des mittels MALDI-TOF-MS analysierten SDS-PAGE-Gels für Sagopilone-aktive Fraktionen (70 kDa; **Abbildung 22** und **Abbildung 37**) qualitativ übereinstimmten. Außerdem wurde hier, wie bei Sagopilone, die jeweilige Aktivität größtenteils in den als zweites in der Albumin-AC eluierenden Fraktionspools gefunden (siehe für Drospirenon **Tabelle 10** und für MPA aus **Tabelle 12**). Insofern ist von der Anwesenheit der CE in den für die drei Wirkstoffe aktiven, isolierten Albumin-AC-Fraktionen auszugehen.

Die hier für CE gefundene Molmasse von 70 kDa (**Tabelle 20**) ist übereinstimmend mit Literaturberichten (70 bis 72 kDa [114,137,156,168,219] für eine gereinigte Rattenserum-CE). Es wurde hier eine Ratten-Carboxylesterase 1 (Ratten-CE 1) identifiziert. Rattenserum-CE (Hydrolase S) ist ein Mitglied der CE-Isoenzymfamilie

CES 1 [156,211]. Serum-CE kommt in Plasma vorwiegend als Monomer vor [83,157]. Andere Angaben zur Molmasse von Rattenserum-CE reichten von 58 bis 84 kDa [102,106,134], wobei unterschiedliche Bestimmungsmethoden für die Molmasse und artifizielle Proteinmodifikationen während der SDS-PAGE mögliche Ursachen sein können [98,106,107,134,220-222]. Im Übrigen wurde eine weitere CE in Rattenplasma beschrieben, die aber der CES-2-Isoenzymfamilie angehört [223]. Die hier identifizierte Ratten-CE 1 wies in Übereinstimmung mit anderen Autoren die Eigenschaft auf, sich im Rahmen der Isolierung und Reinigung vergleichsweise schlecht von Albumin zu trennen [134,168,224,225] und auch in der Elektrophorese relativ eng mit der Albuminbande zu wandern [11,92,102,137,139]. Die Identifizierung der Ratten-CE erklärt das hier beobachtete Elutionsverhalten in der Albumin-AC (3.3.4.1 bis 3.3.4.3). Die höchste Aktivität der Sagopilone-, Drospirenon- bzw. MPA-Spaltung wurde vor allem in den zuerst von der Albumin-AC-Säule eluierten Fraktionen gefunden (siehe für Sagopilone **Abbildung 21**, für Drospirenon **Abbildung 23** und für MPA **Abbildung 25**), weil Serum-CE nicht an diese Säule adsorbierte und somit von retiniertem Albumin weitgehend getrennt wurde [114,168,224]. Daneben kann (auf Grund der gemeinsamen Methodik zur Proteinisolierung; siehe 4.3.1) auch BChE in den aktiven Fraktionen präsent gewesen sein, denn in der MALDI-TOF-MS wurden nur die am intensivsten gefärbten Banden und innerhalb dieser Banden nur die Hauptproteine untersucht (2.5.1). Allerdings ist die BChE-Konzentration bzw. –Aktivität in Rattenserum weitaus kleiner als die CE-Konzentration bzw. –Aktivität [11,114], wie in Bezug auf die Aktivität auch in den hier durchgeführten Untersuchungen festgestellt wurde (4.1.1 und 4.1.2). BChE liegt in Plasma in einer tetrahomomeren, globulären, sog. G<sub>4</sub>-Form vor [19,114,226,227]. In einer SDS-PAGE von BChE wurde das Monomer bei 90 kDa und das Dimer bei 180 kDa lokalisiert [228-231]. In der hiesigen MALDI-TOF-MS wurde bei etwa 80 kDa als *Hauptprotein* Transthyretin gefunden (siehe **Tabelle 20**). Der Bereich über 80 kDa wurde auf Grund der relativ schwachen Banden (siehe **Abbildung 37**) nicht untersucht. Das Vorliegen der BChE ist daher hier keineswegs auszuschließen.

Bei 80 kDa wurde in der hiesigen Untersuchung Transthyretin identifiziert (siehe **Tabelle 20**). Transthyretin ist auch als *thyroxine-binding prealbumin* oder kurz Präalbumin bekannt [232,233]. Für Präalbumin wurde eine Molmasse von 50 bis 66 kDa gefunden, wobei Abweichungen davon auf Grund unterschiedlicher

Aminosäuresequenzen und Kohlenhydratketten beschrieben wurden [234]. Es wurden in der Literatur keine Angaben zur Esteraseaktivität des Präalbumins gemacht.

In der hiesigen MALDI-TOF-MS wurde Albumin als Hauptprotein neben CE 1 bei 70 kDa identifiziert (siehe **Tabelle 20**). Albumin, das Protein mit der größten Konzentration im Plasma [235], weist eine sog. *esterase-like activity* [13] (oder auch Pseudoesterase-Aktivität [236]) auf, die darauf zurückzuführen ist, dass Albumin *per se* keine Esterase ist [237], aber Esterase-Substrate spalten kann [11,19]. Da die Umsatzrate im Vergleich zu klassischen Esterasen gering [19], die Konzentration von Albumin im Serum jedoch relativ hoch ist, geht man von einer erheblichen Beteiligung von Albumin an der Hydrolyse von Esterase-Substraten aus [11,238,239]. So wurde für Modellsubstrate (z. B. NPA [101,105,240,241]) sowie diverse Wirkstoffe und Organophosphate die Spaltung durch Albumin gezeigt [11,12,236,237,242,243]. Allerdings wurde für einige kommerziell erwerbliche Albumintypen gezeigt, dass sie mit BChE kontaminiert waren und die Esteraseaktivität darauf zurückgeführt wurde [13,244,245]. In Bezug auf Lacton-Wirkstoffe kann Albumin die Lactonringspaltung und die Lactonisierung beeinflussen [246,247]. In der hier durchgeführten Untersuchung aber scheint Albumin zumindest keine wesentliche Bedeutung in Bezug auf den Abbau von Sagopilone, Drospirenon und MPA zu haben, da in der Albumin-AC die jeweilige Hauptaktivität in den Albumin-abgereicherten Fraktionen gefunden wurde.

Als Resümee lässt sich sagen, dass Ratten-CE 1 als eine bekannte Esterase in den für Sagopilone aktiven Albumin-AC-Fractionen mittels MALDI-TOF-MS gefunden wurde. Ihre Proteinbande bei etwa 70 kDa kam auch in den für Drospirenon und MPA aktiven Albumin-AC-Fractionen vor und legt daher hier ihre Existenz nahe. BChE könnte auch in diesen Fraktionen vorliegen, würde aber auf Grund der geringen Konzentration und der hier angewandten Methodik nicht identifiziert. Die Beteiligung von Serumalbumin (als Protein mit Esterase-artigem Charakter) an der Spaltung der drei Wirkstoffe in den jeweiligen Fraktionen wurde als wenig bedeutsam gesehen.

#### **4.4.1.2 Nachweis der Rattenserum-PON1 durch Western Blot und MALDI-TOF-MS**

Es wurde ein Western Immunoblot für alle Fraktionen der PON-AC aus Rattenserum durchgeführt (2.5.3). In **Abbildung 38** sind in den Fraktionen 19-22 eine intensiv gefärbte Bande bei etwa 43 kDa und je eine schwächer gefärbte Bande bei etwa 45 und 38 kDa zu sehen. Damit wurde PON1 in diesen Fraktionen nachgewiesen (3.4.1.2). Die Erscheinung, dass PON1 neben einer intensiven Hauptbande mehrere schmale Banden in der SDS-PAGE zeigt, wurde auch in der Literatur beschrieben [173,181,248,249]. Dieses Phänomen wurde auf den unterschiedlichen Glykosylierungsgrad der PON zurückgeführt [250,251]. Der hier verwendete primäre Antikörper (2.5.3) ist im Kaninchen gegen 12 Aminosäuren (Position 298 bis 309) der humanen PON1 (hPON1) produziert worden [252]. Die entsprechende Aminosäuresequenz der Ratten-PON1 unterscheidet sich von der humanen PON1 in zwei Aminosäuren [252]. Es wurde in der Literatur beschrieben, dass Anti-PON-Antikörper eine hohe Tendenz zu Kreuzreaktionen sowohl in Bezug auf PON-Isoenzyme (PON1, PON2 und PON3) innerhalb einer Spezies [248,253] als auch in Bezug auf ein bestimmtes PON-Isoenzym zwischen verschiedenen Spezies zeigten [173,254,255]. Dies wurde mit der hohen intra- und interspezifischen Überstimmung der Aminosäuresequenz der PON-Isoenzyme von 60 bis 86 % begründet [17,181,214,256,257]. Insofern ist die positive (Kreuz-)Reaktion des hier verwendeten Anti-hPON1-Antikörpers für Rattenserum-PON1 erklärbar.

In der für PRASL aktiven PON-AC-Fraktion 25 wurde bei etwa 23 kDa Ratten-Apo A-I mittels MALDI-TOF-MS identifiziert (siehe **Tabelle 20**). Apo A-I ist ein wesentlicher Bestandteil von HDL-Partikeln und macht in der Ratte etwa 50 bis 60 % (m/m) dieser Partikel aus [258]. Einige Enzyme und andere Proteine sind in Serum an HDL assoziiert [259], darunter auch PON1 und PON3 [17,259-263]. Für Apo A-I wurde beschrieben, dass es bei der Isolierung und Reinigung mit PON koeluiert [250,263,264]. Die hier gefundene Anwesenheit von Apo A-I (3.4.1.1) bestätigt daher indirekt die Präsenz von PON1 in der untersuchten Fraktion. Für Apo A-I wurde eine Molmasse von 28 kDa in Rattenserum berichtet [172,249,250,255]. Dass hier Apo A-I bei 23 kDa gefunden wurde, kann möglicherweise auf das Vorliegen verschiedener polymorpher Varianten von Apo A-I zurückgeführt werden, die sich jeweils durch eine Substitution einer Aminosäure in ihrer Primärstruktur und daraus folgend in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden [265]. In der SDS-PAGE hat die

Eigenladung des Proteins einen Einfluss auf das Ausmaß der Beladung mit Natriumlaurylsulfat und damit auf die Molmassenbestimmung [222]. PON1 wurde in der PON-AC in den Fraktionen 19-30 mittels Western Blot nachgewiesen (siehe **Abbildung 38**). Die Fraktionen 19-22 wurden beim Waschen der Cibacron-Matrix im NaCl-freien Puffer (2.4.4) erhalten. Bereits hier wurde ein Großteil der adsorbierten PON von der Säule gewaschen, wie der Western Blot zeigte (**Abbildung 38**). Der verbleibende Anteil der PON wurde dann in den PON-AC-Fraktionen 23-30 wiedergefunden, die ebenfalls Waschfraktionen darstellten. Im Gegensatz zu Literaturberichten [172,214,250] wurde PON hier nicht erst bei der Elution mit Natriumdesoxycholat von der Cibacron-Matrix desorbiert, sondern hauptsächlich schon beim Waschen mit NaCl-freiem Puffer. Dies ist wahrscheinlich mit der veränderten Methodik zu erklären: PON wurde hier in einem initialen Puffer mit 2 M NaCl und in den Berichten mit 3 M NaCl an die Blue-Sepharose-Matrix gebunden [172,214,250]. Daher war in der hiesigen PON-AC möglicherweise die Bindung der PON an die Matrix schlechter. Die Verwendung eines Puffers mit 2 M NaCl war hier notwendig gewesen, weil ein höher molarer Puffer einen zu großen, technisch nicht tolerablen Gegendruck während der Chromatografie erzeugte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Rattenserum-PON1 und Apo A-I in den für PRASL aktiven Fraktionen aus Rattenserum nachgewiesen wurden. Die Anwesenheit von Apo A-I (ein HDL-Hauptbestandteil) bestätigt indirekt das Vorliegen von PON, da PON1 im Serum mit HDL assoziiert ist.

#### **4.4.2 Proteinidentifizierung in Hundeserum bzw. Fraktionen aus Hundeserum**

##### **4.4.2.1 Identifizierung von $\alpha_2$ -Makroglobulin durch LC-ESI-MS**

In der SDS-PAGE der für MPA aktiven SEC-Fraktionen 17-23 aus Hundeserum wurde bei etwa 138 kDa  $\alpha_2$ M des Hundes (siehe **Abbildung 39**) mittels LC-ESI-MS (2.5.2) identifiziert.

$\alpha_2$ M ist ein Glykoprotein, das im Plasma als endogener Inhibitor zahlreicher Proteasen fungiert [266,267]. Das  $\alpha_2$ -Globulin liegt in Plasma als Tetramer mit einer Molmasse von insgesamt etwa 720 kDa vor [266]. Dieses Tetramer besteht aus zwei Dimeren, die wiederum aus je zwei Untereinheiten von 180 kDa zusammengesetzt sind. Beim Erwärmen von  $\alpha_2$ M in SDS-haltigen Lösungen und nachfolgender SDS-

PAGE unter reduzierenden Bedingungen (vgl. 2.4.6.1) wurde in der Literatur zusätzlich zu der 180-kDa-Bande des Monomers jeweils ein Fragment bei 120 und 60 kDa detektiert [266]. Diese Hitzedenaturierung wurde mit der Bildung eines Pyroglutamylrestes im Bereich der sog. *bait region* von  $\alpha_2$ M und nachfolgender Fragmentierung der Peptidkette erklärt [266]. Dass hier das Fragment bei 140 kDa gefunden wurde, ist möglicherweise auf den sehr heterogenen Glykosylierungsgrad von  $\alpha_2$ M zurückzuführen [266,268].

Die Anwesenheit von  $\alpha_2$ M in den für MPA aktiven SEC- und Albumin-AC-Fractionen aus Hundeserum (3.4.1.2) liefert *a priori* keine Erklärung für die Esteraseaktivität dieser Fraktionen. Es ist allerdings bekannt, dass  $\alpha_2$ M u. a. mit verschiedenen Serinproteasen kovalente Komplexe bilden kann, wobei die Proteasen dabei einen Großteil (d. h. ca. 90 bis 95 %) ihrer Proteaseaktivität gegenüber hochmolekularen Substraten einbüßen, aber ihre Esteraseaktivität gegenüber niedermolekularen Substraten (unter 25 kDa [267,269]) nahezu erhalten (ca. 10 bis 20 % Aktivitätsverlust) [269-273]. In der hier durchgeführten Untersuchung wurde Hundeserum verwendet. An der Blutgerinnung (zur Herstellung des Serums) sind bekanntermaßen zahlreiche Serinproteasen beteiligt. Diese könnten mit  $\alpha_2$ M Komplexe bilden, die Esteraseaktivität zeigen. Bei der Komplexbildung einer Protease ändert  $\alpha_2$ M meistens seine Konformation (*slow to fast form transition*) [266-268]. Deshalb migriert  $\alpha_2$ M im Komplex mit einer Protease während einer nativen PAGE schneller als in freier Form. Dieser sog. *gel shift* [267] war in der Literatur in Hundeserum, das im Gegensatz zu *Plasma* zahlreiche aktivierte Gerinnungsproteasen enthält, nicht zu beobachten [268]. Daher erscheint es als wenig wahrscheinlich, dass eine mit  $\alpha_2$ M komplexierte Serinprotease der Gerinnungskaskade die Ursache für die Esteraseaktivität gegenüber MPA war. Neben Serinproteasen der Gerinnungskaskade sind auch andere Serinhydrolasen, wie z. B. BChE, im Serum präsent. Daher ist wahrscheinlich für solche Hydrolasen eine Komplexbildung mit  $\alpha_2$ M *in vivo* möglich [266]. Im Gegensatz zur kovalenten, im Prinzip irreversiblen Komplexbildung von Proteasen [266,267] scheint dieser  $\alpha_2$ M-Esterase-Komplex bei der Probenvorbereitung zur oder während der SDS-PAGE wieder zu zerfallen und in der Folge keine Veränderung der Molmasse von  $\alpha_2$ M in der SDS-PAGE zu ergeben. Deshalb wurde in der hiesigen Untersuchung  $\alpha_2$ M in etwa bei der erwarteten Molmasse eines  $\alpha_2$ M-Fragments (siehe oben) identifiziert.

Für eine *native* PAGE sind solche Komplexe zwischen BChE und  $\alpha_2$ M tatsächlich beschrieben worden [11]. Dabei erhält BChE, in Analogie zu den Proteasen, seine Esteraseaktivität [11]. Ob diese Aktivität auch die Spaltung von MPA einschließt, lässt sich hier nicht endgültig verifizieren. Natürlich könnten auch AChE und CE in Hundeserum mit  $\alpha_2$ M Komplexe bilden, da diese Serinhydrolasen ebenfalls in Hundeserum vorkommen [92]. Jedoch ist bekannt, dass die Konzentration beider Esterasen in Hundeserum jeweils kleiner als die von BChE ist [92,139,274,275]. Dieser Konzentrationsunterschied spiegelte sich im Übrigen als Aktivitätsunterschied auch in den hiesigen Untersuchungen mit  $^{14}$ C-ATC-Iodid und MeOct in Hundeserum wieder (3.1.1 und 3.1.2). Insofern ist die Beteiligung von AChE oder CE bei der Komplexierung mit  $\alpha_2$ M wahrscheinlich nur von untergeordneter Bedeutung im Vergleich zu BChE.

Als Zusammenfassung ist festzustellen, dass in den für MPA aktiven SEC- und Albumin-AC-Fractionen  $\alpha_2$ M mittels LC-ESI-MS identifiziert wurde. Damit kann angenommen werden, dass eine mit  $\alpha_2$ M komplexierte Serinhydrolase mit Esteraseaktivität für MPA (wahrscheinlich BChE) in diesen Fraktionen vorlag.

#### **4.4.2.2 Nachweis der Hundeserum-PON1 durch Western Blot**

Im Western Blot der PON-AC-Fractionen 19-22 und 39-42 aus Hundeserum wurde eine intensive Färbung der Proteinbande bei 41 kDa festgestellt (siehe **Abbildung 40**). Dieselbe Bande wurde mit schwächerer Intensität auch in den Fraktionen 43-45 und 52-59 gefunden.

Obwohl PON und *PON-like proteins* (wie z. B. Phosphotriesterasen und Lactonasen) in allen Säugetieren vorkommen und auch im Allgemeinen in allen lebenden Organismen weit verbreitet sind [181,276-279], wurde über die Isolierung einer PON bezogen auf den Hund bisher nicht berichtet. Dagegen wurde die Arylesteraseaktivität in Hundeserum oder -plasma in meist elektrophoretischen Studien beschrieben [92,94,274,280-282]. Auf Grund der hohen Tendenz der Anti-PON-Antikörper zu Kreuzreaktionen mit PON-Isoenzymen einer und verschiedener Spezies (siehe oben) ist die hier gefundene positive (Kreuz-)Reaktion des Anti-hPON1-Antikörpers für Hunde-PON1 (3.4.2.2), wie auch bei Ratten-PON1 (4.4.1.2), nicht unerwartet. Die Lage der Bande bei 41 kDa befindet sich im bekannten Bereich der Molmasse von PON1 (37-48 kDa) [178,276]. Die in **Abbildung 40** zu sehende,

schwächer gefärbte Bande kurz unterhalb der Hauptbande spiegelt die typische Eigenschaft der PON1 wieder, auf Grund des unterschiedlichen Glykosylierungsgrads in der SDS-PAGE z. T. mehrere Banden zu zeigen [178]. Im Gegensatz zu Ratten-PON1 (4.4.1.2) eluierte bei der PON-AC von Hundeserum PON1 im Prinzip in allen Fraktionen, d. h. sowohl bei Waschen der Säule mit NaCl-freiem Puffer (Fraktionen 19-22) als auch bei der Elution mit Natriumdesoxycholat (Fraktionen 39-42 und 43-45; siehe **Abbildung 40**). Der verbleibende Rest der PON1 wurde bei der Rekonstitution der Matrix in den Fraktionen 52-59 gewonnen. Hunde-PON1 bindet also im Vergleich zur Ratten-PON1 (4.4.1.2) stärker an die Cibacron-Matrix. Für das etwas ungewöhnliche Auftreten der diffusen 49-kDa-Bande der PON-AC-Fraktionen 23-30 wurde keine Erklärung gefunden, zumal diese Fraktionen wie die Fraktionen 19-22 beim NaCl-freien Waschen der Säule erhalten wurden. Möglicherweise handelt es sich um ein methodisches Artefakt im Zusammenhang mit der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE (2.5.3). Resümierend ist festzuhalten, dass die Fraktionen 19-22, 39-42, 43-45 und 52-59 der PON-AC von Hundeserum PON1 enthielten.

## 4.5 Inhibitorscreening

### 4.5.1 Screening in isolierten Fraktionen aus Rattenserum

Die aus Rattenserum isolierten Albumin-AC-Fraktionen wurden mit ausgesuchten Inhibitoren (2.6.1) im Rahmen eines Inhibitorscreenings inkubiert (2.6.2). Aus **Tabelle 21** ist zu ersehen, dass die Inhibitoren BNPP und Pefabloc SC in den für Sagopilone, Drospirenon und MPA aktiven Fraktionspools eine relativ hohe Wirksamkeit zeigten (je >80 % Inhibition bei einer Konzentration von 1 mM). **BNPP** ist das Natriumsalz eines Phosphorsäurediester (2.1.1), das als potenter, irreversibler CE-Inhibitor sehr häufig eingesetzt wurde [z. B. 20,22,110,201]. Die Wirkung wird durch Reaktion einer Seryl-OH-Gruppe im aktiven Zentrum der CE mit dem Phosphorsäureester vermittelt, wobei der Serylrest dabei phosphoryliert und das Enzym inaktiviert wird [283,284]. Phosphorsäureester inhibieren nicht nur CE, sondern im Allgemeinen auch andere Serinhydrolasen, d. h. Hydrolasen mit einem Serylrest im katalytischen Zentrum [285,286]. Für BNPP wurde im Vergleich zu Paraoxon (Diethyl-*p*-nitrophenylphosphat) eine höhere Spezifität für CE als für andere Serinhydrolasen angegeben [71,83,287]. Eine Spezifität *per se* für CE ist

(verglichen mit BChE) aber nicht feststellbar [110,183,201,288]. Insofern ist die hohe Wirksamkeit von BNPP in den hier untersuchten Fraktionen nicht ausschließlich auf die Aktivität von CE zurückzuführen.

**Pefabloc SC** ist ein Vertreter der Sulfonylfluoride, die als irreversible Inhibitoren von Serinhydrolasen bekannt sind [286]. Die Sulfonylfluoride reagieren in Analogie zu den oben erwähnten Organophosphaten, und hinterlassen dabei ein sulfonyliertes, inaktiviertes Enzym [286,289]. Pefabloc SC reagiert unter den Serinhydrolasen mit Chymotrypsin etwas schneller als mit Trypsin [290-292]. Im Gegensatz dazu ist das ebenfalls hier eingesetzte Sulfonylfluorid **APMSF** ein spezifischer Inhibitor der sog. *trypsin-like enzymes* [286,293], d. h. Serinproteasen, die sich aus mechanistischer Sicht wie Trypsin verhalten [294]. Für APMSF wurde im Inhibitorscreening nur eine geringe Wirksamkeit erzielt, die aber für die Sagopilone aktiven Fraktionen größer als für die Drospirenon und MPA aktiven Fraktionen war (3.5.1). Aus der vergleichsweise hohen Wirksamkeit von BNPP und Pefabloc SC wird hier auf die Anwesenheit *und* Beteiligung einer Serinhydrolase (Serinesterase) in den untersuchten Fraktionen geschlossen. Die fehlende Wirksamkeit der Inhibition durch APMSF in den für Drospirenon und MPA aktiven Fraktionen deutet bereits auf einen Unterschied in der qualitativen Zusammensetzung zu den für Sagopilone aktiven Fraktionen hin. Eine relativ starke Inhibition von >70 % ist mit 1 mM **NBS** in allen Fraktionen erreicht worden (**Tabelle 21**). NBS ist ein bekanntes Agens zur Modifizierung von Tryptophanylresten in Proteinen, wobei es auch mit anderen Aminosäureresten reagiert [295]. Dadurch kommt es bei CE und BChE zu einem erheblichen Aktivitätsverlust [85,86], wie er hier auch gefunden wurde (3.5.1).

**EDTA** zeigte eine starke Inhibition in den für Drospirenon und MPA aktiven Fraktionen, während sie in den für Sagopilone aktiven Fraktionen geringer war (**Tabelle 21**). EDTA ist ein Metallionen-chelatisierendes Agens, dass insbesondere Metallionen-abhängige Proteasen (Metalloproteasen) hemmen kann [296]. Auch andere, nicht-metallionenabhängige Enzyme können durch EDTA in ihrer Aktivität inhibiert werden [267,296-298]. Für CE lag die verbleibende Aktivität meistens bei ca. 80 % [72,111,158,164]. BChE wies eine stärkere Inaktivierung durch EDTA auf [299]. Daher kann eine bessere Zugänglichkeit von Chelatkomplexbildnern zu Metallionen-bindenden Regionen der BChE im Vergleich zur CE vermutet werden [299]. Tatsächlich wurde BChE durch *o*-Phenanthrolin, einem relativ lipophilen Chelatkomplexbildner mit hoher Spezifität für Zinkionen ( $Zn^{2+}$ ) [298], stärker inhibiert

als CE [157,299,300]. Die schwächere Inhibition von Chelatkomplexbildnern für CE als für BChE wurde hier auch in Bezug auf die Wirksamkeit von EDTA gefunden (3.5.1), so dass dieser Unterschied auf die Beteiligung von CE in den für Sagopilone aktiven Fraktionen und von BChE in den für Drospirenon und MPA aktiven Fraktionen am jeweiligen Wirkstoffumsatz hindeutet.

**Zn<sup>2+</sup>** und andere Metallionen inhibieren die Aktivität der BChE deutlich [301,302]. Wenn BChE in den für Drospirenon und MPA aktiven Fraktionen vorliegen sollte, müssten Zn<sup>2+</sup> im hier durchgeführten Inhibitorscreening eine wesentliche Inhibition zeigen. Zumindest für MPA traf dies auch zu, für Drospirenon jedoch nicht (**Tabelle 21**). Im Inhibitorscreening wurde ein Calciumionen- (Ca<sup>2+</sup>-)haltiger Fraktionspool (10 mM) mit 1 bis 100 mM Zinksulfat inkubiert (2.6.2). Dabei kam es vermutlich nur zu einer schwachen Inhibition der BChE durch Zn<sup>2+</sup>, da Ca<sup>2+</sup> eine durch Zn<sup>2+</sup> inhibierte BChE reaktivieren können [299,301,303]. Dass die Zn<sup>2+</sup>-vermittelte Inhibition für den MPA-Abbau schwächer als für den Drospirenonabbau ausfiel, deutet auf einen qualitativen Unterschied beider Fraktionspools mit einer höheren Sensitivität der Esterasen im für MPA aktiven Pool gegenüber dem für Drospirenon aktiven Pool hin. Die Inkubation mit 100 mM Zinksulfat führte bei MPA zur praktisch kompletten Inhibition, weil wahrscheinlich eine (makroskopisch nicht sichtbare) Proteinpräzipitation auftrat, die auch in unfraktioniertem Ratten- bzw. Hundeserum (bei 100 bzw. 10 mM; Daten nicht gezeigt) sowie in einem Literaturbericht festgestellt wurde [302].

**Aldrithiol-2** ist ein Reagens zur Bestimmung von freien SH-Gruppen in Proteinen [67]. Das Disulfid reagiert mit einer SH-Gruppe unter Abspaltung von 2-Thiopyridin [67,304]. Bei der Inkubation von Proteinen mit überschüssigen SH-Reagentien kann es zur Proteindenaturierung und –präzipitation kommen [305]. Für BChE wurde beschrieben, dass es vermutlich wegen einer freien Cysteyl-SH-Gruppe mit SH-Reagentien reagierte [304,306]. Bei Inkubation mit solchen Reagentien blieb die BChE-Aktivität aber erhalten [86]. Unter der Annahme, dass BChE in den für Drospirenon und MPA aktiven Fraktionspools enthalten war, ist somit das hier gefundene Ergebnis erklärbar, dass Aldrithiol-2 nicht zu einer Inhibition der Spaltung von Drospirenon und MPA führte (**Tabelle 21**). Für Rattenserum-CE wurde in der Literatur keine freie SH-Gruppe berichtet [304,307]. Trotzdem fand in dem für Sagopilone aktiven Fraktionspool, der CE enthielt (4.4.1.1), mit Aldrithiol-2 eine merkliche Inhibition von ca. 55 % statt (**Tabelle 21**). In einer Literaturrecherche

wurde eine Inhibition der Esteraseaktivität bei der Inkubation von CE mit SH-Reagentien gefunden [22,68,85,134,304,308,309]. Daher unterstützt die höhere Wirksamkeit der Inhibition durch Aldrithiol-2 im für Sagopilone aktiven Pool die Annahme, dass CE hier am Sagopiloneumsatz beteiligt war. In jedem Fall ist festzuhalten, dass es sich bei den hier untersuchten Esterasen nicht um Cysteinhydrolasen handelte, die diese auf Grund ihres katalytischen Cysteyl-SH-Restes wesentlich empfindlicher gegenüber SH-Reagentien reagieren als z. B. Serinhydrolasen [310]. Auch Arylesterasen weisen eine höhere Sensitivität gegenüber solchen Reagentien als Serinesterasen auf [20] und lagen deshalb hier ebenso nicht vor.

**TLCK** ist ein Histidin-modifizierendes Agens, das durch Reaktion mit der Seryl-OH-Gruppe (bezogen auf Serinhydrolasen) zur irreversiblen Enzyminaktivierung führt [286,311,312]. Im Gegensatz zu den meisten Serin- und auch Cysteinhydrolasen [267] wird BChE durch TLCK nicht kovalent und irreversibel modifiziert, sondern nur reversibel inhibiert [313,314]. Wahrscheinlich binden die Chloromethylketone nicht nur an das aktive Zentrum, sondern auch an benachbarte, hydrophobe Stellen im Enzym, da eine sog. *hyperbolic mixed-type inhibition* festgestellt wurde [313]. Hier bindet ein Inhibitor sowohl an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex; gleichsam bindet das Substrat an das Enzym und den Enzym-Inhibitor-Komplex [198]. Dabei kann der ternäre Komplex aus Enzym, Substrat und Inhibitor selbst bei hoher Inhibitorkonzentration noch Produkt bilden [301]. Die fehlende inhibitorische Wirksamkeit von TLCK in den für Drospirenon und MPA aktiven Fraktionspools (3.5.1) spricht damit für die Anwesenheit von BChE. Für CE wurde, anders als für BChE, eine relativ starke Inhibition durch TLCK berichtet [134,158,315-317]. Die Chloromethylketone binden vermutlich, im Gegensatz zu BChE, kovalent und irreversibel an den Histidylrest im aktiven Zentrum der CE, da in Gegenwart von entsprechenden Substraten der Umsatz deutlich eingeschränkt ist. Somit wird die oben erwähnte Vermutung bestärkt, dass im für Sagopilone aktiven Fraktionspool CE am Sagopiloneumsatz beteiligt war.

Tetraalkylammoniumionen, wie das hier eingesetzte **TBA**, sind bekannte reversible Inhibitoren der ChE [318]. Sie zeigen, bezogen auf BChE, einen dualen Mechanismus einer Aktivierung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mM und einer reversiblen Inhibition bei höheren Konzentrationen [318-320]. BChE-Substrate binden sowohl an die bekannte katalytische Triade sowie die *anionic site* der BChE

(eine Bindungsstelle für elektrisch positiv geladene Substrate) als auch an die weiter entfernt liegende *peripheric anionic site* (PAS) [321,322]. An letztere binden in niedrigen Konzentrationen gleichfalls die Tetraalkylammoniumionen und konkurrieren daher mit dem Substrat. Durch die Bindung des Substrats an die PAS kann eine Substratinhibition vermittelt werden, so dass diese in Gegenwart der Tetraalkylammoniumionen entfällt und sich deshalb eine *scheinbare* Aktivierung der BChE ergibt [318]. In hohen Konzentrationen binden Tetraalkylammoniumionen sowohl an die *anionic site* als auch an die PAS und stellen dann (reversible, kompetitive) Inhibitoren dar [318]. Der scheinbar aktivierende Effekt der Tetraalkylammoniumionen nimmt vom Tetramethyl- bis zum Tetrapropyl-Homologen zu und fällt für TBA (vermutlich auf Grund der sterischen Hinderung) wieder ab [87,320,321,323]. Nimmt man also an, dass in den hier untersuchten, für Drospirenon und MPA aktiven Fraktionspools BChE enthalten war, müsste für 10 mM TBA und 10 µM Drospirenon bzw. 0,2 µM MPA ein gemischter Effekt aus Aktivierung und Inhibition auftreten [318]. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Inhibitorscreenings (3.5.1), die eine schwache Inhibition (<50 %) in den für Drospirenon und MPA aktiven Fraktionspools zeigten. Offensichtlich überwog hier der aktivierende Effekt des TBA. Die Interaktion von CE mit Tetraalkylammoniumionen scheint eher auf die Bildung von Mizellen des Inhibitors als auf einen spezifischen Mechanismus zurückzuführen sein. Bei Inkubation von CE mit Tetraalkylammoniumionen in einer Konzentration über ihrer *critical micelle concentration* (CMC) wurde eine Inhibition festgestellt [164,324]. Dies galt des Weiteren auch für CE [207,325-328] und PON [179,263,329,330] bei einer Behandlung mit nicht-ionischen und anionischen Detergentien in Konzentrationen über ihrer CMC [18,331]. Für TBA wurde in der Literatur leider kein CMC-Wert angegeben, doch für strukturverwandete Tetraalkylammoniumsalze lag die CMC bei bis zu 100 mM [324]. Selbst wenn für TBA bei der im Inhibitorscreening verwendeten Konzentration von 10 mM (2.6.2) die CMC noch nicht überschritten war, kann es trotzdem zu Interaktionen mit hydrophoben Bereichen des Enzyms gekommen sein, die möglicherweise zur Konformationsänderung oder sogar partiellen Denaturierung führten [179,209,326,328]. Für BChE wurde im Übrigen keine Inhibition (zumindest durch nicht-ionische Detergentien) beschrieben [18]. Insofern wird die Annahme, dass BChE in den für Drospirenon und MPA aktiven Fraktionspools enthalten und CE in dem für Sagopilone aktiven Pool am Umsatz des Wirkstoffs beteiligt war,

bestärkt, weil CE durch die vermutete, grenzflächenaktive (und mizellbildende) Eigenschaft des TBA inhibiert wurde, während für BChE ein spezifischer Mechanismus der Aktivierung/Inhibition durch TBA vorrangig war.

**TAME** ist ein *N*- $\alpha$ -substituierter Methylester der Aminosäure Arginin. Es dient als Substrat zur Bestimmung der Esteraseaktivität vor allem von sog. *trypsin-like*-Serinproteasen [294], wie z. B. Thrombin [332-335], Plasmin [336,337] sowie Kallikrein [337-341] und anderen [342-346]. In Gegenwart geeigneter Substrate fungiert TAME als reversibler, kompetitiver Inhibitor der genannten Serinproteasen [80,81,347-350]. BChE interagiert in Literaturberichten nicht oder kaum mit *N*- $\alpha$ -substituierten, basischen Aminosäureamiden bzw. aliphatischen oder neutralen Aminosäureestern [351-353]. Folglich ist wahrscheinlich auch keine Interferenz beim Umsatz eines BChE-Substrats in Anwesenheit von TAME (einem *N*- $\alpha$ -substituierten, basischen Aminosäureester) zu erwarten. Die gleiche Vermutung gilt für CE, da in der Literatur keine Aktivität der CE hinsichtlich der Spaltung von TAME beschrieben wurde [113,354,355]. Im hier durchgeführten Inhibitorscreening wurde in den für Sagopilone und Drospirenon aktiven Fraktionspools keine Inhibition durch TAME gesehen (3.5.1). Dies unterstützt die Annahme, dass CE bzw. BChE am Abbau des jeweiligen Wirkstoffs in dem für Sagopilone bzw. Drospirenon aktiven Fraktionspool beteiligt waren. Für MPA wurde eine hinreichende Inhibition von ca. 51 % festgestellt, die sich durch Konzentrationssteigerung nicht weiter erhöhte (**Tabelle 21**). Dieses Ergebnis würde für die Beteiligung einer *trypsin-like*-Serinprotease am MPA-Abbau sprechen. Möglicherweise lag also im für MPA aktiven Fraktionspool eine Serinprotease *neben* oder *assoziiert* mit BChE vor und trug zum MPA-Umsatz bei. BChE kann Komplexe mit Serinproteasen (und anderen Serumproteinen) *via* Protein-Protein-Interaktionen bilden und/oder gemeinsam mit solchen Proteinen isoliert werden [351].

**NaF** ist als Inhibitor zahlreicher Enzyme bekannt [356]. So hemmt es beispielsweise die Enolase im Rahmen der Glykolyse [357]. Bezogen auf Esterasen wurde NaF zur qualitativen Charakterisierung von Esterasen in Zellen verwendet [130,131,315,358]. NaF inhibiert sowohl BChE als auch CE. In einer Literaturrecherche lag die zur effizienten Hemmung benötigten Konzentration für beide Esterasen meist im oberen millimolaren Bereich (>1 mM) [85,110,113,164,165,208,309,359-363]. Das Fluoridion bindet dabei reversibel wahrscheinlich an Histidylreste des Enzyms innerhalb und außerhalb des katalytischen Zentrums [83,315,364-366]. In der Folge kommt es zu

einer Konformationsänderung mit Aktivitätsverlust [315]. Bei niedrigem pH-Wert, niedriger Temperatur und geringer Substratkonzentration wird die Inhibition verstärkt [365]. Im hier durchgeführten Inhibitorscreening zeigte NaF eine konzentrationsabhängige Inhibition in dem für Sagopilone aktiven Fraktionspool (**Tabelle 21**). Für die für Drospirenon und MPA aktiven Pools wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition durch NaF leider nicht experimentell überprüft. Unter der Annahme, dass in diesen Pools BChE enthalten war, wäre hier, wie für CE im für Sagopilone aktiven Pool, eine stärkere Inhibition bei Erhöhung der NaF-Konzentration zu erwarten gewesen.

Zusammenfassend aus dem Inhibitorscreening (3.5.1) ist zu sagen, dass in den für Sagopilone, Drospirenon und MPA aktiven, untersuchten Pools aus der Fraktionierung von Rattenserum mindestens eine Serinhydrolase am Umsatz der drei Wirkstoffe beteiligt war. In dem für Sagopilone aktiven Fraktionspool war dies wahrscheinlich CE und in den für Drospirenon und MPA aktiven Pools BChE, wobei für MPA zusätzlich die Beteiligung einer Serinprotease möglich erscheint.

#### 4.5.2 Screening in unfraktioniertem Rattenserum

Um die Wirksamkeit der Inhibitoren in unfraktioniertem Rattenserum zu testen und die Annahmen aus dem Inhibitorscreening der isolierten Fraktionen zu überprüfen, wurde das Screening für die drei Wirkstoffe Sagopilone, Drospirenon und MPA auf Rattenserum erweitert. Erstmals wurde das Screening auch für PRASL in dieser Matrix durchgeführt (2.6.2).

Wie in den Fraktionspools (4.5.1) wurde für Sagopilone und MPA eine sehr hohe Wirksamkeit für die Inhibitoren **BNPP** und **Pefabloc SC** erzielt (für jeweils 1 mM >92 % Inhibition; siehe **Tabelle 22**). Bei Drospirenon blieb die Wirksamkeit dieser Inhibitoren im Vollserum hinter der in dem Fraktionspool zurück (62-64 % vs. 90-98 % für jeweils 1 mM BNPP bzw. Pefabloc SC; siehe **Tabelle 21** und **Tabelle 22**). Offenbar war also neben einer Serinhydrolase (vermutlich CE laut Annahme bei 4.5.1) noch eine Esterase am Umsatz von Drospirenon beteiligt, die nicht durch die beiden Serinhydrolasen-Inhibitoren inhibiert wurde. Diese Esterase war hier vermutlich Rattenserum-PON1 [11,19,181,276]. PON setzt gerade Organophosphate als Substrate um [176,277]. Sulfonylfluoride beeinflussen die PON-Aktivität im Vergleich zur BChE- oder CE-Aktivität nur marginal [20,367]. Daher ist aus der relativ geringen Wirksamkeit von BNPP und Pefabloc SC für die Inhibition des

Drospirenonabbau in Rattenserum abzuleiten, dass wahrscheinlich PON1 neben BChE eine bedeutende Rolle für den Abbau spielte.

**EDTA** zeigte im Inhibitorscreening in Rattenserum, anders als in den jeweiligen Fraktionspools, keine Wirksamkeit für die Stabilisierung von Sagopilone und MPA und nur eine geringe, aber im Vergleich zu Sagopilone und MPA größere Wirksamkeit für Drospirenon (**Tabelle 22**). CE und BChE sind nicht-metallionenabhängige Serinesterasen. Der hier eingesetzte Überschuss an EDTA (20 mM, siehe **Tabelle 22**) würde Metallionen-abhängige Esterasen (also hier die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Serum-PON1) weitgehend inhibieren [17,75,88,173,178,250,298,368]. Daher unterstützt die fehlende inhibitorische Wirksamkeit von EDTA die Annahme (4.5.1), dass CE am Sagopiloneumsatz und BChE am MPA-Umsatz in Rattenserum beteiligt waren. Für Drospirenon war die Wirksamkeit von EDTA größer als für Sagopilone und MPA, da wahrscheinlich PON1 im Drospirenonumsatz in Rattenserum involviert war.

$\text{Zn}^{2+}$  hatten keinen Einfluss auf die Spaltung von Sagopilone und Drospirenon in Rattenserum sowie in den Fraktionspools (4.5.1), dagegen zeigte sich eine geringe Wirksamkeit von 10 mM  $\text{Zn}^{2+}$  für die Stabilisierung von MPA (siehe **Tabelle 22**).  $\text{Zn}^{2+}$  können sowohl BChE als auch PON1 inhibieren, wobei das Enzym durch  $\text{Ca}^{2+}$  reaktivierbar ist [88,299,301,303]. Wenn Drospirenon von BChE und PON1 gespalten wurde, müsste eine Inhibition des Drospirenonabbaus durch  $\text{Zn}^{2+}$  in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  (aus dem Rattenserum; 2.6.2) praktisch nicht sichtbar sein [301], wie es hier auch festgestellt wurde (3.5.2). Für MPA hingegen war die inhibitorische Wirksamkeit von  $\text{Zn}^{2+}$  größer. Demnach war vermutlich hier nicht BChE wesentlich am Umsatz beteiligt, sondern eine (mit BChE assoziierte und/oder isolierte) Serinprotease [351]. Für einige Serinproteasen wurde in der Literatur eine Inhibition durch  $\text{Zn}^{2+}$  beschrieben [369-372].

**TAME** zeigte keine ausreichende Wirksamkeit für die Inhibition der Spaltung von Sagopilone, Drospirenon und MPA in Rattenserum (siehe **Tabelle 22**). Dies unterstützt die Annahme, dass Sagopilone durch CE und Drospirenon durch BChE umgesetzt wurden, da beide Esterasen vermutlich nicht mit TAME interagieren. Wenn für den MPA-Umsatz in Rattenserum eine *trypsin-like*-Serinprotease (neben BChE) verantwortlich gewesen sein sollte, müsste eine höhere Wirksamkeit von TAME bezüglich der Inhibitionspezies sichtbar gewesen sein. Dies traf, im Gegensatz zum Inhibitorscreening im Fraktionspool (4.5.1), hier aber nicht zu. Nicht

alle Serinproteasen setzen TAME um [344,373]. In unfraktioniertem Rattenserum war daher wahrscheinlich ein anderer Proteasetyt stärker am MPA-Umsatz als im Fraktionspool beteiligt.

Wie in den Fraktionspools (4.5.1) war das SH-Reagens **Aldrithiol-2** unwirksam (siehe **Tabelle 22**), so dass keine Cysteinhydrolasen am Umsatz von Sagopilone, Drospirenon und MPA in Rattenserum beteiligt waren.

**TLCK** ergab eine ausreichende Wirksamkeit bezüglich der Stabilisierung des Sagopiloneumsatzes, während es für Drospirenon im Prinzip keinen Effekt hatte (siehe **Tabelle 22**). Dies bestätigt die Annahme aus dem Inhibitorscreening, dass CE, die für TLCK sensitiv ist, Sagopilone umsetzte und BChE, die nur reversibel mit TLCK reagiert, Drospirenon spaltete. Für MPA wurde leider keine Inkubation vorgenommen.

**TBA** zeigte eine hohe Wirksamkeit in Bezug auf die Stabilisierung von Sagopilone und Drospirenon, während es für MPA praktisch wirkungslos war (siehe **Tabelle 22**). Offensichtlich waren die für Sagopilone und Drospirenon spezifischen Esterasen (vermutlich CE bzw. BChE) empfindlicher gegenüber dem relativ hoch konzentrierten, wahrscheinlich grenzflächenaktiven TBA (100 mM) als die vermuteten Serinproteasen, die MPA spalteten. Anders als bei Esterasen wurde in der Literatur für Serinproteasen tatsächlich keine Inhibition durch Detergentien beschrieben [370].

**NaF** zeigte für Sagopilone, wie in den Fraktionspools, die größte inhibitorische Potenz, während es für Drospirenon und MPA schwächer wirksam war (siehe **Tabelle 22**). Dies unterstützt die Annahme, dass sich die Sagopilone-spaltenden Esterasen von den Drospirenon- und MPA-spaltenden Esterasen unterschieden.

PRASL soll im Folgenden gesondert betrachtet werden, da sich im Inhibitorscreening einige wesentliche Unterschiede zu den anderen drei Wirkstoffen ergaben. **BNPP** und **Pefabloc SC** zeigten praktisch keinen inhibitorischen Effekt, während eine ausgeprägte Stabilisierung für die drei anderen Wirkstoffe auftrat (siehe **Tabelle 22**). Daher war am PRASL-Umsatz in Rattenserum keine Serinhydrolase, sondern wahrscheinlich Rattenserum-PON1 beteiligt, da PON1 relativ resistent gegenüber der Inhibition durch organische Phosphorsäureester und Sulfonylfluoride ist [250,374].

PON-Isoenzyme weisen einen freien Cysteylrest auf, der keine katalytische, sondern eher eine enzymstabilisierende Funktion ausübt [17,250,374]. SH-Reagentien können an dieser Stelle angreifen, wie hier durch die relativ hohe Wirksamkeit von **Aldrithiol-2** demonstriert wurde (siehe **Tabelle 22**). Dies unterstützt die Annahme, dass PON1 an der PRASL-Spaltung in Rattenserum beteiligt war.

PON1 ist empfindlich gegenüber zahlreichen Metallionen [375,376]: So wurde z. B. für **Kupfer(II)-ionen** ( $\text{Cu}^{2+}$ ) eine Reaktion mit freien SH-Gruppen angenommen, die zu einer progressiven Konformationsänderung und Aktivitätsverlust führt [377]. **Zn<sup>2+</sup>** inhibieren PON1 stärker und schneller als  $\text{Cu}^{2+}$ , erhalten aber die Enzymkonformation, so dass PON1 mit  $\text{Ca}^{2+}$  reaktivierbar ist [88]. Im hiesigen Inhibitorscreening wurde bei PRASL eine hohe Wirksamkeit von  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  gefunden, die auf die Beteiligung von PON1 an der PRASL-Spaltung hindeutet (siehe **Tabelle 22**).

**EDTA** und **EGTA** sind Metallionen-chelatisierende Agentien, die PON1 durch Komplexierung der für die Struktur und Aktivität essentiellen  $\text{Ca}^{2+}$  im Prinzip irreversibel inhibieren [17,75,173,178,254,261,267,378]. Die sehr hohe Wirksamkeit von EDTA bzw. EGTA bestätigt die Beteiligung einer Metallohydrolase, d. h. hier wahrscheinlich PON1, an der Spaltung von PRASL in Rattenserum (siehe **Tabelle 22**).

**TAME** zeigte eine ausreichende Wirksamkeit für die Stabilisierung von PRASL in Rattenserum (siehe **Tabelle 22**). Es wurde in der Literatur nicht berichtet, ob PON1 mit TAME interagiert. Allerdings wurde beschrieben, dass Arylesterase (identisch mit PON [11]) einige basische Aminosäurederivate spaltet [91]. Vor dem Hintergrund des breiten Substratspektrums der PON-Isoenzyme [17,260,276] ist es demnach möglich, dass auch TAME ein PON-Substrat ist und in Gegenwart eines anderen PON-Substrats (wie z. B. PRASL) als kompetitiver Inhibitor wirken kann.

**TLCK** wies eine ausreichende Wirksamkeit für die Stabilisierung von PRASL auf (siehe **Tabelle 22**). Da PON mit basischen Aminosäurederivaten interagieren kann, ist eine Reaktion mit TLCK erklärbar: Durch Alkylierung der Histidylreste im aktiven Zentrum der PON [17] verliert diese vermutlich irreversibel ihre Aktivität, so wie es auch für Serinproteasen beschrieben wurde [286].

**TBA** kann wahrscheinlich in der hier verwendeten Konzentration von 100 mM Mizellen bilden. Daher ist es möglich, dass PON1 unter diesen Umständen bereits

teilweise denaturiert ist [249]. Somit scheint die sehr hohe Wirksamkeit von TBA für die PRASL-Stabilisierung erklärbar (siehe **Tabelle 22**).

**NaF** als unspezifischer Enzyminhibitor zeigte für die Hemmung des PRASL-Umsatzes in Rattenserum eine sehr hohe Wirksamkeit (siehe **Tabelle 22**). Einerseits kann das Fluoridion mit Histidylresten der PON1 interagiert haben [315].

Andererseits wurden wahrscheinlich durch die im Überschuss vorliegenden Fluoridionen (100 mM) praktisch die gesamten  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem unfraktionierten Rattenserum (ca. 4 mM [368]) ausgefällt. So kam es vermutlich zur im Prinzip irreversiblen Inaktivierung der PON1, die hier die hohe Wirksamkeit von NaF erklärt. Zusammenfassend aus dem Inhibitorscreening in Rattenserum kann festgestellt werden, dass zumindest jeweils eine Serinhydrolase am Abbau von Sagopilone, Drospirenon und MPA und eine Metallohydrolase (wahrscheinlich PON1) am Abbau von PRASL in Rattenserum wesentlich beteiligt waren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Inhibitorscreenings der isolierten Fraktionen (4.5.1) handelte es sich bei den abbauenden Serumesterasen für Sagopilone wahrscheinlich um CE, für Drospirenon um BChE sowie PON1 und für MPA um BChE sowie eine oder mehrere (mit BChE assoziierte oder gleichzeitig isolierte) Serinproteasen.

#### 4.5.3 Screening in unfraktioniertem Hundeserum

Im Inhibitorscreening von unfraktioniertem Hundeserum fiel für Drospirenon eine hohe Übereinstimmung der Inhibitoreffizienz verglichen mit der Inkubation von PRASL in Rattenserum auf (4.5.2).

So zeigten **EDTA** bzw. **EGTA** eine sehr hohe Wirksamkeit (siehe **Tabelle 23**). Dies lässt auf eine wesentliche Beteiligung einer Metallohydrolase, wahrscheinlich PON1, am Umsatz von Drospirenon in Hundeserum schließen. Zwar ist PON1 in Hundeserum, laut einem Literaturbericht, bisher nicht nachgewiesen worden [379], doch wurde ihre Existenz in dem hier durchgeführten Western Blot (3.4.2.2) bestätigt. Die hohe Wirksamkeit von **NaF** (siehe **Tabelle 23**) ist vermutlich auf eine Ausfällung von  $\text{Ca}^{2+}$  als Calciumfluorid aus dem Serum zurückzuführen.

Durch **TBA** kam es wahrscheinlich zur partiellen Denaturierung und damit Aktivitätsverlust von PON1, wobei dies in einer erheblichen Stabilisierung von Drospirenon in Hundeserum resultierte (siehe **Tabelle 23**).

Die hohe Wirksamkeit von  **$\text{Cu}^{2+}$**  bzw.  **$\text{Zn}^{2+}$**  bestärkt die Annahme, dass PON1 an der Spaltung von Drospirenon in Hundeserum beteiligt war (siehe **Tabelle 23**).

**TLCK** war bezogen auf die Inhibition des Drospirenonabbaus in Hundeserum ausreichend wirksam (siehe **Tabelle 23**). Dieses Ergebnis erlaubt nicht direkt die Zuordnung eines bestimmten Esterasetyps, da **TLCK** wahrscheinlich sowohl **PON1** als auch Serinhydrolasen inhibieren kann.

Die relativ hohe Wirksamkeit der Sulfonylfluoride **APMSF** und **Pefabloc SC** bezogen auf die Hemmung des Abbaus von Drospirenon in Hundeserum war aufgefallen, weil sie im Gegensatz zur fehlenden ausreichenden Wirksamkeit von **BNPP** stand (siehe **Tabelle 23**). **PON1** wird durch Sulfonylfluoride stärker inhibiert als durch Organophosphate [20], wie es hier auch zutrifft. Dadurch wird die Beteiligung von **PON1** am Drospirenonumsatz in Hundeserum unterstrichen.

Der Abbau von MPA wurde in Hundeserum durch **APMSF**, **Pefabloc SC** und **BNPP** in ausreichendem Maß verhindert (siehe **Tabelle 23**). Dies lässt auf eine erhebliche Beteiligung von Serinhydrolasen schließen.

Die hohe Wirksamkeit von **TLCK** (siehe **Tabelle 23**) wirft die Vermutung auf, dass hier eine Serinprotease für den MPA-Umsatz verantwortlich gewesen war. Bei der Auswertung der LC-ESI-MS-Ergebnisse (4.4.2.1) wurde jedoch angenommen, dass BChE (eher als eine Serinprotease) in einem Komplex mit dem identifizierten  $\alpha_2M$  die Spaltung von MPA in Hundeserum katalysierte. BChE verfügt über mindestens zwei funktionell verschiedene katalytische Zentren: Das ist zum einen das katalytische Zentrum der Esteraseaktivität zur Hydrolyse von zahlreichen Estern und zum anderen eine Region mit sog. Arylacylamidase-Aktivität zur Hydrolyse von Amididen (insbesondere *o*-Nitroacetanilid) [351,380]. Beide Zentren überlappen teilweise, sind aber nicht identisch [380], wie durch Untersuchungen mit bestimmten Inhibitoren und Aktivatoren gefunden wurde [86]. So inhibieren z. B. Serotonin und Tryptamin selektiv die Amidaseaktivität, aber nicht die Esteraseaktivität der BChE [114,381]. Im Gegenzug aktiviert Tyramin nur das Amidase- und nicht das Esterasezentrum [114,381]. Beide Funktionen werden durch ChE- bzw. Serinhydrolase-Inhibitoren inhibiert [114,381,382]. Monoklonale Anti-BChE-Antikörper präzipitieren die Esterase- und die Amidaseaktivität im gleichen Ausmaß, wobei dies auf die Koexistenz beider Funktionen auf *einem* Protein hinweist [380,381].

Wenn BChE an der MPA-Spaltung in Hundeserum beteiligt war, fand wahrscheinlich der Umsatz nicht im Zentrum der Esteraseaktivität der BChE, sondern im Zentrum der Amidaseaktivität statt. Bei einer Beteiligung der Esterasefunktion der BChE

sowie bei einer Beteiligung von CE müssten zumindest **NaF** und auch **TBA** deutlich stärker wirken, als hier gefunden wurde [87,320,383,384]. Außerdem wäre bei einer ausschließlichen Beteiligung des Zentrums der Esteraseaktivität der BChE nicht eine derart hohe Wirksamkeit durch TLCK zu erwarten, wie es hier festgestellt wurde, weil TLCK die Esteraseaktivität der BChE nur reversibel inhibiert [314].

Es wurde über eine Peptidaseaktivität der BChE in Bezug auf die Spaltung gewisser Neuropeptide (z. B. Leu-Enkephalin und Substanz P) berichtet [385], doch später gezeigt, dass mittels Immunpräzipitation nur die Esterase- (und Amidase-)Aktivität und nicht die Peptidaseaktivität einer BChE-Lösung beeinflusst wurde [351,386]. Die angeblich intrinsische Peptidaseaktivität kann wahrscheinlich auf eine Kontamination der BChE mit bestimmten Peptidasen aus der Isolierungsquelle oder durch die Methodik der Isolierung zurückgeführt werden [387,388].

Selbst wenn doch die Peptidaseaktivität genuin in der BChE liegen sollte, so müsste im hiesigen Inhibitorscreening für MPA eine wesentliche Inhibition durch **EDTA**, **EGTA** bzw. **Zn<sup>2+</sup>** festgestellt worden sein [299,300,385], was hier nicht der Fall war (siehe **Tabelle 23**). Weiterhin war die vermeintliche Peptidaseaktivität der BChE durch Organophosphate nicht hemmbar, sondern wurde sogar noch aktiviert [382,385], während der MPA-Abbau im hiesigen Inhibitorscreening durch BNPP ausreichend inhibiert wurde (siehe **Tabelle 23**). Demzufolge wurde MPA in Hundeserum wahrscheinlich durch die Amidasefunktion der BChE und nicht durch die Esterase- oder (vermutete) Peptidasefunktion gespalten. In Zusammenhang mit den Ergebnissen der Proteinidentifizierung (4.4.2.1) kommt auch eine (mit BChE assoziierte oder gleichzeitig isolierte) Serinprotease eher nicht in Betracht.

Für das Inhibitorscreening in Hundeserum kann zusammenfassend festgehalten werden, dass Drospirenon hauptsächlich durch PON1 abgebaut wurde. MPA wurde hingegen vermutlich durch die Amidasefunktion der BChE gespalten. Zwar ist MPA kein Amid, aber wegen der räumlichen Nähe zum Zentrum der Esteraseaktivität und des katalytisch aktiven Serylrestes können wahrscheinlich auch Ester durch die Amidasefunktion gespalten werden [389,390].

Betrachtet man die hier gefundenen Ergebnissen in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Wirkstoff-spezifischen Esterasen, dem Wirkstoffmolekül und der Inhibitorwirksamkeit, waren die Metallohydrolase-Inhibitoren EDTA und EGTA für Drospirenon und PRASL (d. h. Wirkstoffe mit kleinem Lactonring) effiziente

Inhibitoren des Abbaus sowohl in Ratten- als auch in Hundeserum, da hier die Metallohydrolase PON1 wesentlich beteiligt war. Dagegen wiesen die Serinhydrolase-Inhibitoren BNPP und Pefabloc SC für Sagopilone (d. h. einem Wirkstoff mit größerem Lactonring) bzw. MPA (d. h. einem Steroiddiester) eine hohe Wirksamkeit zur Stabilisierung in Ratten- bzw. Hundeserum auf, weil hauptsächlich verschiedene Serinhydrolasen zum Abbau dieser Wirkstoffe beigetragen haben.

Bezogen auf die Stabilisierung der vier Wirkstoffe in Ratten- und Hundeserum fasst die folgende **Tabelle 24** die geeigneten Inhibitoren mit ihren empfohlenen minimalen Konzentrationen zusammen.

**Tabelle 24:** Übersicht (alphabetisch und nach Wirksamkeit sortiert) über geeignete, individuell verwendete Inhibitoren mit ihren minimal empfohlenen Konzentrationen zur Stabilisierung der vier Wirkstoffe in Ratten- und Hundeserum (vgl. **Tabelle 22** und **Tabelle 23**). Durch *hochwirksame* Inhibitoren wurde eine >90 %ige Inhibition des Abbaus erreicht; für *weniger* wirksame Inhibitoren lag die Inhibition zwischen 50 und 90 %. Sagopilone und PRASL wurden in Hundeserum nicht abgebaut. Für MPA wurden keine hochwirksamen Inhibitoren in Hundeserum gefunden.

Matrix		Sagopilone	Drospirenon	MPA	PRASL
<b>Ratten- serum</b>	Hochwirksame Inhibitoren	BNPP 1 mM NaF 100 mM Pefabloc SC 1 mM TBA 100 mM	TBA 100 mM	BNPP 1 mM Pefabloc SC 1 mM	EDTA 20 mM EGTA 10 mM NaF 100 mM TBA 100 mM
	Weniger wirksame Inhibitoren	TLCK 10 mM	BNPP 1 mM EDTA 20 mM NaF 100 mM Pefabloc SC 1 mM	NaF 100 mM Zinksulfat 10 mM	Aldrithiol-2 0,1 mM Kupfer(II)-sulfat 1 mM TAME 10 mM TLCK 10 mM Zinksulfat 10 mM
<b>Hunde- serum</b>	Hochwirksame Inhibitoren	—	EDTA 20 mM EGTA 10 mM NaF 100 mM TBA 100 mM	—	—
	Weniger wirksame Inhibitoren		APMSF 10 mM Kupfer(II)-sulfat 1 mM Pefabloc SC 10 mM TLCK 10 mM Zinksulfat 1 mM	APMSF 10 mM BNPP 5 mM Pefabloc SC 10 mM TLCK 10 mM	

Für alle Wirkstoffe in den jeweiligen Matrices wurden Inhibitoren gefunden, die größtenteils bereits allein ausreichend wirksam waren (>90 % Inhibition; **Tabelle 24**). Ausgenommen hiervon war MPA in Hundeserum. In diesem Fall wäre eine Kombination aus den einzelnen wirksamen Inhibitoren (ggf. auch in höheren Konzentrationen) möglich, um die Esteraseaktivität weiter zu erniedrigen. Insbesondere sollten Inhibitoren kombiniert werden, die verschiedene Angriffspunkte an den Enzymen aufweisen (wie Serinhydrolase- [z. B. BNPP, Pefabloc SC] und Metallohydrolase-Inhibitoren [z. B. EDTA, EGTA]). Für MPA scheint dies nicht möglich zu sein, da EDTA selbst keine Wirksamkeit hatte. Versuchsweise kann dennoch eine Kombination von BNPP mit TLCK getestet werden, da TLCK zwar bevorzugt am katalytischen Zentrum angreift, aber auch an anderen Regionen des Enzyms, die über Histidylreste verfügen. Diese Modifizierung führt gleichfalls zu einer Konformationsänderung mit Aktivitätsverlust [314]. Auch für die anderen Wirkstoffe wären Kombinationen von Inhibitoren ein geeigneter Ansatzpunkt, um die restliche Esteraseaktivität zu minimieren. Hier kommt beispielsweise für Drospirenon in Rattenserum BNPP in Kombination mit EDTA in Betracht. Die Kombination verschiedener Inhibitoren erscheint insbesondere dann sinnvoll, wenn man die spezifischen Esterasen (und Proteasen), die für den Abbau des jeweiligen Wirkstoffs verantwortlich sind, nicht vorher in Erfahrung bringen oder deduktiv ableiten kann. Eine Kombination von Fluorid mit Oxalat wurde auch für die Stabilisierung von Oseltamivirphosphat in humanen Plasmaproben als günstig berichtet, nachdem der ebenso wirksame Serinhydrolase-Inhibitor Dichlorvos, ein Organophosphat, im Rahmen eines routinemäßigen Laboreinsatzes zu Sicherheitsbedenken führte [8,24]. Viele Organophosphate zeigen eine hohe Neurotoxizität für Tiere und Menschen [391-393], weshalb in der hiesigen Inhibitorauswahl auf eine gute Wasserlöslichkeit und geringe Toxizität solcher Substanzen (wie z. B. bei BNPP) geachtet wurde (2.6.1). Weitere wasserlösliche Phosphorsäureester, wie z. B. Natriumsalze des Phenylphosphats oder *p*-Nitrophenylphosphats (PON1-Inhibitoren [374]) sowie bestimmte Dialkyldithiophosphatsalze, sind im Handel erhältlich und können durchaus auf ihre Eignung als Esteraseinhibitoren in Bezug auf die vier Wirkstoffe untersucht werden. Sie können Vorteile in der Inhibitionspotenz, Wasserlöslichkeit oder auch eine höhere Stabilität in Lösung zeigen. Dementsprechend können andere Sulfonylfluoride, wie z. B. 3-Aminobenzensulfonylfluorid-Hydrochlorid, als Analoga zu Pefabloc SC und APMSF getestet werden. Auch zu den Chelatkomplexbildnern

EDTA und EGTA gibt es zahlreiche Alternativen, wie z. B. Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), die sich möglicherweise in ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -chelatisierenden Potenz im Sinne einer stärkeren Komplexierung unterscheidet. Für BChE wurde mit bestimmten Chelatkomplexbildnern (z. B. *N,N,N',N'*-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin) eine stärkere Inhibition durch Komplexierung des strukturelevanten  $\text{Zn}^{2+}$  als durch EDTA berichtet [300]. Allerdings ist auch hier bei der Auswahl auf eine gute Wasserlöslichkeit und geringe Toxizität zu achten, da z. B. der ebenfalls  $\text{Zn}^{2+}$ -selektive Chelatkomplexbildner *o*-Phenanthrolin genau diese beiden Voraussetzungen nicht mitbringt und daher nicht einsetzbar ist [65,300].

Ziel des Inhibitoreinsatzes im Rahmen präklinischer und klinischer Studien sollte es sein, dass der Inhibitor oder das Inhibitorgemisch möglichst bereits bei der Blutentnahme aus dem Tier oder Menschen in gelöster oder löslicher Form in der Monovette vorliegt. Wasserlöslichkeit spielt daher eine entscheidende Rolle in der Auswahl geeigneter Inhibitoren für den Einsatz in Serum oder Plasma bzw. Blut. Einige kommerziell angebotene Gemische von Protease- und Esteraseinhibitoren sind in organischen Lösungsmitteln in konzentrierter Form gelöst oder müssen vor der Anwendung darin gelöst werden. Dann wird diese Inhibitorlösung zu der Matrix, in der sich die zu stabilisierende Substanz befindet, gegeben [394,395]. Es wurde berichtet und in eigens durchgeführten Untersuchungen beobachtet (Daten nicht gezeigt), dass bei der direkten Verwendung von organischen Lösungsmitteln (z. B. Alkohole oder Dimethylsulfoxid [DMSO]) in Blut Hämolyse auftreten kann, selbst wenn die Endkonzentration des Lösungsmittels gering ist (z. B. 1,5 % [V/V] DMSO in Katzenblut) [396,397]. Daher ist auf jegliche organische Lösungsmittel in Bezug auf die Lösung von Inhibitoren in Blut absolut zu verzichten. Mehrere sog. Proteaseinhibitor-Cocktails sind als Lyophilisate oder in Tablettenform kommerziell erhältlich [398-401], wobei diese vor der Anwendung in wässrigen (Puffer-) Lösungen aufbereitet werden müssen. In Zusammenhang mit der direkten Zugabe des Inhibitorgemisches als Lyophilisat oder Tablette zu Blut kann die Lösungsgeschwindigkeit der einzelnen Inhibitoren in Blut entscheidend für die Stabilisierung von Ester-Wirkstoffen sein. Eine bereits vorliegende wässrige (gepufferte) Lösung hat hier in Bezug auf die Zeit bis zum Erreichen einer maximalen Inhibition eindeutige Vorteile. Die im Handel erhältlichen Inhibitorcocktails enthalten häufig Substanzen, die für eine Inhibition von für Wirkstoffe spezifische Serumesterasen nicht von Bedeutung sind, wie z. B. Aspartathydrolase-Inhibitoren

(Pepstatin A) [267], spezifische Cysteinhydrolase-Inhibitoren (E-64) [267] und Aminopeptidase-Inhibitoren (Bestatin) [296]. Daneben werden auch Inhibitoren eingesetzt, deren Stabilität in wässrigen Lösungen relativ gering ist, wie z. B. bei den Peptidaldehyden (Leupeptin usw.) [65,267]. Im Sinne einer praktikablen, überschaubaren Handhabung ohne Stabilitätsprobleme des Inhibitorgemisches in fester oder gelöster Form sollte sich der Einsatz von Inhibitoren auf einzelne, ausgesuchte Substanzen beschränken (vgl. **Tabelle 24**), die zur Erweiterung des Inhibitionsspektrums in geeigneter Weise kombiniert werden können (z. B. APMSF oder Pefabloc SC mit EDTA).

# **AUSBLICK**

## 5. Ausblick

Basierend auf den vorgestellten Ergebnissen soll im Folgenden ein Ausblick und Anreiz für weitergehende Untersuchungen gegeben werden.

In Rattenserum wurde CE als Esterase mit wesentlicher Beteiligung an der Sagopilonespaltung identifiziert (4.5.2). Dies wurde hauptsächlich mit der Anwesenheit von Ratten-CE in den für Sagopilone aktiven Fraktionen aus Rattenserum und der hohen Wirksamkeit von Serinhydrolase- (und CE-)Inhibitoren begründet. Allerdings enthielten die untersuchten Fraktionen noch eine relativ große Zahl anderer Proteine, so dass die direkte Zuordnung der identifizierten CE als Sagopilone-abbauende Esterase erschwert wird. Das Wissen um die tatsächliche Beteiligung *und* die Identität der spezifischen Esterasen kann aber die Suche nach einem potenten, spezifischen Inhibitor (auch bezogen auf die anderen untersuchten Wirkstoffe) vereinfachen.

Um die hier gefundenen Indizien (aus der Proteinidentifizierung und dem Inhibitorscreening) für eine tatsächliche Beteiligung der Rattenserum-CE am Sagopiloneabbau zu untermauern, kann eine spezifische Affinitätschromatografie mit Hilfe von geeigneten monoklonalen Anti-CE-Antikörpern durchgeführt werden [116,402]. Die CE bindet an die Matrix, kann dann eluiert und auf ihre Esteraseaktivität hinsichtlich Sagopilone untersucht werden. Sollte der relativ hohe Albumingehalt des Serums stören, kann eine Affinitätschromatografie an der auch hier eingesetzten Cibacron-Blue-F3G-A-Matrix (2.4.3) [154,403] oder an anderen Matrizes zur Reduktion abundanter Serumproteine vor der Immunoaffinitätschromatografie ausgeführt werden [404,405]. Alternativ zur Immunoaffinitätschromatografie kann eine Immunopräzipitation der Serum-CE mittels geeigneter monoklonaler Antikörper durchgeführt werden [380,386,406]. Die präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplexe können dann an Protein-A-Sepharose oder Protein-G-Sepharose (in Abhängigkeit von der Spezies, aus der der Antikörper gewonnen wurde, und von der Unterklasse des Antikörpers) gebunden und durch pH-Wert-Erniedrigung eluiert werden [407,408]. Dabei werden auch die Antigen-Antikörper-Komplexe gespalten und das Enzym (Antigen) z. T. wieder in aktiver Form rekonstituiert [386]. Das auf diese Weise wiedergewonnene Enzym kann auf seine Esteraseaktivität für Sagopilone untersucht werden.

Auch die Beteiligung von BChE und PON1 am Abbau von Drospirenon in Ratten- und Hundeserum, von BChE am MPA-Abbau sowie von PON1 am PRASL-Abbau in Rattenserum ist in den hier durchgeführten Untersuchungen auf die Ergebnisse des Western Blots und des Inhibitorscreening zurückgeführt worden. Wie bei Sagopilone können weitergehende Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern diese Indizien stützen.

Dass Serinproteasen neben BChE MPA in Rattenserum abbauen, wurde hier durch das Inhibitorscreening abgeleitet. Die tatsächliche Beteiligung von Serinproteasen kann durch eine Isolierung mittels Inhibitoraffinitätschromatografie [402] an einer *p*-Aminobenzamidin-gekoppelten Sepharosematrix [387,388,407,409] oder anderen Inhibitor-gekoppelten Matrices gezeigt werden [340,341]. Serinproteasen binden an diese Matrix und werden durch pH-Wert-Änderung oder kompetitiv durch den Inhibitor selbst eluiert [409]. Vorgeschaltet werden kann bei Bedarf eine Chromatografie, wie oben beschrieben, zur Abtrennung abundanter Serumproteine. Die eluierten Serinproteasen können dann auf ihre Esteraseaktivität hinsichtlich der MPA-Spaltung untersucht werden.

Durch das Inhibitorscreening wurde hier die Identität der Serinprotease(n) nicht weiter bestimmt. Zur eindeutigen Identifizierung müssten möglichst hochspezifische Inhibitoren mit Positivkontrollen verwendet werden, weil die hier eingesetzten Inhibitoren doch relativ unspezifisch (innerhalb der Gruppe der Serinproteasen) reagieren. Ein anderer Ansatz zur Proteinidentifizierung ist die Untersuchung der durch Affinitätschromatografie isolierten, aktiven Serinprotease-Fractionen aus Rattenserum (s. o.) mittels einer zweidimensionalen PAGE (2D-PAGE) [410] und anschließendem tryptischen Verdau und MALDI-TOF-MS oder LC-ESI-MS (vgl. 2.5) [175]. Wurde bei der Affinitätschromatografie eine hochgereinigte, aktive Fraktion einer Serinprotease erhalten, kann alternativ diese Protease mittels *N*-terminaler Aminosäuresequenzanalyse (z. B. Edman-Abbau) identifiziert werden [173,357,380,387].

In den hier gefundenen Ergebnissen aus der Proteinidentifizierung und dem Inhibitorscreening wurde die Amidasefunktion der BChE für den MPA-Abbau in Hundeserum verantwortlich gemacht. Ein gezielter Nachweis für die Beteiligung der Amidasefunktion (und nicht der Esterasefunktion) der BChE kann mittels geeigneter Inhibitoren und Aktivatoren geführt werden (siehe 4.5.3). Allerdings beziehen sich die dortigen Angaben auf die humane BChE. Beim Hund könnten sich die Verhältnisse

ggf. ändern. Davon ist aber auf Grund der qualitativ und quantitativ ähnlichen Ausstattung der Serumesterasen in Hund und Mensch nicht auszugehen (vgl. 4.2.2). Für die Ratte wurden hingegen deutliche Unterschiede in der Reaktion auf bestimmte Modulatoren in Bezug auf die Serumamidaseaktivität verglichen mit dem Menschen konstatiert [114].

Um die Wirksamkeit der Inhibitoren, ausgehend vom hier untersuchten Rattenserum, auch für andere Matrices zu zeigen, kann als nächster experimenteller Schritt die Eignung der hier gefundenen sowie weiterer vorgeschlagener Inhibitoren (4.5.3) in fester oder gelöster Form in Monovetten im Rahmen von *in-vitro*-Versuchen mit wirkstoffhaltigem Tier- und insbesondere Humanblut durchgeführt werden. Mit Hilfe dieser Untersuchungen können Empfehlungen für die Auswahl, Darreichungsform, Konzentration und Lagerungsbedingungen der Inhibitoren in den Monovetten in Hinblick auf die *ex-vivo*-Stabilisierung wirkstoffhaltiger Blutproben in präklinischen und klinischen Prüfungen gegeben werden. Erste Vorschläge dazu liefern **Tabelle 24** zur Auswahl und Konzentration von Inhibitoren und **Tabelle 4** (S. 35) zur Stabilität und Löslichkeit.

Auch andere, hier nicht untersuchte, strukturverwandte und strukturell differierende Wirkstoffe kommen für *in-vitro*-Versuche mit Blut in Betracht, um die Eignung der Inhibitoren für eine größere Anzahl von Wirkstoffen zu zeigen und (potentiell) effiziente Inhibitoren für die Stabilisierung neu entwickelter Ester-Wirkstoffe bereitzustellen. Ausgehend von den hier gefundenen Ergebnissen, sind Metallohydrolase-Inhibitoren für verschiedene Wirkstoffe mit kleinem Lactonring (wie bei Drospirenon und PRASL) und Serinhydrolase-Inhibitoren für Wirkstoffe mit größerem Lactonring (wie bei Sagopilone) oder für Steroidester (wie MPA) aussichtsreiche Inhibitor Kandidaten. Daneben sollte auch die unspezifischen Inhibitoren (wie z. B. NaF, Zn<sup>2+</sup>, TBA) in diesem Zusammenhang getestet werden.

**ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY**

## 6. Zusammenfassung / Summary

### 6.1 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Stabilisierung von vier strukturell unterschiedlichen Ester-Wirkstoffen (Sagopilone, Drospirenon, Methylprednisolonaceponat [MPA] und Progesteron-Rezeptor-A-selektiver Ligand [PRASL]) in *in-vitro*-Serumproben von Ratten und Hunden. Dazu wurden die spezifischen Esterasen aus dem Serum von Ratten bzw. Hunden isoliert und identifiziert sowie potente Enzyminhibitoren zur Stabilitätserhöhung gefunden.

- 1) In Voruntersuchungen wurden die **Esteraseaktivitäten von Ratten- und Hundeserum** verglichen. Dazu wurde Serum beider Spezies mit dem Cholinesterase- (ChE-)Substrat S-Acetylthio[*N-methyl*-<sup>14</sup>C]choliniodid (<sup>14</sup>C-ATC-Iodid), dem unspezifischen Esterasesubstrat *p*-Nitro[*U*-ring-<sup>14</sup>C]phenylacetat (<sup>14</sup>C-NPA) sowie dem Carboxylesterase- (CE-)Substrat Methyloctanoat (MeOct) inkubiert. Die ChE-Aktivität war bei den beiden Spezies vergleichbar. Dagegen wies Rattenserum eine höhere CE-Aktivität (in Bezug auf die <sup>14</sup>C-NPA- und MeOct-Spaltung) als Hundeserum auf. Auch in Bezug auf die vier untersuchten Wirkstoffe zeigte Rattenserum eine höhere Esteraseaktivität als Hundeserum.
- 2) Bei einer vergleichenden Untersuchung der Esteraseaktivität von **frisch gewonnenem** und von für 14 Tage bei -20°C **tiefgefrorenem** und dann aufgetautem **Rattenserum** wurde in Bezug auf die Spaltung von Sagopilone und Drospirenon eine höhere Aktivität in Frischserum und für PRASL kein Unterschied gefunden. Die Abnahme der Aktivität der Sagopilone- und Drospirenon-abbauenden Esterasen wurde durch *cold denaturation* erklärt. Für MPA war die Aktivität in tiefgefrorenem Serum größer als in Frischserum, da wahrscheinlich Esterasen aus in Serum vorliegenden Thrombocyten durch den Einfrier-Auftau-Zyklus freigesetzt wurden. Quantitativ betrachtet lag der relative Unterschied der Esteraseaktivität zwischen Frischserum und tiefgefrorenem Serum größtenteils unter 10 %. Qualitativ wurde kein Unterschied der Abbauprodukte festgestellt.
- 3) Für die **Isolierung** der Sagopilone-, Drospirenon- und MPA-spaltenden Esterasen wurde eine dreistufige, sequenzielle Proteinreinigung (Ionenaustauschchromatografie, Größenausschlusschromatografie und

Affinitätschromatografie [zur Abtrennung von Albumin]) von **Rattenserum** mit Erfolg ausgeführt. Dies deutete (laut Literaturberichten) auf die Anwesenheit von CE und/oder BChE in den aktiven Fraktionen hin. Für PRASL wurden mittels einer Affinitätschromatografie zur Isolierung Paraoxonase- (PON-)haltiger Fraktionen (PON-AC) die spaltenden Esterasen (wahrscheinlich PON1) in hoher Ausbeute aus Rattenserum isoliert. Die Drospirenon-spaltenden Esterasen in **Hundeserum** wurden mittels PON-AC gereinigt, allerdings nur mit geringer Ausbeute und Anreicherung. Die dreistufige Reinigung war für die Isolierung MPA-abbauender Esterasen aus Hundeserum erfolgreich. Daneben lieferte auch die PON-AC Fraktionen mit MPA-spaltender Aktivität aus Hundeserum.

- 4) Die **K<sub>m</sub>- und V<sub>max</sub>-Werte** des Umsatzes der vier Wirkstoffe durch die gereinigten Fraktionen aus **Rattenserum** (bezogen auf Sagopilone, Drospirenon und MPA) bzw. durch unfraktioniertes Rattenserum (bezogen auf PRASL) lagen im Bereich von anderen bekannten Substraten der Serumesterasen CE, Butyrylcholinesterase (BChE) bzw. PON1.
- 5) Durch **Proteinidentifizierung** mittels *matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) der gereinigten, Sagopilone-spaltenden Fraktionen aus **Rattenserum** wurde CE 1 gefunden, deren Beteiligung am Abbau sowohl von Sagopilone als auch von Drospirenon und MPA postuliert wurde. In den PRASL-spaltenden Fraktionen der PON-AC von Rattenserum wurden einerseits mittels Western Blot PON1 und andererseits mittels MALDI-TOF-MS Apolipoprotein A-I (Apo A-I) nachgewiesen, wobei die Identifizierung von Apo A-I indirekt auf die Präsenz von PON1 hindeutete. In den für MPA aktiven Fraktionen aus **Hundeserum** wurde mit Hilfe von *liquid chromatography – electrospray ionization – mass spectrometry* (LC-ESI-MS)  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ M) identifiziert, das wahrscheinlich einen Komplex mit Serinproteasen oder BChE bildete, der Esteraseaktivität aufwies. PON1 wurde in bestimmten PON-AC-Fraktionen aus Hundeserum mittels Western Blot nachgewiesen.
- 6) Ein **Inhibitorscreening** wurde mittels ausgesuchter Esterase- und Proteaseinhibitoren durchgeführt. In den isolierten Fraktionen aus **Rattenserum** sowie in unfraktioniertem Rattenserum wurde konstatiert, dass für den Abbau von Sagopilone wahrscheinlich CE, für den von Drospirenon

BChE sowie PON1 und für den von MPA BChE sowie (assoziierte oder gleichzeitig isolierte) Serinproteasen vorwiegend beteiligt waren. Vor allem PON1 war vermutlich für die PRASL-Spaltung in Rattenserum verantwortlich. In **Hundeserum** wurde der Drospirenonabbau hauptsächlich PON1 und der MPA-Abbau der Amidasefunktion der BChE zugeschrieben. Somit bestätigte das Inhibitorscreening die ersten Annahmen aus der Proteinisolierung und -identifizierung.

Es wurden Empfehlungen für die Auswahl und Konzentration von Inhibitoren bezogen auf die Stabilisierung der vier Wirkstoffe in Ratten- und Hundeserum gegeben (vgl. **Tabelle 24**, Seite 144). Diese können in weiterführenden *in-vitro*-Stabilitätsuntersuchungen chemisch verwandter und nicht verwandter Ester-Wirkstoffe in Tier- und Humanblut genutzt werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen, potente Inhibitoren zur Erhöhung der Stabilität von neu entwickelten Ester-Wirkstoffen in *ex-vivo*-Blutproben im Rahmen der präklinischen und klinischen Arzneimittelentwicklung frühstmöglich zur Verfügung zu stellen.

## 6.2 Summary

The aim of the present study was the stabilization of four structurally different drug ester compounds (sagopilone, drospirenone, methylprednisolone aceponate [MPA], and progesterone-receptor-A-selective ligand [PRASL]) in rat and dog serum samples *in vitro*. To this end, the specific esterases were isolated from rat and canine serum and subsequently identified. Furthermore, potent inhibitors of these enzymes were found.

- 1) In initial experiments, the **esterase activities of rat and dog serum** were compared. Rat or dog serum was incubated with the cholinesterase (ChE) substrate *S*-acetylthio[*N*-methyl-<sup>14</sup>C]choline iodide (<sup>14</sup>C-ATC-Iodid), the non-specific esterase substrate *p*-nitro[*U*-ring-<sup>14</sup>C]phenyl acetate (<sup>14</sup>C-NPA) and the carboxylesterase (CE) substrate methyl caprylate (MeOct). The ChE activity was similar in both matrices. However, the CE activity was higher in rat serum (referring to the cleavage of <sup>14</sup>C-NPA and MeOct) than in canine serum. Moreover, the esterase activity of dog serum with regard to the four drug compounds was lower than that of rat serum.
- 2) A comparative study of the esterase activity of **rat serum**, which was **freshly prepared** or **deep-frozen** (i. e. serum was stored at -20°C for 14 days and thawed prior to use), resulted in a higher activity of freshly prepared serum

regarding the sagopilone and drospirenone cleavage whereas no difference was found for PRASL. The activity of the sagopilone- and drospirenone-cleaving esterases decreased due to cold denaturation. As to MPA, the activity of the deep-frozen serum was higher than that of freshly prepared serum. This was explained by a release of esterases from platelets due to one freeze-thaw cycle. From a quantitative point of view, the relative difference between freshly prepared and deep-frozen serum amounted, in most cases, to less than 10%. The degradation products of the parent compounds were identical in both freshly prepared and deep-frozen serum.

- 3) A three-step purification protocol (including ion-exchange chromatography, size-exclusion chromatography, and affinity chromatography [for removal of albumin]) was successfully used for the **isolation** of the sagopilone-, drospirenone- and MPA-hydrolyzing esterases from **rat serum**. In accordance with some literature reports, the presence of CE and/or BChE within the active fractions was suggested. The PRASL-cleaving esterases (presumably paraxonase 1 [PON1]) were isolated from rat serum in high yield by means of an affinity chromatography used for the isolation of PON-containing fractions (PON-AC). The esterases hydrolyzing drospirenone in **dog serum** were purified by PON-AC, although exhibiting a low activity yield and purification factor. The three-step purification procedure employed on the isolation of MPA-cleaving esterases from canine serum proved to be successful. Besides, MPA-hydrolyzing fractions were obtained by PON-AC.
- 4) The found  **$K_m$  and  $V_{max}$  values**, resulting from the cleavage of the four drugs by the purified fractions from **rat serum** (referring to sagopilone, drospirenone, and MPA) as well as by the non-fractionated rat serum (referring to PRASL), were in the range of other well-known substrates of the serum esterases CE, butyrylcholinesterase (BChE), and PON1.
- 5) With the help of matrix-assisted laser desorption – time of flight – mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for **protein identification**, CE 1 was found in the purified, sagopilone-cleaving fractions from **rat serum**. The involvement of this esterase in the cleavage of sagopilone as well as of drospirenone and MPA was postulated. In the PRASL-degrading fractions of the PON-AC from rat serum, PON1 was found by Western blot while apolipoprotein A-I (Apo A-I) was identified by MALDI-TOF-MS. The identification of Apo A-I indirectly

demonstrated the presence of PON1 in these fractions. By liquid chromatography – electrospray ionization – mass spectrometry (LC-ESI-MS),  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ M) was identified in the MPA-cleaving fractions from **dog serum**, thereby assuming the formation of an esteratically active complex of  $\alpha_2$ M with serine proteases or BChE. PON1 was found by Western blot in certain fractions of PON-AC from canine serum.

- 6) A procedure of **screening inhibitors** was accomplished with the help of a set of selected esterase and protease inhibitors. By using isolated fractions from **rat serum** as well as non-fractionated rat serum, CE was assumed to be mainly responsible for the cleavage of sagopilone. It was suggested that drospirenone was primarily cleaved by BChE and PON1 whereas MPA was principally hydrolyzed by BChE and (associated or co-eluting) serine proteases. It appeared that PON1 mainly cleaved PRASL in rat serum. The degradation of drospirenone in **dog serum** was chiefly ascribed to the activity of PON1 while the MPA cleavage was probably due to the amidase activity of BChE. Thus, the results of the screening confirmed the first suggestions from the protein isolation and identification.

Recommendations regarding the choice and concentration of inhibitors for the stabilization of the four drug compounds in rat and dog serum were given (ref. **Tabelle 24**, p. 144). These are useful for further *in vitro* stability studies using chemically related and unrelated drug esters in animal and human blood. In terms of early nonclinical and clinical drug development, the gained experience enables to deliver potent inhibitors for increasing the stability of newly developed drug ester compounds in blood samples *ex vivo*.

# LITERATURVERZEICHNIS

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*, o. O., 2001
- [2] Du, L.; Musson, D.G.; Wang, A.Q.: *Stability studies of vorinostat and its two metabolites in human plasma, serum and urine*, J. Pharm. Biomed. Anal. (2006): **42**, 556-564
- [3] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products: *Guidelines for the Conduct of Pharmacokinetic Studies in Target Animal Species*, **EMEA/CVMP/133/99**, London 2000
- [4] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: *Pharmacokinetic Studies in Man*, Guideline **3CC3a**, o. O., 1987, Internet: <http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/efficacy.htm> (Stand: 06.11.2008)
- [5] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: *Conduct of Pharmacokinetic Studies in Animals*, Guideline **7AE3a**, o. O., 1992, Internet: [http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol7\\_en.htm#7a](http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol7_en.htm#7a) (Stand: 06.11.2008)
- [6] Tokumura, T.; Muraoka, A.; Masutomi, T.; Machida, Y.: *Stability of spironolactone in rat plasma: Strict temperature control of blood and plasma samples is required in rat pharmacokinetic studies*, Biol. Pharm. Bull. (2005): **28**, 1126-1128
- [7] Zeng, J.; Onthank, D.; Crane, P.; Unger, S.; Zheng, N.; Pasas-Farmer, S.; Arnold, M.: *Simultaneous determination of a selective adenosine 2A agonist, BMS-068645, and its acid metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry – Evaluation of the esterase inhibitor, diisopropyl fluorophosphate, in the stabilization of a labile ester-containing drug*, J. Chromatogr. B (2007): **852**, 77-84
- [8] Lindegardh, N.; Davies, G.R.; Hien, T.T.; Farrar, J.; Singhasivanon, P.; Day, N.P.J.; White, N.J.: *Rapid degradation of oseltamivir phosphate in clinical samples by plasma esterases*, Antimicrob. Agents Chemother. (2006): **50**, 3197-3199
- [9] Okuyama, Y.; Momota, K.; Morino, A.: *Pharmacokinetics of prulifloxacin. 1<sup>st</sup> communication: Absorption, distribution and excretion in rats, dogs and monkeys after a single administration*, Drug Res. (1997): **47**, 276-284
- [10] Quon, C.Y.; Mai, K.; Patil, G.; Stampfli, H.F.: *Species differences in the stereoselective hydrolysis of esmolol by blood esterases*, Drug Metab. Dispos. (1988): **16**, 425-428
- [11] Li, B.; Sedlacek, M.; Manoharan, I.; Boopathy, R.; Duysen, E.G.; Masson, P.; Lockridge, O.: *Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma*, Biochem. Pharmacol. (2005): **70**, 1673-1684
- [12] Williams, F.M.: *Serum enzymes of drug metabolism*, Pharmacol. Ther. (1987): **34**, 99-109
- [13] Testa, B.; Mayer, J.M.: *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism. Chemistry, Biochemistry, and Enzymology*, Verlag Helvetica Chemica Acta, Zürich 2003
- [14] Testa, B.; Krämer, S.D.: *The biochemistry of drug metabolism – An introduction. Part 3. Reactions of hydrolysis and their enzymes*, Chem. Biodiversity (2007): **4**, 2031-2122
- [15] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB): siehe <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme> für die jeweils aktuelle Version
- [16] Guengerich, F.P.: *Oxidative, reductive, and hydrolytic metabolism of drugs*, in: *Drug Metabolism in Drug Design and Development. Basic Concepts and Practice* (D. Zhang, M. Zhu, W.G. Humphreys; eds.), John Wiley & Sons, Hoboken 2008
- [17] Harel, M.; Aharoni, A.; Gaidukov, L.; Brumshtein, B.; Khersonsky, O.; Meged, R.; Dvir, H.; Ravelli, R.B.G.; McCarthy, A.; Toker, L.; Silman, I.; Sussman, J.L.; Tawfik, D.S.: *Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes*, Nat. Struct. Mol. Biol. (2004): **11**, 412-419
- [18] Boeck, A.T.; Schopfer, L.M.; Lockridge, O.: *DNA sequence of butyrylcholinesterase from the rat: Expression of the protein and characterization of the properties of rat butyrylcholinesterase*, Biochem. Pharmacol. (2002): **63**, 2101-2110
- [19] Liederer, B.M.; Borchardt, R.T.: *Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs*, J. Pharm. Sci. (2006): **95**, 1177-1195
- [20] Yamaori, S.; Fujiyama, N.; Kushihara, M.; Funahashi, T.; Kimura, T.; Yamamoto, I.; Sone, T.; Isobe, M.; Ohshima, T.; Matsumura, K.; Oda, M.; Watanabe, K.: *Involvement of human blood arylesterases and liver microsomal carboxylesterases in nafamostat hydrolysis*, Drug Metab. Pharmacokinet. (2006): **21**, 147-155
- [21] Costello, P.B.; Caruana, J.A.; Green, F.A.: *The relative roles of hydrolases of the erythrocyte and other tissues in controlling aspirin survival in vivo*, Arthritis and Rheumatism (1984): **27**, 422-426

- [22] Minagawa, T.; Kohno, Y.; Suwa, T.; Tsuji, A.: *Species differences in hydrolysis of isocarbacyclin methyl ester (TEI-9090) by blood esterases*, *Biochem. Pharmacol.* (1995): **49**, 1361-1365
- [23] Al-Habet, S.M.H.; Lee, H.J.: *In vitro hydrolysis of steroid acid ester derivatives of prednisolone in plasma of different species*, *J. Pharm. Sci.* (1990): **79**, 916-918
- [24] Lindegardh, N.; Davies, G.R.; Hien, T.T.; Farrar, J.; Singhasivanon, P.; Day, N.P.J.; White, N.J.: *Importance of collection tube during clinical studies of oseltamivir*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2007): **51**, 1835-1836
- [25] Klar, U.; Buchmann, B.; Schwede, W.; Skuballa, W.; Hoffmann, J.; Lichtner, R.B.: *Total synthesis and antitumor activity of ZK-EPO: The first fully synthetic epothilone in clinical development*, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2006): **45**, 7942-7948
- [26] Altmann, K.-H.; Wartmann, M.; O'Reilly, T.: *Epothilones and related structures – a new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity*, *Biochim. Biophys. Acta* (2000): **1470**, M79-M91
- [27] Altmann, K.-H.: *Recent developments in the chemical biology of epothilones*, *Curr. Pharm. Des.* (2005): **11**, 1595-1613
- [28] Buey, R.M.; Diaz, J.F.; Andreu, J.M.; O'Brate, A.; Giannakakou, P.; Nicolaou, K.C.; Sasmal, P.K.; Ritzen, A.; Namato, K.: *Interaction of epothilone analogs with the paclitaxel binding site: Relationship between binding affinity, microtubule stabilization, and cytotoxicity*, *Chem. Biol.* (2004): **11**, 225-236
- [29] Goodin, S.; Kane, M.P.; Rubin, E.H.: *Epothilones: Mechanism of action and biologic activity*, *J. Clin. Oncol.* (2004): **22**, 2015-2025
- [30] Mizutani, T.; Masuda, M.; Nakai, E.; Furumiya, K.; Togawa, H.; Nakamura, Y.; Kawai, Y.; Nakahira, K.; Shinkai, S.; Takahashi, K.: *Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1)*, *Curr. Drug Metab.* (2008): **9**, 167-174
- [31] Guo, W.-J.; Tao, G.-J.; Tao, W.-T.; Cui, F.-J.; Jin, X.-C.; Bi, F.; Xu, Z.-H.; Ao, Z.-H.: *A myxobacterium strain sorangium cellulosum AHB125 producing epothilone B and other anticancer substances*, *Nat. Product Res.* (2007): **21**, 1256-1265
- [32] Altmann, K.-H.: *Epothilone B and its analogs – a new family of anticancer agents*, *Mini-Rev. Med. Chem.* (2003): **3**, 149-158
- [33] Chou, T.-C.; O'Connor, O.A.; Tong, W.P.; Guan, Y.; Zhang, Z.-G.; Stachel, S.J.; Lee, C.; Danishefsky, S.J.: *The synthesis, discovery, and development of a highly promising class of microtubule stabilization agents: Curative effects of desoxyepothilones B and F against human tumor xenografts in nude mice*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2001): **98**, 8113-8118
- [34] Bold, G.; Wojeik, S.; Caravatti, G.; Lindauer, R.; Stierlin, C.; Gertsch, J.; Wartmann, M.; Altmann, K.-H.: *Structure-activity relationships in side-chain-modified epothilone analogues – How important is the position of the nitrogen atom?*, *ChemMedChem* (2006): **1**, 37-40
- [35] Kamath, A.V.; Chang, M.; Lee, F.Y.; Zhang, Y.; Marathe, P.H.: *Preclinical pharmacokinetics and oral bioavailability of BMS-310705, a novel epothilone B analog*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2005): **56**, 145-153
- [36] Nicolaou, K.C.; Pratt, B.A.; Arseniyadis, S.; Wartmann, M.; O'Brate, A.; Giannakakou, P.: *Molecular design and chemical synthesis of a highly potent epothilone*, *ChemMedChem* (2006): **1**, 41-44
- [37] N.N.: *International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN)*, List 57, WHO Drug Information (2007): **21**, 53-83
- [38] Sitruk-Ware, R.: *Pharmacological profile of progestins*, *Maturitas* (2004): **47**, 277-283
- [39] Sitruk-Ware, R.: *Pharmacology of different progestogens: The special case of drospirenone*, *Climacteric* (2005): **8 (Suppl. 3)**, 4-12
- [40] Schindler, A.E.; Campagnoli, C.; Druckmann, R.; Huber, J.; Pasqualini, J.R.; Schweppe, K.W.; Thijssen, J.H.H.: *Classification and pharmacology of progestins*, *Maturitas* (2003): **46S1**, S7-S16
- [41] Krattenmacher, R.: *Drospirenone: Pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen*, *Contraception* (2000): **62**, 29-38
- [42] Oelkers, W.: *Drospirenone, a progestogen with antiminerlocorticoid properties: A short review*, *Mol. Cell. Endocrinol.* (2004): **217**, 255-261
- [43] Madauss, K.P.; Stewart, E.L.; Williams, S.P.: *The evolution of progesterone receptor ligands*, *Med. Res. Rev.* (2007): **27**, 374-400
- [44] Ruzicka, T.: *Methylprednisolone aceponate in eczema and other inflammatory skin disorders – A clinical update*, *Int. J. Clin. Pract.* (2006): **60**, 85-92
- [45] Arbeitsgemeinschaften der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF): *Neurodermitis, Leitlinie 013/027*, o. O., 2008
- [46] Günther, C.; Kecskes, A.; Staks, T.; Täuber, U.: *Percutaneous absorption of methylprednisolone aceponate following topical application of Advantan® lotion on intact, inflamed and stripped skin of male volunteers*, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* (1998): **11**, 35-42

- [47] Brazzini, B.; Pimpinelli, N.: *New and established topical corticosteroids in dermatology. Clinical pharmacology and therapeutic use*, Am. J. Clin. Dermatol. (2002): **3**, 47-58
- [48] Arbeitsgemeinschaften der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF): *Topische Dermatotherapie mit Glukokortikoiden – Therapeutischer Index*, Leitlinie **013/034**, o. O., 2005
- [49] Buijsman, R.C.; Hermkens., P.H.H.; Van Rijin, R.D.; Stock, T.; Teerhuis, N.M.: *Non-steroidal steroid receptor modulators*, Curr. Med. Chem. (2005): **12**, 1017-1075
- [50] Winneker, R.C.; Fensome, A.; Wrobel, J.E.; Zhang, Z.; Zhang, P.: *Nonsteroidal progesterone receptor modulators: Structure activity relationships*, Semin. Reprod. Med. (2005): **23**, 46-57
- [51] Lehmann, M.; Schöllkopf, K.; Strehlke, P.; Heinrich, N.; Fritzemeier, K.-H.; Muhn, H.-P.; Krattenmacher, R.: *Non-steroidal (hetero) cyclically substituted acylanilides with mixed gestagen and androgen activity*, Weltorganisation für Geistiges Eigentum, **WO 98/54159**, 1998
- [52] Schmees, N.; Lehmann, M.; Fuhrmann, U.; Muhn, P.; Hegele-Hartung, C.; Klotzbücher, M.: *5-{2-Hydroxy-3-[1-(3-trifluoromethylphenyl)-cyclopropyl]-propionylamino}-phtalide and 6-{2-hydroxy-3-[1-(3-trifluoromethylphenyl)-cyclopropyl]-propionylamino}-4-methyl-2,3-benzoxazin-1-one derivatives with progesterone receptor modulating activity for use in fertility control, hormone replacement therapy and the treatment of gynecological disorders*, European Patent Office, **EP 1344776A1**, 2003
- [53] Schmees, N.; Lehmann, M.; Fuhrmann, U.; Muhn, P.; Hegele-Hartung, C.; Klotzbücher, M.: *5-{2-Hydroxy-3-[1-(3-trifluoromethylphenyl)-cyclopropyl]-propionylamino}-phtalide and related compounds with progesterone receptor modulation activity for use in fertility control and hormone replacement therapy*, World Intellectual Property Organization, **WO 03/075915 A1**, 2003
- [54] Koitka, M.; Höchel, J.; Obst, D.; Rottmann, A.; Gieschen, H.; Borchert, H.-H.: *Determination of rat serum esterase activities by an HPLC method using S-acetylthiocholine iodide and p-nitrophenyl acetate*, Anal. Biochem. (2008): **381**, 113-122
- [55] Reubsæet, J.L.E.; Ahlsen, E.; Haneborg, K.G.; Ringvold, A.: *Sample preparation and determination of acetylcholine in corneal epithelium cells using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. Sci. (2003): **41**, 151-156
- [56] Dunphy, R.; Burinsky, D.J.: *Detection of choline and acetylcholine in a pharmaceutical preparation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry*, J. Pharm. Biomed. Anal. (2003): **31**, 905-915
- [57] Scopes, R.K.: *Overview of protein purification and characterization*, Current Protocols in Protein Science (1995): Unit **1.1**
- [58] Invitrogen: *NuPAGE Bis-Tris Gel*, Instruction Booklet, o. O. u. J.
- [59] Invitrogen: *Colloidal Blue Staining Kit*, Instruction Manual, Carlsbad 2002
- [60] Invitrogen: *Novex® Pre-Cast Gel Electrophoresis Guide*, Carlsbad 2003
- [61] Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C.: *Measurement of protein using bicinchoninic acid*, Anal. Biochem. (1985): **150**, 76-85
- [62] Pierce Biotechnology: *BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible*, Instructions, Rockford 2005
- [63] Pierce Biotechnology: *Micro BCA Protein Assay Kit*, Instructions, Rockford 2006
- [64] Invitrogen: *iBlot Dry Blotting System*, User Manual, Carlsbad 2007
- [65] Sigma-Aldrich: *Sigma Guide to Protease Inhibition*, St. Louis 2004
- [66] Merck Biosciences: *Calbiochem Inhibitor SourceBook*, 2<sup>nd</sup> ed., Darmstadt o. J.
- [67] N.N.: *Special reagents for thiol groups*, Aldrichimica Acta (1971): **4**, 33-48
- [68] Hojring, N.; Svensmark, O.: *Carboxylesterases of human brain extract. Purification and properties of a butyryl esterase*, Biochim. Biophys. Acta (1977): **481**, 500-514
- [69] Markwardt, F.; Stürzebecher, J.: *Inhibitors of trypsin and trypsin-like enzymes with a physiological role*, in: *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs* (M. Sandler; H.J. Smith; eds.), Oxford University Press, Oxford 1989
- [70] Mares-Guia, M.; Nelson, D.L.; Rogana, E.: *Electronic effects in the interaction of para-substituted benzamides with trypsin: The involvement of the  $\pi$ -electronic density at the central atom of the substituent in binding*, J. Am. Chem. Soc. (1977): **99**, 2331-2336
- [71] Heymann, E.; Krisch, K.: *Phosphorsäure-bis-[p-nitro-phenylester], ein neuer Hemmstoff mikrosomaler Carboxylesterasen*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (1967): **348**, 609-619
- [72] Manco, G.; Di Gennaro, S.; De Rosa, M.; Rossi, M.: *Purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic eubacterium Bacillus acidocaldarius*, Eur. J. Biochem. (1994): **221**, 965-972
- [73] Takahashi, K.: *The reactions of phenylglyoxal and related reagents with amino acids*, J. Biochem. (1977): **81**, 395-402
- [74] Takahashi, K.: *The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins*, J. Biol. Chem. (1968): **243**, 6171-6179

- [75] Wilde, C.E.; Kekwick, R.G.O.: *The arylesterases of human serum*, *Biochem. J.* (1964): **91**, 297-307
- [76] Augustinsson, K.-B.: *Multiple forms of esterase in vertebrate blood plasma*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1961): **94**, 844-860
- [77] Graham, S.G.; Crossley, A.W.A.: *The characteristics of the inhibition of serum cholinesterase by metoclopramide*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (1995): **48**, 225-228
- [78] Davis, L.E.; Roth, S.A.; Anderson, B.: *Antisera specificities to 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide adducts of proteins*, *Immunology* (1984): **53**, 435-441
- [79] Hafemann, B.; Ghofrani, K.; Gattner, H.-G.; Stieve, H.; Pallua, N.: *Cross-linking by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) of a collagen/elastin membrane meant to be used as a dermal substitute: Effects on physical, biochemical and biological features in vitro*, *J. Mater. Sci.* (2001): **12**, 437-446
- [80] Kilburn, E.P.; Firkin, B.G.: *A study of human platelet esterases*, *Thromb. Diath. Haemorrh.* (1968): **20**, 366-376
- [81] Gorman, J.J.: *Inhibition of human thrombin assessed with different substrates and inhibitors. Characterization of fibrinopeptide binding interaction*, *Biochim. Biophys. Acta* (1975): **412**, 273-282
- [82] Sreedharan, S.K.; Verma, C.; Caves, L.S.D.; Brocklehurst, S.M.; Gharbia, S.E.; Shah, H.N.; Brocklehurst, K.: *Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64) is one of the most effective low M<sub>r</sub> inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64- $\beta$ -trypsin complex*, *Biochem. J.* (1996): **316**, 777-786
- [83] Junge, W.; Krisch, K.: *The carboxylesterases/amidases of mammalian liver and their possible significance*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (1975): **3**, 371-434
- [84] Krupka, R.M.: *Fluoride inhibition of acetylcholinesterase*, *Mol. Pharmacol.* (1966): **2**, 558-569
- [85] Cui, W.; Winter, W.T.; Tanenbaum, S.W.; Nakas, J.P.: *Purification and characterization of an intracellular carboxylesterase from *Arthrobacter viscosus* NRRL B-1973*, *Enzyme Microb. Technol.* (1999): **24**, 200-208
- [86] Boopathy, R.; Balasubramanian, A.S.: *Chemical modification of the bifunctional human serum pseudocholinesterase*, *Eur. J. Biochem.* (1985): **151**, 351-360
- [87] Bergmann, F.; Wurzel, M.: *The structure of the active surface of serum cholinesterase*, *Biochim. Biophys. Acta* (1954): **13**, 251-259
- [88] Kuo, C.-L.; La Du, B.N.: *Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity*, *Drug Metab. Dispos.* (1998): **26**, 653-660
- [89] Internet:  
[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=.%2Fdata%2FF981122.dat&REPTYPE=concise&sigthreshold=0.05&REPORT=AUTO%20](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2FF981122.dat&REPTYPE=concise&sigthreshold=0.05&REPORT=AUTO%20) (Stand: 30.06.2008)
- [90] Masson, P.; Froment, M.-T.; Gillon, E.; Nachon, F.; Lockridge, O.; Schopfer, L.M.: *Hydrolysis of oxo- and thio-esters by human butyrylcholinesterase*, *Biochim. Biophys. Acta* (2007): **1774**, 16-34
- [91] Schomburg, D.; Schomburg, I.: *Springer Handbook of Enzymes*, vol. 9, 2<sup>nd</sup> ed., Springer, Berlin 2003
- [92] Ecobichon, D.J.: *Characterization of the esterases of canine serum*, *Can. J. Biochem.* (1970): **48**, 1359-1367
- [93] Vincent, D.; Perrier, H.; Rouzioux, J.M.: *Sur les isoenzymes de la cholinestérase sérique chez quelques espèces animales*, *C. R. Séances Soc. Biol. Fil* (1970): **164**, 1767-1769 [in Französisch]
- [94] Augustinsson, K.-B.: *Electrophoresis studies on blood plasma esterases, I. Mammalian plasmata*, *Acta Chem. Scand.* (1959): **13**, 571-592
- [95] Sterri, S.H.; Berge, G.; Fonnum, F.: *Esterase activities and soman toxicity in developing rat*, *Acta Pharmacol. Toxicol.* (1985): **57**, 136-140
- [96] Illsley, N.P.; Lamartiniere, C.A.: *Endocrine regulation of rat serum cholinesterase activity*, *Endocrinology* (1981): **108**, 1737-1743
- [97] Edwards, J.A.; Brimijoin, S.: *Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat*, *J. Neurochem.* (1982): **38**, 1393-1403
- [98] Mukherjee, J.J.; Jay, F.T.; Choy, P.C.: *Purification, characterization and modulation of a microsomal carboxylesterase in rat liver for the hydrolysis of acyl-CoA*, *Biochem. J.* (1993): **295**, 81-86
- [99] Koch, C.-D.; Block, H.; Molz, J.: *Zur Bestimmung der Arylesteraseaktivität im menschlichen Serum mit 4-Nitrophenylazetat*, *Z. Gastroenterol.* (1975): **8**, 695-703
- [100] Aldridge, W.N.: *Serum esterases, 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination*, *Biochem. J.* (1953): **53**, 110-117
- [101] Masson, P.; Froment, M.-T.; Darvesh, S.; Schopfer, L.M.; Lockridge, O.: *Aryl acylamidase activity of human serum albumin with o-nitrotrifluoroacetanilide as the substrate*, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* (2007): **22**, 463-469

- [102] Hashinotsume, M.; Higashino, K.; Hada, T.; Yamamura, Y.: *Purification and enzymatic properties of rat serum carboxylesterase*, J. Biochem. (1978): **84**, 1325-1333
- [103] McCracken, N.W.; Blain, P.G.; Williams, F.M.: *Nature and role of xenobiotic metabolizing esterases in rat liver, lung, skin and blood*, Biochem. Pharmacol. (1993): **45**, 31-36
- [104] Mackness, M.I.; Arrol, S.; Durrington, P.N.: *Substrate specificity of human serum paraoxonase*, Biochem. Soc. Trans. (1991): **19**, 304S
- [105] Means, G.E.; Bender, M.L.: *Acetylation of human serum albumin by p-nitrophenyl acetate*, Biochemistry (1975): **14**, 4989-4994
- [106] Van Lith, H.A.; Haller, M.; Van Hoof, I.J.M.; Van Der Wouw, M.J.A.; Van Zutphen, B.F.M.; Beynen, A.C.: *Characterization of rat plasma esterase ES-1A concerning its molecular and catalytic properties*, Arch. Biochem. Biophys. (1993): **301**, 265-274
- [107] Tsujita, T.; Okuda, H.; Yamasaki, N.: *Purification and some properties of carboxylesterase of rat adipose tissue*, Biochim. Biophys. Acta (1982): **715**, 181-188
- [108] Shirai, K.; Ohsawa, I.; Saito, Y.; Yoshida, S.: *Effects of phospholipids on hydrolysis of trioleylglycerol by human serum carboxylesterase*, Biochim. Biophys. Acta (1988): **962**, 377-383
- [109] Einarsson, J.M.; Sigmundsson, K.; Filippusson, H.: *Purification and some properties of a carboxylesterase from ovine liver*, Comp. Biochem. Physiol. (1996): **114 B**, 41-48
- [110] Junge, W.; Heymann, E.: *Characterization of the isoenzymes of pig-liver esterase, 2. Kinetic studies*, Eur. J. Biochem. (1979): **95**, 519-525
- [111] Kim, Y.S.; Lee, H.B.; Choi, K.D.; Park, S.; Yoo, O.J.: *Cloning of Pseudomonas fluorescens carboxylesterase gene and characterization of its product expressed in Escherichia coli*, Biosci. Biotech. Biochem. (1994): **58**, 111-116
- [112] Alfa Aesar: *Methyl caprylate (CAS No. 111-11-5)*, Sicherheitsdatenblatt, Karlsruhe 2006
- [113] Riefler III, J.F.; Higerd, T.B.: *Characterization of intracellular esterase A from Bacillus subtilis*, Biochim. Biophys. Acta (1976): **429**, 191-197
- [114] Tsujita, T.; Okuda, H.: *Carboxylesterases in rat and human sera and their relationship to serum aryl acylamidases and cholinesterases*, Eur. J. Biochem. (1983): **133**, 215-220
- [115] Richter, D.; Croft, P.G.: *Blood esterases*, Biochem. J. (1942): **36**, 746-757
- [116] Scopes, R.K.: *Protein Purification. Principles and Practice*, 3<sup>rd</sup> ed., Springer, New York 1994
- [117] Ó Fágáin, C.: *Storage of pure proteins (chapter 32)*, in: *Methods in Molecular Biology, vol. 59: Protein Purification Protocols* (S. Doonan, ed.), Humana Press, Totowa 1996
- [118] Eckerson, H.W.; Romson, J.; Wyte, C.; La Du, B.N.: *The human serum paraoxonase polymorphism: Identification of phenotypes by their response to salts*, Am. J. Hum. Genet. (1983): **35**, 214-227
- [119] Brackley, M.; Carro-Ciampi, G.; Stewart, D.J.; Lowden, A.; Ray, A.K.; Kalow, W.: *Stability of the paraoxonase phenotyping ratio in collections of human sera with differing storage times*, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. (1983): **41**, 65-78
- [120] Epstein, H.M.; Jarzemyk, D.; Zuckerman, L.; Vagher, P.: *Plasma cholinesterase activity in bank blood*, Anesth. Analg. (1980): **59**, 211-214
- [121] Balland, M.; Vincent-Viry, M.; Henny, J.: *Effect of long-term storage on human plasma cholinesterase activity*, Clin. Chim. Acta (1992): **211**, 129-131
- [122] Simpson, N.E.: *Polyacrylamide electrophoresis used for the detection of C5+ cholinesterase in Canadian Caucasians, Indians, and Eskimos*, Am. J. Hum. Genet. (1972): **24**, 317-320
- [123] Jones, D.G.: *Stability and storage characteristics of enzymes in cattle blood*, Res. Vet. Sci. (1985): **38**, 301-306
- [124] Jones, D.G.: *Stability and storage characteristics of enzymes in sheep blood*, Res. Vet. Sci. (1985): **38**, 307-311
- [125] Gelfand, C.A.; Yi, J.; Warunek, D.; Craft, D.; O`Mullan, P.: *Preanalytic variability of plasma samples, and mitigating strategies*, BD Diagnostics, Franklin Lakes 2006 (Poster), Internet: [http://www.bd.com/proteomics/pdfs/Preanalytical\\_Variability\\_Plasma\\_Samples.pdf](http://www.bd.com/proteomics/pdfs/Preanalytical_Variability_Plasma_Samples.pdf) (Stand: 26.11.2008)
- [126] Friedel, R.; Mattenheimer, H.: *Release of metabolic enzymes from platelets during blood clotting of man, dog, rabbit and rat*, Clin. Chim. Acta (1970): **30**, 37-46
- [127] Caisey, J.D.; King, D.J.: *Clinical chemical values for some common laboratory animals*, Clin. Chem. (1980): **26**, 1877-1879
- [128] Breuer, J.; Stucky, W.: *Enzymaktivitäten im Serum und Plasma von Mensch, Hund und Ratte sowie deren Veränderungen beim Aufbewahren des Blutes*, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. (1975): **13**, 355-360
- [129] Methfessel, J.; Deml, L.: *Vergleichende Untersuchungen über Enzymaktivitäten in Blutplasma und -serum von Mensch, Kaninchen und Ratte*, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. (1967): **5**, 287-291

- [130] Dufer, J.; Trentesaux, C.; Desplaces, A.: *Differential effect of the serine protease inhibitor phenyl methyl sulfonyl fluoride on cytochemically detectable esterases in human leucocytes and platelets*, Scand. J. Haematol. (1984): **32**, 25-32
- [131] Oertel, J.; Kastner, M.: *Two-dimensional separation of  $\alpha$ -naphthyl acetate esterases in human leucocytes and platelets*, Br. J. Haematol. (1984): **57**, 431-439
- [132] Ross, M.K.; Crow, J.A.: *Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism*, J. Biochem. Mol. Toxicol. (2007): **21**, 187-196
- [133] Hartman, D.A.: *Determination of the stability of drugs in plasma*, Current Protocols in Pharmacology (2002): Unit **7.6**
- [134] Tsuji, T.; Kaneda, N.; Kado, K.; Yokokura, T.; Yoshimoto, T.; Tsuru, D.: *CPT-11 converting enzyme from rat serum: Purification and some properties*, J. Pharmacobiodyn. (1991): **14**, 341-349
- [135] Senter, P.D.; Marquardt, H.; Thomas, B.A.; Hammock, B.D.; Frank, I.S.; Svensson, H.P.: *The role of rat serum carboxylesterase in the activation of paclitaxel and camptothecin prodrugs*, Cancer Res. (1996): **56**, 1471-1474
- [136] Liederer, B.M.; Borchardt, R.T.: *Stability of oxymethyl-modified coumarinic acid cyclic prodrugs of diastereomeric opioid peptides in biological media from various animal species including human*, J. Pharm. Sci. (2005): **94**, 2198-2206
- [137] Crow, J.A.; Borazjani, A.; Potter, P.M.; Ross, M.K.: *Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases*, Toxicol. Appl. Pharmacol. (2007): **221**, 1-12
- [138] Wang, H.; Wang, Z.; Wang, S.; Li, M.; Nan, L.; Rhie, J.K.; Covey, J.M.; Zhang, R.; Hill, D.L.: *Preclinical pharmacology of epothilone D, a novel tubulin-stabilizing antitumor agent*, Cancer Chemother. Pharmacol. (2005): **56**, 255-260
- [139] Lawrence, S.H.; Melnick, P.J.; Weimer, H.E.: *A species comparison of serum proteins and enzymes by starch gel electrophoresis*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1960): **105**, 572-575
- [140] Rivkin, A.; Yoshimura, F.; Gabarda, A.E.; Chou, T.-C.; Dong, H.; Tong, W.P.; Danishefsky, S.J.: *Complex target-oriented total synthesis in the drug discovery process: The discovery of a highly promising family of second generation epothilones*, J. Am. Chem. Soc. (2003): **125**, 2899-2901
- [141] Billecke, S.; Draganov, D.; Counsell, R.; Stetson, P.; Watson, C.; Hsu, C.; La Du, B.N.: *Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters*, Drug Metab. Dispos. (2000): **28**, 1335-1342
- [142] Karim, A.; Zagarella, B.A.; Hribar, J.; Dooley, M.: *Spirolactone. I. Disposition and metabolism*, Clin. Pharmacol. Ther. (1976): **19**, 158-169
- [143] Hattori, K.; Igarashi, M.; Itoh, M.; Tomisawa, H.; Tateishi, M.: *Specific induction by glucocorticoids of steroid esterase in rat hepatic microsomes and its release into serum*, Biochem. Pharmacol. (1992): **43**, 1921-1927
- [144] Ali, B.; Kaur, S.; James, E.C.; Parmar, S.S.: *Identification and characterization of hepatic carboxylesterases hydrolyzing hydrocortisone esters*, Biochem. Pharmacol. (1985): **34**, 1881-1886
- [145] Oshima, T.; Nakajima, E.; Hattori, K.: *Hydrolysis of methylprednisolone hemisuccinate to methylprednisolone by a nonspecific carboxylesterase*, Pharmacol. Res. Commun. (1980): **12**, 139-146
- [146] Würthwein, G.; Rohdewald, P.: *Activation of beclomethasone dipropionate by hydrolysis to beclomethasone-17-monopropionate*, Biopharm. Drug Dispos. (1990): **11**, 381-394
- [147] Duggan, D.E.; Chen, I.-W.; Bayne, W.F.; Halpin, R.A.; Duncan, C.A.; Schwartz, M.S.; Stubbs, R.J.; Vickers, S.: *The physiological disposition of lovastatin*, Drug Metab. Dispos. (1989): **17**, 166-173
- [148] Vickers, S.; Duncan, C.A.; Chen, I.-W.; Rosegay, A.; Duggan, D.E.: *Metabolic disposition studies on simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug*, Drug Metab. Dispos. (1990): **18**, 138-145
- [149] Togawa, T.; Mukai, Y.; Ohata, K.; Suzuki, T.; Tanabe, S.: *Measurement of homocysteine thiolactone hydrolase activity using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and polymorphisms of paraoxonase in normal human serum*, J. Chromatogr. B (2005): **819**, 67-72
- [150] Tougou, K.; Nakamura, A.; Watanabe, S.; Okuyama, Y.; Morino, A.: *Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent*, Drug Metab. Dispos. (1998): **26**, 355-359
- [151] Teiber, J.F.; Draganov, D.I.; La Du, B.N.: *Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3*, Biochem. Pharmacol. (2003): **66**, 887-896
- [152] Jakubowski, H.: *Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase*, J. Biol. Chem. (2000): **275**, 3957-3962
- [153] GE Healthcare: *Sephacryl S-100, S-200, S-300, S-400, S-500 High Resolution*, Instructions, Uppsala 2005
- [154] GE Healthcare: *HiTrap Blue HP*, Data File 18-1134-79 AC, Uppsala 2006

- [155] O'Farrell, P.: *Hydrophobic interaction chromatography (chapter 15)*, in: *Methods in Molecular Biology, vol. 59: Protein Purification Protocols* (S. Doonan; ed.), Humana Press, Totowa 1996
- [156] Yan, B.; Yang, D.; Bullock, P.; Parkinson, A.: *Rat serum carboxylesterase. Cloning, expression, regulation, and evidence of secretion from rat liver*, *J. Biol. Chem.* (1995): **270**, 19128-19134
- [157] Luan, L.; Sugiyama, T.; Takai, S.; Usami, Y.; Adachi, T.; Katagiri, Y.; Hirano, K.: *Purification and characterization of pranlukast hydrolase from rat liver microsomes: The hydrolase is identical to carboxylesterase pl 6.2*, *Biol. Pharm. Bull.* (1997): **20**, 71-75
- [158] Fujita, Y.; Yaegashi, T.; Sawada, S.; Oyama, H.; Yoshimoto, T.; Tsuru, D.: *Partial purification and characterization of an esterase acting on the anticancer pro-drugs, 7-ethylcamptothecin derivatives*, *Biol. Pharm. Bull.* (1995): **18**, 648-652
- [159] Hosokawa, M.; Maki, T.; Satoh, T.: *Characterization of molecular species of liver microsomal carboxylesterases of several animal species and humans*, *Arch. Biochem. Biophys.* (1990): **277**, 219-227
- [160] Ersson, B.; Ryden, L.; Janson, J.-C.: *Introduction to protein purification*, in: *Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications* (J.-C. Janson; L. Ryden; eds.), 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-VCH, New York 1998
- [161] Wilk, S.: *Purification of proteolytic enzymes*, in: *Proteolytic Enzymes* (R. Beynon; J.S. Bond; eds.), 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University Press, Oxford 2001
- [162] Englard, S.; Seifter, S.: *Precipitation techniques*, *Methods Enzymol.* (1990): **182**, 285-300
- [163] Das, P.K.; Liddell, J.: *Purification and properties of human serum cholinesterase*, *Biochem. J.* (1970): **116**, 875-881
- [164] Somorin, O.; Skorepa, J.: *Aliesterase activity in normal and postheparin human blood sera*, *J. Biochem.* (1978): **83**, 617-623
- [165] Saboori, A.M.; Newcombe, D.S.: *Human monocyte carboxylesterase*, *J. Biol. Chem.* (1990): **265**, 19792-19799
- [166] Hagel, L.: *Gel filtration*, in: *Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications* (J.-C. Janson; L. Ryden; eds.), 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-VCH, New York 1998
- [167] Hagel, L.: *Gel-filtration chromatography*, *Current Protocols in Protein Science* (1998): Unit **8.3**
- [168] Hirose, T.; Morita, A.; Yamada, M.; Nikaido, H.; Hayakawa, J.; Nikaido, O.: *Selective purification of sex-influenced esterase from rat serum by immunoaffinity chromatographies*, *Eur. J. Biochem.* (1990): **189**, 431-435
- [169] Mahany, T.; Khirabadi, B.S.; Gersten, D.M.; Kurian, P.; Ledley, R.S.; Ramwell, P.W.: *Studies on the affinity chromatography of serum albumins from human and animal plasmas*, *Comp. Biochem. Physiol.* (1981): **68 B**, 319-323
- [170] Mahany, T.; Gersten, D.M.; Park, C.M.; Ramwell, P.W.; Ledley, R.S.: *Sex differences in blood protein patterns: A computer-assisted electrophoretic analysis of mid-molecular weight range proteins of human serum*, *Comput. Biol. Med.* (1984): **14**, 345-355
- [171] Travis, J.; Pannell, R.: *Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography*, *Clin. Chim. Acta* (1973): **49**, 49-52
- [172] Gan, K.N.; Smolen, A.; Eckerson, H.W.; La Du, B.N.: *Purification of human serum paraoxonase/arylesterase*, *Drug Metab. Dispos.* (1991): **19**, 100-106
- [173] Rodrigo, L.; Mackness, B.; Durrington, P.N.; Hernandez, A.; Mackness, M.I.: *Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase*, *Biochem. J.* (2001): **354**, 1-7
- [174] Williams, A.; Frasca, V.: *Ion-exchange chromatography*, *Current Protocols in Protein Science* (1999), Unit **8.2**
- [175] Rodrigo, L.; Gil, F.; Hernandez, A.F.; Lopez, O.; Pla, A.: *Identification of paraoxonase 3 in rat liver microsomes: Purification and biochemical properties*, *Biochem. J.* (2003): **376**, 261-268
- [176] Pond, A.L.; Coyne, C.P.; Chambers, H.W.; Chambers, J.E.: *Identification and isolation of two rat serum proteins with A-esterase activity toward paraoxon and chlorpyrifos-oxon*, *Biochem. Pharmacol.* (1996): **52**, 363-369
- [177] Kitchen, B.J.; Masters, C.J.; Winzor, D.J.: *Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase*, *Biochem. J.* (1973): **135**, 93-99
- [178] Golmanesh, L.; Mehrani, H.; Tabei, M.: *Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1*, *J. Biochem. Biophys. Methods* (2008): **70**, 1037-1042
- [179] Khersonsky, O.; Tawfik, D.S.: *Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase*, *Biochemistry* (2005): **44**, 6371-6382
- [180] Khersonsky, O.; Tawfik, D.S.: *The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases*, *J. Biol. Chem.* (2006): **281**, 7649-7656
- [181] Draganov, D.I.; Teiber, J.F.; Speelman, A.; Osawa, Y.; Sunahara, R.; La Du, B.N.: *Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities*, *J. Lipid Res.* (2005): **46**, 1239-1247

- [182] Satoh, T.; Hosokawa, M.; Atsumi, R.; Suzuki, W.; Hakusuj, H.; Nagai, E.: *Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by carboxylesterase*, Biol. Pharm. Bull. (1994): **17**, 662-664
- [183] McCracken, N.W.; Blain, P.G.; Williams, F.W.: *Human xenobiotic metabolizing esterases in liver and blood*, Biochem. Pharmacol. (1993): **46**, 1125-1129
- [184] Rousseau, G.: *Medium ring lactones*, Tetrahedron (1995): **51**, 2777-2849
- [185] Haas, N.B.; LaCreta, F.P.; Walczak, J.; Hudes, G.R.; Brennan, J.M.; Ozols, R.F.; O'Dwyer, P.J.: *Phase I/pharmacokinetic study of topotecan by 24-hour continuous infusion weekly*, Cancer Res. (1994): **54**, 1220-1226
- [186] Fishbein, W.N.; Bessman, S.P.: *Purification and properties of an enzyme in human blood and rat liver microsomes catalyzing the formation and hydrolysis of  $\gamma$ -lactones. II. Metal ion effects, kinetics, and equilibria*, J. Biol. Chem. (1966): **241**, 4842-4847
- [187] Marathe, G.K.; Zimmerman, G.A.; McIntyre, T.M.: *Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles*, J. Biol. Chem. (2003): **278**, 3937-3947
- [188] Kriska, T.; Marathe, G.K.; Schmidt, J.C.; McIntyre, T.M.; Girotti, A.W.: *Phospholipase action of platelet-activating factor acetylhydrolase, but not paraoxonase-1, on long fatty acyl chain phospholipid hydroperoxides*, J. Biol. Chem. (2007): **282**, 100-108
- [189] Tsoukatos, D.C.; Liapikos, T.A.; Tselepis, A.D.; Chapman, M.J.; Ninio, E.: *Platelet-activating factor acetylhydrolase and transacetylase activities in human plasma low-density lipoprotein*, Biochem. J. (2001): **357**, 457-464
- [190] Stafforini, D.M.; Sheller, J.R.; Blackwell, T.S.; Sapirstein, A.; Yull, F.E.; McIntyre, T.M.; Bonventre, J.V.; Prescott, S.M.; Roberts II, L.J.: *Release of free F<sub>2</sub>-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases*, J. Biol. Chem. (2006): **281**, 4616-4623
- [191] Morrow, J.D.; Hill, K.E.; Burk, R.F.; Nammour, T.M.; Badr, K.F.; Roberts II, L.J.: *A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism*, Proc. Natl. Acad. Sci. (1990): **87**, 9383-9387
- [192] Stafforini, D.M.; Prescott, S.M.; McIntyre, T.M.: *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase*, J. Biol. Chem. (1987): **262**, 4223-4230
- [193] Karasawa, K.: *Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase*, Biochim. Biophys. Acta (2006): **1761**, 1359-1372
- [194] Karabina, S.-A.; Ninio, E.: *Plasma PAF-acetylhydrolase: An unfulfilled promise?*, Biochim. Biophys. Acta (2006): **1761**, 1351-1358
- [195] Teiber, J.F.; Billecke, S.S.; La Du, B.N.; Draganov, D.I.: *Estrogen esters as substrates for human paraoxonases*, Arch. Biochem. Biophys. (2007): **461**, 24-29
- [196] Augustinsson: K-B.; Ekedahl, G.: *On the specificity of arylesterases*, Acta Chem. Scand. (1962): **16**, 240-241
- [197] Myers, C.; Lockridge, O.; La Du, B.N.: *Hydrolysis of methylprednisolone acetate by human serum cholinesterase*, Drug Metab. Dispos. (1982): **10**, 279-280
- [198] Cornish-Bowden, A.: *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 3<sup>rd</sup> ed., Portland Press, London 2004
- [199] Lockridge, O.; Mottershaw-Jacson, N.; Eckerson, H.W.; La Du, B.N.: *Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase*, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1980): **215**, 1-8
- [200] Dean, R.A.; Zhang, J.; Brzezinski, M.R.; Bosron, W.F.: *Tissue distribution of cocaine methyl esterase and ethyl transferase activities: Correlation with carboxylesterase protein*, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1995): **275**, 965-971
- [201] Morton, C.L.; Wadkins, R.M.; Danks, M.K.; Potter, P.M.: *The anticancer prodrug CPT-11 is a potent inhibitor of acetylcholinesterase but is rapidly catalyzed to SN-38 by butyrylcholinesterase*, Cancer Res. (1999): **59**, 1458-1463
- [202] Williams, E.T.; Jones, K.O.; Ponsler, G.D.; Lowery, S.M.; Perkins, E.J.; Wrighton, S.A.; Ruterbories, K.J.; Kazui, M.; Farid, N.A.: *The biotransformation of prasugrel, a new thienopyridine prodrug, by the human carboxylesterases 1 and 2*, Drug Metab. Dispos. (2008): **36**, 1227-1232
- [203] Costello, P.B.; Green, F.A.: *Identification and partial purification of the major aspirin hydrolyzing enzyme in human blood*, Arthritis and Rheumatism (1983): **26**, 541-547
- [204] Yamaori, S.; Ukena, E.; Fujiyama, N.; Funahashi, T.; Kimura, T.; Yamamoto, I.; Matsumara, K.; Oda, M.; Watanabe, K.: *Nafamostat is hydrolysed by human liver cytosolic long-chain acyl-CoA hydrolase*, Xenobiotica (2007): **37**, 260-270
- [205] Williams, F.M.; Mutch, E.M.; Nicholson, E.; Wynne, H.; Wright, P.; Lambert, D.; Rawlins, M.D.: *Human liver and plasma aspirin esterase*, J. Pharm. Pharmacol. (1989): **41**, 407-409
- [206] Quinney, S.K.; Sanghani, S.P.; Davis, W.I.; Hurley, T.D.; Sun, Z.; Murry, D.J.; Bosron, W.F.: *Hydrolysis of capecitabine to 5'-deoxy-5-fluorocytidine by human carboxylesterases and inhibition by loperamide*, J. Pharmacol. Exp. Ther. (2005): **313**, 1011-1016

- [207] Schindler, R.; Mentlein, R.; Feldheim, W.: *Purification and characterization of retinyl ester hydrolase as a member of the non-specific carboxylesterase supergene family*, Eur. J. Biochem. (1998): **251**, 863-873
- [208] Fishbein, W.N.; Bessman, S.P.: *Purification and properties of an enzyme in human blood and rat liver microsomes catalyzing the formation and hydrolysis of  $\gamma$ -lactones. I. Tissue localization, stoichiometry, specificity, distinction from esterase*, J. Biol. Chem. (1966): **241**, 4835-4841
- [209] Fleming, C.D.; Bencharit, S.; Edwards, C.C.; Hyatt, J.L.; Tsurkan, L.; Bai, F.; Fraga, C.; Morton, C.L.; Howard-Williams, E.L.; Potter, P.M.; Rebindo, M.R.: *Structural insights into drug processing by human carboxylesterase 1: Tamoxifen, mevastatin, and inhibition by benzil*, J. Mol. Biol. (2005): **352**, 165-177
- [210] Schachter, M.: *Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update*, Fundam. Clin. Pharmacol. (2004): **19**, 117-125
- [211] Satoh, T.; Hosokawa, M.: *The mammalian carboxylesterases: From molecules to functions*, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. (1998): **38**, 257-288
- [212] Hamelin, B.A.; Turgeon, J.: *Hydrophilicity/lipophilicity: Relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors*, TiPS (1998): **19**, 26-37
- [213] Fujino, H.; Saito, T.; Tsunenari, Y.; Kojima, J.; Sakaeda, T.: *Metabolic properties of the acid and lactone forms of HMG-CoA reductase inhibitors*, Xenobiotica (2004): **34**, 961-971
- [214] Draganov, D.I.; Stetson, P.L.; Watson, C.E.; Billecke, S.S.; La Du, B.N.: *Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation*, J. Biol. Chem. (2000): **275**, 33435-33442
- [215] Darvesh, S.; Martin, E.; Walsh, R.; Rockwood, K.: *Differential effects of lipid-lowering agents on human cholinesterases*, Clin. Biochem. (2004): **37**, 42-49
- [216] Mutch, E.; Nave, R.; McCracken, N.; Zech, K.; Williams, F.M.: *The role of esterases in the metabolism of ciclosonide to desisobutyryl-ciclesonide in human tissue*, Biochem. Pharmacol. (2007): **73**, 1657-1664
- [217] Hikima, T.; Maibach, H.I.: *Distribution of hydrolytic activity catalyzes the biotransformation of prednisolone 21-acetate in human skin*, Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. (2001): **14**, 196-202
- [218] Smolen, A.; Eckerson, H.W.; Gan, K.N.; Hailat, N.; La Du, B.N.: *Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/ arylesterase*, Drug Metab. Dispos. (1991): **19**, 107-112
- [219] Alexson, S.E.H.; Finlay, T.H.; Hellman, U.; Svensson, L.T.; Diczfalusy, U.; Eggertsen, G.: *Molecular cloning and identification of a rat serum carboxylesterase expressed in the liver*, J. Biol. Chem. (1994): **269**, 17118-17124
- [220] Berge, R.K.: *Purification and characterization of a long-chain acyl-CoA hydrolase from rat liver microsomes*, Biochim. Biophys. Acta (1979): **574**, 321-333
- [221] Gallagher, S.R.: *One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions*, Current Protocols in Protein Science (1995): Unit **10.3**
- [222] Laas, T.: *Electrophoresis in gels*, in: *Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications* (J.-C. Janson; L. Ryden; eds.), 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-VCH, New York 1998
- [223] Hosokawa, M.; Furihata, T.; Yaginuma, Y.; Yamamoto, N.; Koyano, N.; Fujii, A.; Nagahara, Y.; Satoh, T.; Chiba, K.: *Genomic structure and transcriptional regulation of the rat, mouse, and human carboxylesterase genes*, Drug Metab. Rev. (2007): **39**, 1-15
- [224] Miller, A.D.; Scott, D.F.; Chacko, T.L.; Maxwell, D.M.; Schlager, J.J.; Lanclos, K.D.: *Expression and partial purification of a recombinant secretory form of human liver carboxylesterase*, Protein Expression Purif. (1999): **17**, 16-25
- [225] Choudhury, S.R.: *Isolation and properties of an esterase isoenzyme of rat serum*, Histochem. J. (1974): **6**, 369-382
- [226] Chantonnet, A.; Lockridge, O.: *Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase*, Biochem. J. (1989): **260**, 625-634
- [227] Masson, P.: *Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinestérase du plasma humain, I. Paramètres moléculaires apparents et ébauche de la structure quaternaire*, Biochim. Biophys. Acta (1979) **578**, 493-504 [in Französisch]
- [228] Lockridge, O.; Eckerson, H.W.; La Du, B.N.: *Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase*, J. Biol. Chem. (1979): **254**, 8324-8330
- [229] Lockridge, O.; La Du, B.N.: *Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase*, J. Biol. Chem. (1982): **257**, 12012-12018
- [230] Lockridge, O.; Bartels, C.F.; Vaughan, T.A.; Wong, C.K.; Norton, S.E.; Johnson, L.L.: *Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase*, J. Biol. Chem. (1987): **262**, 549-557
- [231] Lynch, T.J.; Mattes, C.E.; Singh, A.; Bradley, R.M.; Brady, R.O.; Dretchen, K.L.: *Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase*, Toxicol. Appl. Pharmacol. (1997): **145**, 363-371

- [232] Wait, R.; Gianazza, E.; Eberini, I.; Sironi, L.; Dunn, M.J.; Gemeiner, M.; Miller, I.: *Proteins of rat serum, urine, and cerebrospinal fluid: VI. Further protein identifications and interstrain comparison*, Electrophoresis (2001): **22**, 3043-3052
- [233] Chen, Y.-Y.; Lin, S.-Y.; Yeh, Y.-Y.; Hsiao, H.-H.; Wu, C.-Y.; Chen, S.-T.; Wang, A.H.-J.: *A modified protein precipitation procedure for removal of albumin from serum*, Electrophoresis (2005): **26**, 2117-2127
- [234] Cederblad, G.: *Plasma proteins involved in haem metabolism and in transport of metals, hormones, and vitamins*, in: *Plasma Proteins* (B. Blombäck; L.A. Hanson; eds.), John Wiley & Sons, Chichester 1979
- [235] Andersson, L.-O.; Lunden, R.: *The composition of human plasma*, in: *Plasma Proteins* (B. Blombäck; L.A. Hanson; eds.), John Wiley & Sons, Chichester 1979
- [236] Lockridge, O.; Xue, W.; Gaydess, A.; Grigoryan, H.; Ding, S.-J.; Schopfer, L.M.; Hinrichs, S.H.; Masson, P.: *Pseudo-esterase activity of human albumin: Slow turnover on tyrosine 411 and stable acetylation of 82 residues including 59 lysines*, J. Biol. Chem. (2008): **283**, 22582-22590
- [237] Salvi, A.; Carrupt, P.-A.; Mayer, J.M.; Testa, B.: *Esterase-like activity of human serum albumin toward prodrug esters of nicotinic acid*, Drug Metab. Dispos. (1997): **25**, 395-398
- [238] Kragh-Hansen, U.; Chuang, V.T.G.; Otagiri, M.: *Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin*, Biol. Pharm. Bull. (2002): **25**, 695-704
- [239] Manoharan, I.; Boopathy, R.: *Diisopropylfluorophosphate-sensitive aryl acylamidase activity of fatty acid free human serum albumin*, Arch. Biochem. Biophys. (2006): **452**, 186-188
- [240] Awad-Elkarim, A.; Means, G.E.: *The reactivity of p-nitrophenyl acetate with serum albumins*, Comp. Biochem. Physiol. (1988): **91 B**, 267-272
- [241] Sakurai, Y.; Ma, S.-F.; Watanabe, H.; Yamaotsu, N.; Hirono, S.; Kurono, Y.; Kragh-Hansen, U.; Otagiri, M.: *Esterase-like activity of serum albumin: Characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates*, Pharm. Res. (2004): **21**, 285-292
- [242] Williams, F.M.: *Clinical significance of esterases in man*, Clin. Pharmacokinet. (1985): **10**, 392-403
- [243] Li, B.; Schopfer, L.M.; Hinrichs, S.H.; Masson, P.; Lockridge, O.: *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry assay for organophosphorus toxicants bound to human albumin at Tyr411*, Anal. Biochem. (2007): **361**, 263-272
- [244] Tove, S.B.: *The esterolytic activity of serum albumin*, Biochim. Biophys. Acta (1962): **57**, 230-235
- [245] Chapuis, N.; Brühlmann, C.; Reist, M.; Carrupt, P.-A.; Mayer, J.M.; Testa, B.: *The esterase-like activity of serum albumin may be due to cholinesterase contamination*, Pharm. Res. (2001): **18**, 1435-1439
- [246] Burke, T.G.; Mi, Z.: *Preferential binding of the carboxylate form of camptothecin by human serum albumin*, Anal. Biochem. (1993): **212**, 285-287
- [247] Burke, T.G.; Mi, Z.: *The structural basis of camptothecin interactions with human serum albumin: Impact on drug stability*, J. Med. Chem. (1994): **37**, 40-46
- [248] Connelly, P.W.; Maguire, G.F.; Picardo, C.M.; Teiber, J.F.; Draganov, D.: *Development of an immunoblot assay with infrared fluorescence to quantify paraoxonase 1 in serum and plasma*, J. Lipid Res. (2008): **49**, 245-250
- [249] Josse, D.; Ebel, C.; Strobel, D.; Fontaine, A.; Borges, F.; Echalié, A.; Baud, D.; Renault, F.; Le Maire, M.; Chabrières, E.; Masson, P.: *Oligomeric states of the detergent-solubilized human serum paraoxonase (PON1)*, J. Biol. Chem. (2002): **277**, 33386-33397
- [250] Kuo, C.-L.; La Du, B.N.: *Comparison of purified human and rabbit paraoxonases*, Drug Metab. Dispos. (1995): **23**, 935-944
- [251] Sorensen, R.C.; Primo-Parmo, S.L.; Kuo, C.-L.; Adkins, S.; Lockridge, O.; La Du, B.N.: *Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995): **92**, 7187-7191
- [252] Sigma: *Anti-Paraoxonase 1 (PON1), produced in rabbit, affinity isolated antibody*, Product Information, Saint Louis 2007
- [253] Mackness, B.; Durrington, P.N.; Mackness, M.I.: *Human serum paraoxonase*, Genet. Pharmacol. (1998): **31**, 329-336
- [254] Blatter Garin, M.-C.; Abbott, C.; Messmer, S.; Mackness, M.; Durrington, P.; Pometta, D.; James, R.W.: *Quantitation of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: Population differences in protein concentrations*, Biochem. J. (1994): **304**, 549-554
- [255] Thomas-Moya, E.; Gianotti, M.; Llado, I.; Proenza, A.M.: *Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity*, J. Nutr. Biochem. (2006): **17**, 197-203
- [256] Beltowski, J.; Wojcicka, G.; Marciniak, A.: *Species- and substrate-specific stimulation of human plasma paraoxonase 1 (PON1) activity by high chloride concentration*, Acta Biochim. Pol. (2002): **49**, 927-936

- [257] Primo-Parmo, S.L.; Sorenson, R.C.; Teiber, J.; La Du, B.N.: *The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family*, Genomics (1996): **33**, 498-507
- [258] Swaney, J.B.; Reese, H.; Eder, H.A.: *Polypeptide composition of rat high density lipoprotein: Characterization by SDS-gel electrophoresis*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1974): **59**, 513-519
- [259] Rochu, D.; Chabrière, E.; Renault, F.; Elias, M.; Cléry-Barraud, C.; Masson, P.: *Stabilization of the active form(s) of human paraoxonase by human phosphate-binding protein*, Biochem. Soc. Trans. (2007): **35**, 1616-1620
- [260] Harel, M.; Brushtein, B.; Meged, R.; Dvir, H.; Ravelli, R.B.G.; McCarthy, A.; Toker, L.; Silman, I.; Sussman, J.L.: *3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability*, Arh. Hig. Rada Toksikol. (2007): **58**, 347-353
- [261] Costa, L.G.; Vitalone, A.; Cole, T.B.; Furlong, C.E.: *Modulation of paraoxonase (PON1) activity*, Biochem. Pharmacol. (2005): **69**, 541-550
- [262] Moren, X.; Deakin, S.; Liu, M.-L.; Taskinen, M.-R.; James, R.W.: *HDL subfraction distribution of paraoxonase-1 and its relevance to enzyme activity and resistance to oxidative stress*, J. Lipid Res. (2008): **49**, 1246-1253
- [263] Rosenblat, M.; Gaidukov, L.; Khersonsky, O.; Vaya, J.; Oren, R.; Tawfik, D.S.; Aviram, M.: *The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulator of macrophage cholesterol efflux*, J. Biol. Chem. (2006): **281**, 7657-7665
- [264] Hassett, C.; Richter, R.J.; Humbert, R.; Chapline, C.; Crabb, J.W.; Omiecinski, C.J.; Furlong, C.E.: *Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: The mature protein retains its signal sequence*, Biochemistry (1991): **30**, 10141-10149
- [265] Scanu, A.M.: *Plasma apolipoproteins: Gene structure, function, and variants*, in: *The Plasma Proteins* (F.W. Putnam; ed.), vol. V, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press, Orlando 1987
- [266] Sottrup-Jensen, L.:  *$\alpha_2$ -Macroglobulin and related thiol ester plasma proteins*, in: *The Plasma Proteins* (F.W. Putnam; ed.), vol. V, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press, Orlando 1987
- [267] Salvesen, G.S.; Nagase, H.: *Inhibition of proteolytic enzymes*, in: *Proteolytic Enzymes* (R. Beynon; J.S. Bond; eds.), 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University Press, Oxford 2001
- [268] Andersson, M.; Jönsson, U.; Olsson, A.: *A slow form of alpha-2-macroglobulin in diseased and healthy dogs*, J. Comp. Path. (2002): **127**, 37-44
- [269] Rinderknecht, H.; Geokas, M.C.: *On the physiological role of  $\alpha_2$ -macroglobulin*, Biochim. Biophys. Acta (1973): **295**, 233-244
- [270] Ganrot, P.O.: *Studies on serum protease inhibitors with special reference to  $\alpha_2$ -macroglobulin*, Dissertation, Acta Univ. Lund., Sectio II, No. 2 (1967)
- [271] Berthillier, G.; Got, R.; Bertagnolio, G.: *Biochimie de l' $\alpha_1$ -macroglobuline de lapin. IV. Effet sur l'activité estérasique de la trypsine et de la chymotrypsine*, Biochim. Biophys. Acta (1968): **170**, 140-151 [in Französisch]
- [272] Mehl, J.W.; O'Connell, W.; DeGroot, J.: *Macroglobulin from human plasma which forms an enzymatically active compound with trypsin*, Science (1964): **145**, 821-822
- [273] Haverback, B.J.; Dyce, B.; Bundy, H.F.; Wirtschaffer, S.K.; Edmondson, H.A.: *Protein binding of pancreatic proteolytic enzymes*, J. Clin. Invest. (1962): **41**, 972-980
- [274] Augustinsson, K.-B.: *Electrophoretic separation and classification of blood plasma esterases*, Nature (1958): **181**, 1786-1789
- [275] Tecles, F.; Subiela, S.M.; Bernal, L.J.; Ceron, J.J.: *Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs*, Vet. J. (2000): **160**, 242-249
- [276] Draganov, D.I.; La Du, B.N.: *Pharmacogenetics of paraoxonases: A brief review*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (2004): **369**, 78-88
- [277] Sogorb, M.A.; Vilanova, E.: *Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis*, Toxicol. Lett. (2002): **128**, 215-228
- [278] La Du, B.N.; Aviram, M.; Billecke, S.; Navab, M.; Primo-Parmo, S.; Sorenson, R.C.; Standiford, T.J.: *On the physiological role(s) of the paraoxonases*, Chem.-Biol. Interact. (1999): **119-120**, 379-388
- [279] Elias, M.; Dupuy, J.; Merone, L.; Mandrich, L.; Porzio, E.; Moniot, S.; Rochu, D.; Lecomte, C.; Rossi, M.; Masson, P.; Manco, G.; Chabrière, E.: *Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities*, J. Mol. Biol. (2008): **379**, 1017-1028
- [280] Leone, C.A.; Anthony, R.L.: *Serum esterases among registered breeds of dogs as revealed by immunoelectrophoretic comparisons*, Comp. Biochem. Physiol. (1966): **18**, 359-368
- [281] Sugiura, S.; Tanabe, Y.; Ota, K.: *Genetic polymorphism of eserine resistant esterases in canine plasma*, Anim. Blood Groups Biochem. Genet. (1977): **8**, 121-126
- [282] Braend, M.; Roed, K.H.: *Polymorphism of transferrin and esterase in Alaskan wolves: Evidence of close molecular homology with the dog*, Anim. Genet. (1987): **18**, 143-148

- [283] Aldridge, W.N.; Reiner, E.: *Enzyme Inhibitors as Substrates*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1972
- [284] Ooms, A.J.J.; Breebaart-Hansen, J.C.A.E.: *The reaction of organophosphorus compounds with hydrolytic enzymes. The inhibition of horse liver aliesterase*, *Biochem. Pharmacol.* (1965): **14**, 1727-1738
- [285] Ooms, A.J.J.; Van Dijk, C.: *The reaction of organophosphorus compounds with hydrolytic enzymes. III. The inhibition of chymotrypsin and trypsin*, *Biochem. Pharmacol.* (1966): **15**, 1361-1377
- [286] Powers, J.C.; Harper, J.W.: *Inhibitors of serine proteinases*, in: *Proteinase Inhibitors* (A.J. Barrett; G. Salvesen; eds.), Elsevier, Amsterdam 1986
- [287] Imai, T.: *Human carboxylesterase isozymes: Catalytic properties and rational drug design*, *Drug Metab. Pharmacokinet.* (2006): **21**, 173-185
- [288] Nousiainen, U.; Torronen, R.: *Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by in vivo and in vitro inhibition*, *Genet. Pharmacol.* (1984): **15**, 223-227
- [289] Gold, A.M.; Fahrney, D.: *Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. II. Formation and reactions of phenylmethanesulfonyl  $\alpha$ -chymotrypsin*, *Biochemistry* (1964): **3**, 783-791
- [290] Mintz, G.R.: *An irreversible serine protease inhibitor*, *BioPharm* (1993): **6**, 34-38
- [291] Markwardt, F.; Walsmann, P.; Richter, M.; Klöcking, H.-P.; Drawert, J.; Landmann, H.: *Aminoalkylbenzolsulfofluoride als Fermentinhibitoren*, *Pharmazie* (1971): **26**, 401-404
- [292] Walsmann, P.; Richter, M.; Markwardt, F.: *Inaktivierung von Trypsin und Thrombin durch 4-Aminobenzolsulfofluorid und 4-(2-Aminoäthyl)-benzolsulfofluorid*, *Acta Biol. Med. Germ.* (1972): **28**, 577-585
- [293] Laura, R.; Robison, D.J.; Bing, D.H.: *(p-Amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride, an irreversible inhibitor of serine proteases*, *Biochemistry* (1980): **19**, 4859-4864
- [294] Dunn, B.M.: *Determination of protease mechanism*, in: *Proteolytic Enzymes* (R. Beynon; J.S. Bond; eds.), 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University Press, Oxford 2001
- [295] Lopez-Rivas, A.; Vazquez, D.; Palacian, E.: *Stimulation of polypeptide polymerization in Escherichia coli ribosomes by modification of ribosomal sulfhydryl groups with N-bromsuccinimide*, *Eur. J. Biochem.* (1978): **92**, 121-128
- [296] Powers, J.C.; Harper, J.W.: *Inhibitors of metalloproteases*, in: *Proteinase Inhibitors* (A.J. Barrett; G. Salvesen; eds.), Elsevier, Amsterdam 1986
- [297] Wolz, R.L.: *Strategies for inhibiting proteases of unknown mechanism*, in: *Proteolytic Enzymes* (E.E. Sterchi; W. Stöcker; eds.), Springer, Berlin 1999
- [298] Auld, D.S.: *Removal and replacement of metal ions in metalloproteases*, *Methods Enzymol.* (1995): **248**, 228-242
- [299] Bhanumathy, C.D.; Balasubramanian, A.S.: *Evidence for a Zn<sup>2+</sup>-binding site in human serum butyrylcholinesterase*, *Biochem. J.* (1996): **315**, 127-131
- [300] Bhanumathy, C.D.; Balasubramanian, A.S.: *Selective inactivation of butyrylcholinesterase with metal chelators suggests there is more than one metal binding site*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (1998): **30**, 695-705
- [301] Sarkarati, B.; Cokugras, A.N.; Tezcan, E.F.: *Inhibition kinetics of human serum butyrylcholinesterase by Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup>: Comparison of the effects of metal ions on cholinesterases*, *Comp. Biochem. Physiol., Part C* (1999): **122**, 181-190
- [302] Cengiz, D.; Cokugras, A.N.; Tezcan, E.F.: *Effects of Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> on desensitized butyrylcholinesterase prepared from human serum*, *Biol. Trace Elem. Res.* (2003): **93**, 55-62
- [303] Cokugras, A.N.; Tezcan, E.F.: *Inhibition kinetics of brain butyrylcholinesterase by Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> reactivates the inhibited enzyme*, *Int. J. Biochem.* (1993): **25**, 1115-1120
- [304] Smialowski-Fléter, S.; Moulin, A.; Villard, C.; Puigserver, A.: *Structure-function relationships in the carboxylic-ester-hydrolase superfamily*, *Eur. J. Biochem.* (2000): **267**, 2227-2234
- [305] Castronuovo Lepore, G.; Geraci, G.; Abrescia, P.; De Lorenzo, F.: *Histidyl-transfer-ribonucleic-acid synthetase from salmonella typhimurium*, *Eur. J. Biochem.* (1976): **65**, 171-176
- [306] Lockridge, O.; Adkins, S.; La Du, B.N.: *Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase*, *J. Biol. Chem.* (1987): **262**, 12945-12952
- [307] Yan, B.; Yang, D.; Brady, M.; Parkinson, A.: *Rat kidney carboxylesterase. Cloning, sequencing, cellular localization, and relationship to rat liver hydrolase*, *J. Biol. Chem.* (1994): **269**, 29688-29696
- [308] Hojring, N.; Svensmark, O.: *Molecular and catalytic properties of a butyrylesterase from human red cells and brain*, *Arch. Biochem. Biophys.* (1988): **260**, 351-358
- [309] Hayase, K.; Tappel, A.L.: *Microsomal esterase from rat liver*, *J. Biol. Chem.* (1969): **244**, 2269-2274
- [310] Rich, D.H.: *Inhibitors of cysteine proteinases*, in: *Proteinase Inhibitors* (A.J. Barrett; G. Salvesen; eds.), Elsevier, Amsterdam 1986
- [311] Glover, G.; Shaw, E.: *The purification of thrombin and isolation of a peptide containing the active center histidine*, *J. Biol. Chem.* (1971): **246**, 4594-4601

- [312] Tsilikounas, E.; Rao, T.; Gutheil, W.G.; Bachovchin, W.W.: <sup>15</sup>N and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the catalytic histidine in chloromethyl ketone-inhibited complexes of serine proteases, *Biochemistry* (1996): **35**, 2437-2444
- [313] Cokugras, A.N.; Cengiz, D.; Tezcan, E.F.: *Do alkylating agents modify the histidine residue of the desensitized butyrylcholinesterase?*, *Protein J.* (2004): **23**, 495-500
- [314] Cengiz, D.; Cokugras, A.N.; Kilinc, K.; Tezcan, E.F.: *Histidine modification of human serum butyrylcholinesterase*, *Biochem. Mol. Med.* (1997): **61**, 52-57
- [315] Patel, D.; Scott, C.S.: *Inhibitor studies of purified haemopoietic (myeloid) cell esterases*, *Biochem. Pharmacol.* (1991): **42**, 1577-1585
- [316] Oboh, O.T.; Lamango, N.S.: *Liver prenylated methylated protein methyl esterase is the same enzyme as Sus scrofa carboxylesterase*, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* (2008): **22**, 51-62
- [317] Wood, A.N.P.; Fernandez-Lafuente, R.; Cowan, D.A.: *Purification and partial characterization of a novel thermophilic carboxylesterase with high mesophilic specific activity*, *Enzyme Microb. Technol.* (1995): **17**, 816-825
- [318] Stojan, J.; Golicnik, M.; Froment, M.-T.; Estour, F.; Masson, P.: *Concentration-dependent reversible activation-inhibition of human butyrylcholinesterase by tetraethylammonium ion*, *Eur. J. Biochem.* (2002): **269**, 1154-1161
- [319] Andersen, R.A.; Mikalsen, A.: *Substrate specificity, effect of inhibitors and electrophoretic mobility of brain and serum cholinesterase from frog, chicken and rat*, *Genet. Pharmacol.* (1978): **9**, 177-181
- [320] Erdős, E.G.; Foldes, F.F.; Zsigmond, E.K.; Baart, N.; Zwartz, J.A.: *Acceleration of plasma cholinesterase activity by quaternary ammonium salts*, *Science* (1958): **128**, 92-93
- [321] Moralev, S.N.; Rozengart, E.V.: *Comparative Enzymology of Cholinesterases*, International University Line, La Jolla 2007
- [322] Darvesh, S.; McDonald, R.S.; Penwell, A.; Conrad, S.; Darvesh, K.V.; Mataija, D.; Gomez, G.; Caines, A.; Walsh, R.; Martin, E.: *Structure-activity relationships for inhibition of human cholinesterases by alkyl amide pheothiazine derivatives*, *Bioorg. Med. Chem.* (2005): **13**, 211-222
- [323] Roufogalis, B.D.; Wickson, V.M.: *Acetylcholinesterase: Specificity of the peripheral anionic site for cholinergic ligands*, *Mol. Pharmacol.* (1975): **11**, 352-360
- [324] Mukerjee, P.; Mysels, K.J.: *Critical Micelle Concentration of Aqueous Surfactant Systems*, Nat. Stand. Ref. Data Ser., Nat. Bur. Stand. (U. S.) 36, Washington 1971
- [325] Schmidinger, H.; Birner-Gruenberger, R.; Riesenhuber, G.; Saf, R.; Susani-Etzerodt, H.; Hermetter, A.: *Novel fluorescent phosphonic acid esters for discrimination of lipases and esterases*, *ChemBioChem* (2005): **6**, 1776-1781
- [326] Mentlein, R.; Reuter, G.; Heymann, E.: *Specificity of two different purified acylcarnitine hydrolases from rat liver, their identity with other carboxylesterases, and their possible function*, *Arch. Biochem. Biophys.* (1985): **240**, 801-810
- [327] Peled, N.; Krenz, M.C.: *A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol*, *Anal. Biochem.* (1981): **112**, 219-222
- [328] Krell, H.-W.; Sandermann Jr., H.: *Plant biochemistry of xenobiotics. Purification and properties of a wheat esterase hydrolyzing the plasticizer chemical, bis(2-ethylhexyl)phthalate*, *Eur. J. Biochem.* (1984): **143**, 57-62
- [329] Furlong, C.E.; Richter, R.E.; Chapline, C.; Crabb, J.W.: *Purification of rabbit and human serum paraoxonase*, *Biochemistry* (1991): **30**, 10133-10140
- [330] Huang, Y.S.; Woods, L.; Sultatos, L.G.: *Solubilization and purification of A-esterase from mouse hepatic microsomes*, *Biochem. Pharmacol.* (1994): **48**, 1273-1280
- [331] Neugebauer, J.M.: *Detergents: An overview*, *Methods Enzymol.* (1990): **182**, 239-253
- [332] Lanchantin, G.F.; Plesset, M.L.; Friedmann, J.A.; Hart, D.W.: *Dissociation of esterolytic and clotting activities of thrombin by trypsin-binding macroglobulin*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1965): **121**, 444-449
- [333] Tangen, O.; Bygdeman, S.: *Study of the clotting, esterase and platelet aggregating activities of thrombin, acetylated thrombin and Reptilase®*, *Scand. J. Haematol.* (1972): **9**, 333-338
- [334] Pal, P.K.; Gertler, M.M.: *The catalytic activity and physical properties of bovine thrombin in the presence of dimethyl sulfoxide*, *Thromb. Res.* (1983): **29**, 175-185
- [335] Suda, H.; Aoyagi, T.; Hamada, M.; Takeuchi, T.; Umezawa, H.: *Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes*, *J. Antibiot.* (1972): **25**, 263-266
- [336] Roberts, P.S.: *Measurement of the rate of plasmin action on synthetic substrates*, *J. Biol. Chem.* (1958): **232**, 285-291
- [337] Bury, A.F.; Barrett, A.J.: *Plasma arginine esterase in cystic fibrosis: Kinetics of activation, identification as plasma kallikrein, reaction with α<sub>2</sub>-macroglobulin and comparison with levels in normal plasma*, *Pediatr. Res.* (1982): **16**, 613-620

- [338] Sousa, M.O.; Miranda, T.L.S.; Maia, C.N.; Bittar, E.R.; Santoro, M.M.; Figueiredo, A.F.S.: *Kinetic peculiarities of human tissue kallikrein: 1 – Substrate activation in the catalyzed hydrolysis of H-D-valyl-L-leucyl-L-arginine 4-nitroanilide and H-D-valyl-L-leucyl-L-lysine 4-nitroanilide; 2 – Substrate inhibition in the catalyzed hydrolysis of N $\alpha$ -p-tosyl-L-arginine methyl ester*, Arch. Biochem. Biophys. (2002): **400**, 7-14
- [339] Bedi, G.S.; Nack, N.: *Purification and characterization of rat plasma kallikrein*, Prep. Biochem. (1984): **14**, 257-279
- [340] Nagase, H.; Barrett, A.J.: *Human plasma kallikrein. A rapid purification method with high yield*, Biochem. J. (1981): **193**, 187-192
- [341] Xiong, W.; Chen, L.-M.; Woodley-Miller, C.; Simson, J.A.V.; Chao, J.: *Identification, purification, and localization of tissue kallikrein in rat heart*, Biochem. J. (1990): **267**, 639-646
- [342] Feldbau, E.; Schwabe, C.: *Selective inhibition of serine proteases by alkyltrimethylbenzylammonium chloride*, Biochemistry (1971): **10**, 2131-2138
- [343] Henrikson, K.P.; Dickerman, H.W.: *An estrogen-stimulated, calcium-dependent tosylarginine methyl ester (TAME) hydrolase in immature rat uterus*, Mol. Cell. Endocrinol. (1983): **32**, 143-156
- [344] Atassi, M.Z.; Manshour, T.: *Design of peptide enzymes (pepzymes): Surface-simulation synthetic peptides that mimic the chymotrypsin and trypsin active sites exhibit the activity and specificity of the respective enzyme*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993): **90**, 8282-8286
- [345] Trowbridge, C.G.; Krehbiel, A.; Laskowski Jr., M.: *Substrate activation of trypsin*, Biochemistry (1963): **2**, 843-850
- [346] Isaacs, W.B.; Coffey, D.S.: *The predominant protein of canine seminal plasma is an enzyme*, J. Biol. Chem. (1984): **259**, 11520-11526
- [347] Baker, B.R.; Cory, M.: *Irreversible enzyme inhibitors. 180. Irreversible inhibitors of the C $\alpha$ 1a component of complement derived from m-(phenoxypropoxy)-benzamidide and phenoxyacetamide*, J. Med. Chem. (1971): **14**, 119-125
- [348] Janoff, A.; Basch, R.S.: *Further studies on elastase-like esterases in human leukocyte granules*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1971): **136**, 1045-1049
- [349] Suffys, P.; Beyaert, R.; Van Roy, F.; Fiers, W.: *Involvement of a serine protease in tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity*, Eur. J. Biochem. (1988): **178**, 257-265
- [350] Christman, J.K.: *Plasminogen activators*, in: *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs* (M. Sandler; H.J. Smith; eds.), Oxford University Press, Oxford 1989
- [351] Darvesh, S.; Kumar, R.; Roberts, S.; Walsh, R.; Martin, E.: *Butyrylcholinesterase-mediated enhancement of the enzymatic activity of trypsin*, Cell. Mol. Neurobiol. (2001): **21**, 285-296
- [352] Blumberg, S.; Silman, I.: *Inactivation of electric eel acetylcholinesterase by acylation with N-hydroxysuccinimide esters of amino acid derivatives*, Biochemistry (1978): **17**, 1125-1130
- [353] Grigoryan, H.A.; Hambardzumyan, A.A.; Mkrtchyan, M.V.; Topuzyan, V.O.; Halebyan, G.P.; Asatryan, R.S.:  *$\alpha,\beta$ -Dehydrophenylalanine choline esters, a new class of reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase*, Chem.-Biol. Interact. (2008): **171**, 108-116
- [354] Arndt, R.; Krisch, K.: *Catalytic properties of an unspecific carboxylesterase (E $_1$ ) from rat-liver microsomes*, Eur. J. Biochem. (1973): **36**, 129-134
- [355] Saito, M.; Egawa, K.: *Isolation and characterization of a murine serum esterase which hydrolyzes a tumor promoter, 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate*, J. Biol. Chem. (1984): **259**, 5821-5826
- [356] Sigma-Aldrich: *Sodium fluoride*, Product Information, Saint Louis 2006
- [357] Voet, D.; Voet, J.G.: *Biochemie*, 1. Aufl., VCH, Weinheim 1992
- [358] Yourno, J.; Burkart, P.; Mastropaolo, W.; Lizzi, F.; Tartaglia, A.: *Monocyte nonspecific esterase. Enzymologic characterization of a neutral serine esterase associated with myeloid cells*, J. Histochem. Cytochem. (1986): **34**, 727-733
- [359] Fitch, W.M.: *Studies on a cholinesterase of Pseudomonas fluorescens. II. Purification and properties*, Biochemistry (1963): **2**, 1221-1227
- [360] Dietz, A.A.: *Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis(nitrobenzoic acid) procedure*, Clin. Chem. (1973): **19**, 1309-1313
- [361] Garry, P.J.: *Serum cholinesterase variants: Examination of several differential inhibitors, salts, and buffers used to measure enzyme activity*, Clin. Chem. (1971): **17**, 183-191
- [362] Okuda, H.; Fujii, S.: *Separation of lipase and esterase from rat epididymal adipose tissue*, J. Biochem. (1966): **60**, 154-159
- [363] Castiglioni-Ruiz, L.; De Campos Bicudo, H.E.M.; Ceron, C.R.: *Esterase patterns in four Brazilian populations of Haematobia irritans*, Cytobios (1997): **90**, 81-94
- [364] Lockridge, O.: *Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine*, Pharmacol. Ther. (1990): **47**, 25-60

- [365] Haugen, D.A.; Suttie, J.W.: *Fluoride inhibition of rat liver microsomal esterases*, J. Biol. Chem. (1974): **249**, 2723-2731
- [366] Wynne, D.; Ginsburg, S.; Shalitin, Y.: *Beef liver esterase. II. Kinetic properties*, Arch. Biochem. Biophys. (1973): **154**, 204-211
- [367] Jewell, C.; Ackermann, C.; Payne, N.A.; Fate, G.; Voorman, R.; Williams, F.M.: *Specificity of procaine and ester hydrolysis by human, minipig, and rat skin and liver*, Drug Metab. Dispos. (2007): **35**, 2015-2022
- [368] Matsuda, H.; Tanaka, A.; Itakura, A.: *Immunology and hematology*, in: *The Laboratory Rat* (G.J. Krinke; ed.), Academic Press, London 2000
- [369] Barrett, A.J.: *Introduction to the history and classification of tissue proteinases*, in: *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues* (A.J. Barrett; ed.) (Research Monographs in Cell and Tissue Physiology, vol. 2; J.T. Dingle; ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1977
- [370] Zollner, H.: *Handbook of Enzyme Inhibitors*, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim 1999
- [371] Petersen, L.C.; Olsen, O.H.; Nielsen, L.S.; Freskgard, P.-O.; Persson, E.: *Binding of Zn<sup>2+</sup> to a Ca<sup>2+</sup> loop allosterically attenuates the activity of factor VIIa and reduces its affinity for tissue factor*, Protein Sci. (2000): **9**, 859-866
- [372] Borgono, C.A.; Michael, I.P.; Shaw, J.L.V.; Luo, L.-Y.; Ghosh, M.C.; Soosaipillai, A.; Grass, L.; Katsaros, D.; Diamandis, E.P.: *Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14*, J. Biol. Chem. (2007): **282**, 2405-2422
- [373] Inagami, T.; Sturtevant, J.M.: *Nonspecific catalyses by  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin*, J. Biol. Chem. (1960): **235**, 1019-1023
- [374] Bargota, R.S.; Akhtar, M.; Biggadike, K.; Gani, D.; Allemann, R.K.: *Structure-activity relationship on human serum paraoxonase (PON1) using substrate analogues and inhibitors*, Bioorg. Med. Chem. Lett. (2003): **13**, 1623-1626
- [375] Gil, F.; Pla, A.; Gonzalvo, M.C.; Hernandez, A.F.; Villanueva, E.: *Rat liver paraoxonase: Subcellular distribution and characterization*, Chem.-Biol. Interact. (1993): **87**, 149-154
- [376] Rodrigo, L.; Gil, F.; Hernandez, A.F.; Pla, A.: *Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: Biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase*, Chem.-Biol. Interact. (1999): **119-120**, 263-275
- [377] Gil, F.; Gonzalvo, M.C.; Hernandez, A.F.; Villanueva, E.; Pla, A.: *Differences in the kinetic properties, effect of calcium and sensitivity to inhibitors of paraoxon hydrolase activity in rat plasma and microsomal fraction from rat liver*, Biochem. Pharmacol. (1994): **48**, 1559-1568
- [378] Blong, R.M.; Bedows, E.; Lockridge, O.: *Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus*, Biochem. J. (1997): **327**, 747-757
- [379] Motta, S.; Letellier, C.; Ropert, M.; Motta, C.; Thiébault, J.J.: *Protecting effect of vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in sedentary dogs as assessed by erythrocyte membrane fluidity and paraoxonase-1 activity*, Vet. J. (2008), doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.013
- [380] Rao, R.V.; Balasubramanian, A.S.: *Isolation of a galactose-free 20-kDa fragment exhibiting butyrylcholine esterase and aryl acylamidase activity from human serum butyrylcholine esterase by limited  $\alpha$ -chymotrypsin digestion*, Eur. J. Biochem. (1989): **179**, 639-644
- [381] George, S.T.; Balasubramanian, A.S.: *The aryl acylamidases and their relationship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver*, Eur. J. Biochem. (1981): **121**, 177-186
- [382] Rao, R.V.; Balasubramanian, A.S.: *Localization of the peptidase activity of human serum butyrylcholinesterase in a – 50-kDa fragment obtained by limited  $\alpha$ -chymotrypsin digestion*, Eur. J. Biochem. (1990): **188**, 637-643
- [383] Cimasoni, G.: *Inhibition of cholinesterases by fluoride in vitro*, Biochem. J. (1966): **99**, 133-137
- [384] Jaganathan, L.; Boopathy, R.: *Distinct effect of benzalkonium chloride on the esterase and aryl acylamidase activities of butyrylcholinesterase*, Bioorg. Chem. (2000): **28**, 242-251
- [385] Boopathy, R.; Balasubramanian, A.S.: *A peptidase activity exhibited by human serum pseudocholinesterase*, Eur. J. Biochem. (1987): **162**, 191-197
- [386] Checler, F.; Grassi, J.; Vincent, J.-P.: *Cholinesterases display genuine arylacylamidase activity but are totally devoid of intrinsic peptidase activities*, J. Neurochem. (1994): **62**, 756-763
- [387] Carroll, R.T.; Emmerling, M.R.: *Identification of the trypsin-like activity in commercial preparations of eel acetylcholinesterase*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991): **181**, 858-862
- [388] De Serres, M.; Sherman, D.; Chestnut, W.; Merrill, B.M.; Viveros, O.H.; Diliberto Jr., E.J.: *Proteolysis at the secretase and amyloidogenic cleavage sites of the  $\beta$ -amyloid precursor protein by acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase using model peptide substrates*, Cell. Mol. Neurobiol. (1993): **13**, 279-287

- [389] Darvesh, S.; McDonald, R.S.; Darvesh, K.V.; Mataija, D.; Mothana, S.; Cook, H.; Carneiro, K.M.; Rihard, N.; Walsh, R.; Martin, E.: *On the active site for hydrolysis of aryl amides and choline esters by human cholinesterases*, *Bioorg. Med. Chem.* (2006): **14**, 4586-4599
- [390] Montenegro, M.F.; Moral-Naranjo, M.T.; Páez de la Cadena, M.; Campoy, F.J.; Muñoz-Delgado, E.; Vidal, C.J.: *Human butyrylcholinesterase components differ in aryl acylamidase activity*, *Biol. Chem.* (2008): **389**, 425-432
- [391] Bidstrup, P.L.; Bonnell, J.A.; Beckett, A.G.: *Paralysis following poisoning by a new organic phosphorus insecticide (mipafox)*, *Brit. Med. J.* (1953): **1**, 1068-1072
- [392] Aldridge, W.N.; Barnes, J.M.: *Further observations on the neurotoxicity of organophosphorus compounds*, *Biochem. Pharmacol.* (1966): **15**, 541-548
- [393] Aldridge, W.N.; Barnes, J.M.: *Esterases and neurotoxicity of some organophosphorus compounds*, *Biochem. Pharmacol.* (1966): **15**, 549-554
- [394] Thermo Fisher Scientific: *Halt™ Protease Inhibitor Single-Use Cocktail*, Instructions, Rockford 2007
- [395] BD Biosciences: *Protease Inhibitor Cocktail*, Technical Data Sheet, o. O., 2007
- [396] Andersen, R.J.; Glasgow, C.E.; Dunham, C.B.: *Hemolysis as a possible indicator of neurotoxicity induced by organic solvents*, *Environmental Health Perspectives* (1984): **58**, 393-396
- [397] DiStefano, V.; Klahn, J.J.: *Observations on the pharmacology and hemolytic activity of dimethyl sulfoxide*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1965): **7**, 660-666
- [398] Roche Diagnostics: *The Complete Guide for Protease Inhibition*, Mannheim 2006
- [399] Upstate: *Protease Inhibitor Cocktail I*, Temecula o. J.
- [400] MP Biomedicals: *Protease Inhibitor Cocktail Kit*, o. O. u. J.
- [401] Amersham Biosciences: *Protease Inhibitor*, Instructions, Buckinghamshire 2003
- [402] Hooper, N.M.: *Purification of proteases*, in: *Proteolytic Enzymes* (E.E. Sterchi; W. Stöcker; eds.), Springer, Berlin 1999
- [403] Bio-Rad: *Aurum Affi-Gel Blue Mini Kits and Columns*, Instructions, o. O. u. J.
- [404] Agilent Technologies: *Multiple Affinity Removal System*, Product Note, 2006
- [405] Sigma-Aldrich: *ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion Kit*, St. Louis 2005
- [406] Checler, F.; Grassi, J.; Masson, P.; Vincent, J.P.: *Monoclonal antibodies allow precipitation of esteratic but not peptidasic activities associated with butyrylcholinesterase*, *J. Neurochem.* (1990): **55**, 750-755
- [407] Cutler, P.: *Affinity chromatography (chapter 16)*, in: *Methods in Molecular Biology*, vol. 59: *Protein Purification Protocols* (S. Doonan; ed.), Humana Press, Totowa 1996
- [408] GE Healthcare: *HiTrap Protein G HP*, Instructions, Uppsala 2006
- [409] GE Healthcare: *HiTrap Benzamide FF (high sub)*, Instructions, Uppsala 2006
- [410] Harper, S.; Mozdzanowski, J.; Speicher, D.: *Two-dimensional gel electrophoresis*, *Current Protocols in Protein Science* (1998): Unit **10.4**

# **ANHANG**

## 8. Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Strukturformel von Sagopilone. Die Sternchen (*) kennzeichnen die Positionen der $^3\text{H}$ -Markierung. ....	16
<b>Abbildung 2:</b>	Strukturformel von Drospirenon. Die Sternchen (*) kennzeichnen die Positionen der $^3\text{H}$ -Markierung. ....	16
<b>Abbildung 3:</b>	Strukturformel von Methylprednisolonaceponat (MPA). Die Sternchen (*) kennzeichnen die Positionen der $^3\text{H}$ -Markierung. ...	17
<b>Abbildung 4:</b>	Ausschnitt der Strukturformel des Progesteron-Rezeptor-A-selektiven Liganden (PRASL). Das Sternchen (*) kennzeichnet die Position der $^3\text{H}$ -Markierung. ....	18
<b>Abbildung 5:</b>	Zeitabhängiger Abbau von $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid (gemessen als $^{14}\text{C}$ -ATC) durch Rattenserum (—●) bzw. Hundeserum (----○) (Inkubationsbedingungen: siehe 2.2.1) .....	55
<b>Abbildung 6:</b>	Zeitabhängiger Abbau von $^{14}\text{C}$ -NPA durch Rattenserum (—●) bzw. Hundeserum (----○); * $p < 0,05$ (t-Test) (Inkubationsbedingungen: siehe 2.2.1) .....	56
<b>Abbildung 7:</b>	Zeitabhängiger Umsatz von Methyloctanoat (MeOct) durch Rattenserum (—●) bzw. Hundeserum (----○) (Inkubationsbedingungen: siehe 2.2.2) .....	57
<b>Abbildung 8:</b>	Zeitabhängiger Abbau von Sagopilone in Frischserum (— — —◆) bzw. tiefgefrorenem Serum (.....◇) von Ratten; * $p < 0,05$ (gepaarter t-Test) .....	58
<b>Abbildung 9:</b>	Zeitabhängiger Abbau von Drospirenon in Frischserum (— — —◆) bzw. tiefgefrorenem Serum (.....◇) von Ratten; * $p < 0,05$ (gepaarter t-Test) .....	59
<b>Abbildung 10:</b>	Zeitabhängiger Abbau von MPA in Frischserum (— — —◆) bzw. tiefgefrorenem Serum (.....◇) von Ratten; * $p < 0,05$ (gepaarter t-Test) .....	59

- Abbildung 11:** Zeitabhängiger Abbau von PRASL in Frischserum (— — —◆) bzw. tiefgefrorenem Serum (·····◇) von Ratten.....59
- Abbildung 12:** Histogramm der relativen Differenzen der Stoffmengen aus der Inkubation von Frischserum und tiefgefrorenem Serum von Ratten für die vier Wirkstoffe .....61
- Abbildung 13:** Zeitabhängiger Abbau von Drospirenon in Frischserum von Ratten (—●) bzw. Hunden (-----○) .....62
- Abbildung 14:** Zeitabhängiger Abbau von MPA in Frischserum von Ratten (—●) bzw. Hunden (-----○).....62
- Abbildung 15:** IEC-Chromatogramm einer Rattenserum-Probe; linke Ordinate: UV-Absorption [mAU] bei 280 nm (—); rechte Ordinate: Leitfähigkeit [mS/cm] (·····); Abszisse: Elutionsvolumen [mL]; vertikale Linien: Fraktionen (Fr.) mit Nummern .....63
- Abbildung 16:** SEC-Chromatogramm eines IEC-Fraktionspools aus Rattenserum; Achsenbeschriftung und Linien wie in **Abbildung 15**. Eingetragen sind die Elutionsvolumina [mL] zweier Peakmaxima.....64
- Abbildung 17:** Chromatogramm einer Albumin-AC eines SEC-Fraktionspools aus Rattenserum; Achsenbeschriftung und Linien wie in **Abbildung 15** .....65
- Abbildung 18:** Chromatogramm einer PON-AC einer Rattenserum-Probe (UV-Kurve: vergrößerter Ausschnitt; Peaks z. T. manuell abgeschnitten); Achsenbeschriftung und Linien wie in **Abbildung 15**.....66
- Abbildung 19:** Aktivität der Fraktionen einer IEC einer Rattenserum-Probe im kinetischen NPA-Assay.....68
- Abbildung 20:** Gel einer nativen PAGE (oben) und SDS-PAGE (unten) von Fraktionen einer SEC eines IEC-Fraktionspools aus Hundeserum, Fr.: Fraktion, (St.): Proteinstandard (rechts: molare Massen in kDa), Färbung: siehe 2.4.6. Vertikale Balken grenzen einen qualitativ gleichartigen Pool ab. ....69

- Abbildung 21:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für Sagopilone aktiven IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionspools aus Rattenserum; Punkte: maximale Aktivität [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]; Balken: Proteinmasse [ $\mu\text{g}$ ].....70
- Abbildung 22:** Gel einer SDS-PAGE der für Sagopilone aktiven Albumin-AC-Fraktionen (Fr.) 2-5 aus Rattenserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [ $\text{kDa}$ ] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.1 .....71
- Abbildung 23:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für Drospirenon aktiven IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionspools aus Rattenserum; Punkte: maximale Aktivität [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]; Balken: Proteinmasse [ $\mu\text{g}$ ].....72
- Abbildung 24:** Gel einer SDS-PAGE der für Drospirenon aktiven Albumin-AC-Fraktionen (Fr.) 2-5 aus Rattenserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [ $\text{kDa}$ ] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.2.....73
- Abbildung 25:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für MPA aktiven IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionspools aus Rattenserum; Punkte: maximale Aktivität [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]; Balken: Proteinmasse [ $\mu\text{g}$ ].....74
- Abbildung 26:** Gel einer SDS-PAGE der für MPA aktiven Albumin-AC-Fraktionen (Fr.) 2-5 aus Rattenserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [ $\text{kDa}$ ] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.3.....75
- Abbildung 27:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für PRASL aktiven PON-AC-Fraktionspools aus Rattenserum; Punkte: maximale Aktivität [ $\mu\text{mol}/\text{h}$ ]; Balken: Proteinmasse [ $\mu\text{g}$ ].....77
- Abbildung 28:** Gele einer SDS-PAGE der für PRASL aktiven PON-AC-Fraktionen (Fr.) 23-30 und 39-42 aus Rattenserum; mittig: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [ $\text{kDa}$ ] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung

- siehe 3.3.4.4. Der vertikale Balken grenzt einen qualitativ gleichartigen Bereich ab. ....78
- Abbildung 29:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für Drospirenon aktiven IEC-Fraktionspools aus Hundeserum; Punkte: maximale Aktivität [pmol/min]; Balken: Proteinmasse [mg].....79
- Abbildung 30:** Gele einer SDS-PAGE der für Drospirenon aktiven IEC-Fraktionen (Fr.) 33-36 und 63-71 aus Hundeserum; mittig: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.5 .....80
- Abbildung 31:** Maximale Aktivität und Proteinmasse der nach 2.4.7 für MPA aktiven IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionspools aus Hundeserum; rote Punkte: maximale Aktivität [pmol/h]; graue Balken: Proteinmasse [µg] .....82
- Abbildung 32:** Gel einer SDS-PAGE der für MPA aktiven Albumin-AC-Fraktionen (Fr.) 24-25 aus Hundeserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: Erläuterung siehe 3.3.4.6 .....82
- Abbildung 33:** Michaelis-Menten-Diagramm für Sagopilone .....84
- Abbildung 34:** Michaelis-Menten-Diagramm für Drospirenon .....84
- Abbildung 35:** Michaelis-Menten-Diagramm für MPA .....85
- Abbildung 36:** Michaelis-Menten-Diagramm für PRASL .....85
- Abbildung 37:** Gel einer SDS-PAGE der für Sagopilone nach 2.4.7 aktiven Albumin-AC-Fraktionen (Fr.) 2-5 sowie 25 und 27 und der für PRASL aktiven PON-AC-Fraktion 25 aus Rattenserum; links: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Bedeutung der Nummern (1 bis 9) und Pfeile: siehe Erläuterung (3.4.1.1). Der vertikale Balken grenzt die Albumin-AC-Fraktionen (links im Bild) von der PON-AC-Fraktion (rechts im Bild) ab.....87
- Abbildung 38:** Western Blot eines Gels der SDS-PAGE der PON-AC-Fraktionen 19-22 (a), 23-30 (b), 39-42 (c), 43-45 (d) und 53-59 (e) aus

---

Rattenserum; links: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeile: siehe Erläuterung 3.4.1.2.....88

**Abbildung 39:** Gel einer SDS-PAGE der für MPA aktiven SEC-Fractionen (Fr.) 17-23 aus Hundeserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe siehe 2.4.6.1); Pfeil: Erläuterung siehe 3.4.2.1 .....89

**Abbildung 40:** Western Blot eines Gels der SDS-PAGE einer Hundeserum-Probe (a), der PON-AC-Fractionen 19-22 (b), 23-30 (c), 39-42 (d), 43-45 (e) und 52-59 (f) aus Hundeserum; rechts: Proteinstandard (St.) mit molaren Massen [kDa] (siehe 2.4.6.1); Pfeil: siehe Erläuterung 3.4.2.2.....90

## 8.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Inkubations- und HPLC-Bedingungen für die Untersuchung des Vergleichs der Aktivität von Frischserum und tiefgefrorenem Serum von Ratten mittels der vier Wirkstoffe .....28
<b>Tabelle 2:</b>	Chromatografiebedingungen für die vier Verfahren zur Proteintrennung .....31
<b>Tabelle 3:</b>	Inkubationsbedingungen für die Bestimmung der $K_m$ - und $V_{max}$ -Werte der isolierten Fraktionen aus Rattenserum für Sagopilone, Drospirenon, MPA und von unfraktioniertem Rattenserum für PRASL. Sternchen (*, **, ***) verweisen auf unterschiedliche Inkubationszeitpunkte (siehe letzte Tabellenzeile).....39
<b>Tabelle 4:</b>	Relevante Eigenschaften von Inhibitoren, die im Inhibitorscreening (2.6.2) eingesetzt wurden. Sternchen (*, **, ***) und Fußnoten: siehe Anmerkungen am Tabellenende. ....45
<b>Tabelle 5:</b>	Übersicht (Probenplan) über das Inhibitorscreening der Konzentrate aus der Fraktionierung von Rattenserum und des unfraktionierten Ratten- und Hundeserums für die vier Wirkstoffe (✓: Inkubation durchgeführt; n.d.: nicht durchgeführt). Sternchen (*, **, ***) : siehe Anmerkungen am Tabellenende. ....49
<b>Tabelle 6:</b>	Initialgeschwindigkeiten ( $v_0$ ), Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_{ATC}$ bzw. $k_{NPA}$ ) und Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) für den Abbau von $^{14}C$ -ATC-Iodid und $^{14}C$ -NPA durch Ratten- und Hundeserum .....57
<b>Tabelle 7:</b>	Initialgeschwindigkeiten ( $v_0$ ), Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) und Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ , berechnet aus $k$ ) des Abbaus der vier Wirkstoffe in Frischserum und tiefgefrorenem Serum von Ratten (Inkubationsbedingungen: siehe 2.3.1) .....60
<b>Tabelle 8:</b>	Initialgeschwindigkeiten ( $v_0$ ), Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) und Halbwertszeiten

	( $t_{1/2}$ ) des Abbaus der vier Wirkstoffe in Frischserum von Ratten und Hunden .....	62
<b>Tabelle 9:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für Sagopilone aktive IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionen aus Rattenserum .....	70
<b>Tabelle 10:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für Drospirenon aktive IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionen aus Rattenserum .....	72
<b>Tabelle 11:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für Drospirenon aktive PON-AC-Fraktionen aus Rattenserum.....	74
<b>Tabelle 12:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für MPA aktive IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionen aus Rattenserum.....	75
<b>Tabelle 13:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für MPA aktive PON-AC-Fraktionen aus Rattenserum .....	76
<b>Tabelle 14:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für PRASL aktive PON-AC-Fraktionen aus Rattenserum.....	78
<b>Tabelle 15:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für Drospirenon aktive IEC-Fraktionen aus Hundeserum.....	79
<b>Tabelle 16:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für Drospirenon aktive PON-AC-Fraktionen aus Hundeserum.....	81
<b>Tabelle 17:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für MPA aktive IEC-, SEC- und Albumin-AC-Fraktionen aus Hundeserum.....	83
<b>Tabelle 18:</b>	Überblick über nach 2.4.7 für MPA aktive PON-AC-Fraktionen aus Hundeserum .....	83
<b>Tabelle 19:</b>	$K_m$ -und $V_{max}$ -Werte für Sagopilone, Drospirenon und MPA in den jeweils nach 2.4.7 aktiven Albumin-AC-Fraktionspools aus Rattenserum bzw. für PRASL in unfraktionierten Rattenserum ...	86
<b>Tabelle 20:</b>	Durch MALDI-TOF-MS identifizierte Proteine aus der SDS-PAGE in <b>Abbildung 37</b> .....	87

---

<b>Tabelle 21:</b>	Inhibitionswerte [%] (bezogen die jeweilige Positivkontrolle nach 2.6.2) aus dem Inhibitorscreening in konzentrierten Albumin-AC-Pools aus Rattenserum für Sagopilone, Drospirenon und MPA. Inhibitionswerte unter 50 % wurden als „<50“, fehlende Werte als „n.d.“ (Inkubation nicht durchgeführt) angegeben. ....91
<b>Tabelle 22:</b>	Inhibitionswerte [%] (bezogen die jeweilige Positivkontrolle nach 2.6.2) aus dem Inhibitorscreening in Rattenserum für Sagopilone, Drospirenon, MPA und PRASL. Inhibitionswerte unter 50 % wurden als „<50“, fehlende Werte als „n.d.“ (Inkubation nicht durchgeführt) angegeben.....93
<b>Tabelle 23:</b>	Inhibitionswerte [%] (bezogen die jeweilige Positivkontrolle nach 2.6.2) aus dem Inhibitorscreening in Hundeserum für Drospirenon und MPA. Inhibitionswerte unter 50 % wurden als „<50“ angegeben.....95
<b>Tabelle 24:</b>	Übersicht (alphabetisch und nach Wirksamkeit sortiert) über geeignete, individuell verwendete Inhibitoren mit ihren minimal empfohlenen Konzentrationen zur Stabilisierung der vier Wirkstoffe in Ratten- und Hundeserum (vgl. <b>Tabelle 22</b> und <b>Tabelle 23</b> ). Durch <i>hoch</i> wirksame Inhibitoren wurde eine >90 %ige Inhibition des Abbaus erreicht; für <i>weniger</i> wirksame Inhibitoren lag die Inhibition zwischen 50 und 90 %. Sagopilone und PRASL wurden in Hundeserum nicht abgebaut. Für MPA wurden keine hochwirksamen Inhibitoren in Hundeserum gefunden. ....144

### **8.3 Kurzlebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## 8.4 Danksagung

Mein größter und besonderer Dank seitens Bayer Schering Pharma gilt Herrn Dr. Joachim Höchel für die sehr hilfsbereite, in jeder Hinsicht überaus kompetente und stets verfügbare Betreuung und wegweisende Diskussionen.

Gleichfalls sei Frau Dr. Hille Gieschen herzlich und nachdrücklich gedankt für die Möglichkeit, die Promotionstätigkeit in der Abteilung Nonclinical Pharmacokinetics ausgeführt zu haben, und für die großzügige finanzielle Unterstützung in Hinblick auf Materialien und Geräte sowie Reisen zu wissenschaftlichen Tagungen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Hubert Borchert vom Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin gilt mein großer Dank für die weitreichende Betreuung der Arbeit von universitärer Seite und für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung von wissenschaftlichen Publikationen.

Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig sei für die Tätigkeit als einer der Gutachter großzügig gedankt.

Herrn Dr. Ingo Siebenbrodt danke ich für erste Hinweise zum Aufbau der Dissertation sowie für die Mitwirkung bei der Organisation des Doktorandenseminars.

Ich danke der gesamten Abteilung Nonclinical Pharmacokinetics der Bayer Schering Pharma AG für ihre Hilfsbereitschaft in methodischen, gerätetechnischen und raumorganisatorischen Fragen und insbesondere Frau Sabine Backhus für ihre Unterstützung bei der Radio-HPLC und Substanzbeschaffung.

Frau Birgit Albrecht, Herrn Dr. Karsten Denner sowie Herrn Detlev Obst und Frau Dr. Antje Rottmann aus der Abteilung Drug Metabolism danke ich sehr für die Möglichkeit, wichtige Untersuchungen zur Proteinanalytik bzw. zum HPLC-Esterase-Assay in ihren Räumlichkeiten und mit ihren Geräten durchgeführt zu haben. Herrn Dr. Denner sei zusätzlich gedankt für denkanstoßende Diskussionen zur Enzymkinetik und –inhibition.

Der Abteilung Isotope Chemistry, und hier vor allem Herrn Dr. Franz Maier, danke ich für die personelle Unterstützung bei der Synthese eines Zwischenprodukts für  $^{14}\text{C}$ -ATC-Iodid. Herrn Dr. Maier sei auch gedankt für kritische Bemerkungen und weiterführende Diskussionen hinsichtlich nomenklatorischer Fragen.

Herrn Norbert Otto (Abteilung Protein Supply) und Frau Dr. Inke Bahr (Abteilung Target Research) danke ich sehr für ihre großzügige materielle und persönliche Unterstützung und Beratung bei der Proteinisolierung, –identifizierung und –analytik. Schließlich danke ich Herrn Tino Lisewski und Herrn Dr. Thomas Backensfeld (Abteilung Analytical Development) für die Möglichkeit, die pH-Stat-Titration freundlicherweise bei ihnen ausgeführt zu haben.

Über allem danke ich selbstverständlich meiner Familie für ihre stete Unterstützung und ihr großes Verständnis.

## 8.5 Eidesstattliche Erklärung

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel  
„Isolierung, Identifizierung und Inhibition von Esterasen aus Ratten- und Hundeserum  
zur Stabilisierung von Serumproben *ex vivo* im Rahmen der präklinischen  
Arzneimittelentwicklung“  
selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Berlin, 26.11.2008

.....

Matthias Koitka

## 8.6 Anhang zu Materialien und Methoden

### 8.6.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren, falls nicht anders angegeben, von analytischer Qualität (*analytical grade*) oder höher. Im Folgenden sind die Lieferanten bzw. Hersteller kursiv geschrieben.

#### Abbott, Wiesbaden (Deutschland)

Forene® (Wirkstoff: Isofluran)

#### ABCR, Karlsruhe (Deutschland)

S-Acetylthiocholine iodide, 98 %

#### Acros Organics, Geel (Belgien)

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, 98 %

Potassium phosphate tribasic monohydrate

#### Alfa-Aesar, Karlsruhe (Deutschland)

4-Nitrophenol, 99 %

4-Nitrophenyl acetate, 99 %

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 99 %

Heptafluorobutyric acid, 99 %

Methyl caprylate, 99 %

S-Acetylthiocholine iodide, 98 %

Sodium deoxycholate monohydrate, 98 %

Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, 99 %

#### Bayer Schering Pharma AG, Berlin (Deutschland)

21-Acetoxy-11 $\beta$ -hydroxy-6 $\alpha$ -methyl-17-propionyloxy-1,4-[1,2-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]pregnadien-3,20-dion  
(Methylprednisolonaceponat, MPA)

6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dimethylen-3-oxo-17 $\alpha$ -pregna-4-en-21,17-[20,21-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]carbolenon (Drospirenon)

(1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-Dihydroxy-8,8,12,16-tetramethyl-3-(2-methyl-1,3-benzothiazol-5-yl)-10-([2,3-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]prop-2-enyl)-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecan-5,9-dion (Sagopilone)

Biomol, Hamburg (Deutschland)

E-64 (*N*-(*trans*-Epoxy succinyl)-L-leucin-4-guanidinobutylamid)

Pefabloc® SC (4-(2-Aminoethyl)benzonsulfonylfluorid-Hydrochlorid)

Phosphoramidon, Dinatriumsalz (*N*-( $\alpha$ -Rhamnopyranosyloxyhydroxyphosphinyl)-L-leucyl-L-tryptophan, Dinatriumsalz)

Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)

Gel Filtration Standard

BlyChem, Billingham (Großbritannien)

S-Acetylthio[*N*-methyl-<sup>14</sup>C]choline iodide (*N*-2-(*S*-Acetylthio)ethyl-*N*-[<sup>14</sup>C]-methyl-*N,N*-dimethylammonium iodide)

GE Healthcare, Uppsala (Schweden)

DEAE Sephacel™

HiTrap™ Blue HP Column, 5 mL

Sephacryl™ S-300 HR

Hartmann Analytic, Braunschweig (Deutschland)

*p*-Nitro[*U*-ring-<sup>14</sup>C]phenyl acetate

Invitrogen, Carlsbad (USA)

NativeMark™ Unstained Protein Standard

Novex® 8-16 % Tris-Glycine Gel 1.0 mm x 12 well

Novex® Native Tris-Glycine Sample Buffer (2X)

Novex® Stainer A, Colloidal Blue Stain Kit

Novex® Stainer B, Colloidal Blue Stain Kit

Novex® Tris-Glycine Native Running Buffer (10X)

NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel 1.0 mm x 12 well

NuPAGE® Antioxidant

NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)

NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)

NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (1X)

LaserBio Labs, Sophia-Antipolis (Frankreich)

$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA) matrix kit

Merck, Darmstadt (Deutschland)

Acetonitril, *gradient grade* für die Flüssigkeitschromatographie

Ameisensäure

Calciumchlorid-Dihydrat

Essigsäure (Eisessig), 100 %

Ethanol, absolut

Glycerin, 87 %

Kaliumhydrogenphthalat (Urtitersubstanz), 99,97 %

Kaliumiodid

Kaliumnitrat

LiChrosolv, Wasser für die Chromatographie

Methanol z.A.

Methanol, *gradient grade* für die Flüssigkeitschromatographie

Natriumchlorid  
Natriumhydroxid, Plätzchen  
Trifluoressigsäure z.A.  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

MP Biomedicals, Illkirch (Frankreich)

Aprotinin

Novagen®, Darmstadt (Deutschland)

BCA Protein Assay Kit: BCA Solution, 4 % Cupric Sulfate, BSA Standard

Pentapharm, Basel (Schweiz)

Pefabloc® SC (Pefa-3055)

PerkinElmer, Shelton (USA)

Ultima-Flo M

Promega, Mannheim (Deutschland)

Trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin)

Riedel-de Haën, Seelze (Deutschland)

Ammoniumchlorid  
Ammoniumformiat  
Ammoniak-Lösung, 33 %  
Perchlorsäure, 70 %  
*ortho*-Phosphorsäure, 85 %

Sigma-Aldrich, Steinheim bzw. Seelze (Deutschland)

$\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor ( $\alpha_1$ -Antitrypsin)  
4-Amidinophenylmethanesulfonyl fluoride hydrochloride  
Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (electric eel)  
Albumin aus Rinderserum, Fraktion V  
Aldrithiol™-2 (2,2'-Dithiopyridin)  
Ammoniumhydrogencarbonat, ultra pure  
Anti-Paraoxonase 1 (PON1) antibody, produced in rabbit  
Anti-Rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, antibody developed in goat  
Benzamidine hydrochloride hydrate, 98 %  
Bis(*p*-nitrophenyl) phosphate sodium salt  
Blue Dextran Molecular Weight 2,000,000  
Buffer pH 2.00  
Buffer solution pH 4.00 with fungicide  
Buffer solution pH 7.00 with fungicide  
Buffer solution pH 9.00 (20°C)  
Butyrylcholinesterase from Horse Serum  
Copper(II) sulfate, 99 %  
DL-Dithiothreitol, 99 %  
Esterase from Porcine Liver, Crude  
Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate, 99 % (EDTA)  
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure, 98 %  
Glyoxal solution, approx. 40 % in water  
Kaliumphosphat, tribasisch, Monohydrat, 94 %

Methylglyoxal solution  
Metoclopramide hydrochloride  
*N*- $\alpha$ -*p*-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride  
*N*- $\alpha$ -*p*-Tosyl-L-lysine chloromethylketone hydrochloride  
*N*-Bromsuccinimid, 99 %  
*p*-Aminobenzamidindihydrochlorid, 98 %  
Phosphate buffered saline, tablets  
Premixed BCIP/NBT Solution  
Sodium fluoride, 99 %  
Sodium hydroxide 0.05 mol/L, volumetric solution  
Tetrabutylammoniumbromid, 99 %  
Trifluoroacetic acid (for protein sequence analysis)  
Tris Buffered Saline, with Tween® 20, pH 8.0, powder  
Triton® X-100  
Trypsin inhibitor, Type I-S, from Soy Bean  
Zinksulfat-Heptahydrat, 99 %

Thermo Scientific, Rockford (USA)

BCA™ Protein Assay Kit: BCA™ Protein Assay Reagent A, BCA™ Protein Assay Reagent B, Albumin Standard  
Micro BCA™ Protein Assay Kit: Micro BCA™ Reagent A (MA), Micro BCA™ Reagent B (MB), Micro BCA™ Reagent C (MC), Albumin Standard

## 8.6.2 Wichtige Geräte und sonstiges Zubehör

Im Folgenden sind die Lieferanten bzw. Hersteller in Klammern angegeben.

Allgemeine Laborgeräte

Einkanal-Pipetten: Eppendorf Reference (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)  
Heizbad: Bandelin Sonorex RK 510 Transistor (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland)  
Mehrkanal-Pipetten: Eppendorf Research pro (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)  
Nunc Cryotube, verschiedene Größen (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark)  
Serum-Monovetten: S-Monovette® Z (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)  
Stoppuhr (Oregon Scientific, Tualatin, USA)  
Thermostat (zum Wasserbad): Haake D8 (Haake, Berlin, Deutschland)  
Tischzentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)  
*Vortexer*: Heidolph REAX 2000 (Heidolph, Kelheim, Deutschland)  
Wasserbad: Haake G (Haake, Berlin, Deutschland)

BCA-Assay-Technik

Nunc F96 MicroWell Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)  
Schüttler / Inkubator: Titramax 1000 / Inkubator 1000 (Heidolph-Instruments, Schwabach, Deutschland)  
Software: Magellan 5.03 (Tecan, Grödig, Österreich)  
Tecan Genios Basic (Tecan, Grödig, Österreich)  
TopSeal-A (96-Well Microplates, Microplates Press-On Adhesive Sealing Film) (PerkinElmer, Boston, USA)

Berechnung und Auswertung von enzymkinetischen Daten

SigmaPlot, Version 10.0; SigmaStat, Version 3.5 und Enzyme Kinetics Modul, Version 1.3 (Systat Software, Richmond, USA)

Bidestilliertes Wasser für alle Verwendungszwecke (außer HPLC)

Herstellung: Milli-Q UF Plus Ultrafiltrationsanlage (Millipore, Eschborn, Deutschland)

Die pH-Stat-Titration

614 Impulsomat (Metrohm, Herisau, Schweiz)

pH-Meter 761 Calimatic (Knick, Berlin, Deutschland)

pH-Stat-Titration: 665 Dosimat (Metrohm, Herisau, Schweiz)

Rührstab: Polytron PT 1200C (Kinematica, Littau/Luzern, Schweiz)

Software (Titereinstellung): TiNet 2.4 (Metrohm, Herisau, Schweiz)

Titereinstellung: 716 DMS Titrino (Metrohm, Herisau, Schweiz)

HPLC-Anlage

Gradientenpumpe: P680A HPG-2 (Dionex Softron, Germering, Deutschland)

Autosampler: ASI-100T (Dionex Softron, Germering, Deutschland)

Säulenofen: TCC-100 MSV (Dionex Softron, Germering, Deutschland)

UV-VIS-*on-line*-Detektor: UVD 170U (Dionex Softron, Germering, Deutschland)

Radiochemischer *on-line* Detektor: Radiomatic 525TR mit einer 250- $\mu$ L- bzw. 500- $\mu$ L-Flusszelle (Packard Instrument Co., Meriden, USA)

Software: Chromeleon 6.50 (Dionex Softron, Germering, Deutschland)

HPLC-Säulen

Hypersil ODS 120 Å, 3  $\mu$ m, 125 x 4.6 mm (VDS Optilab, Berlin, Deutschland)

HyPURITY ADVANCE, 125 x 4.6 mm, 3  $\mu$ m (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Kromasil 100 C18, 5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm (VDS Optilab, Berlin, Deutschland)

Luna C18 (2) 100 Å, 3  $\mu$ m, 100 x 2.0 mm (Phenomenex, Torrance, USA)

Spherisorb ODS-2, 3  $\mu$ m, 125 x 4.6 mm (VDS Optilab, Berlin, Deutschland)

Kinetischer Assay mittels p-Nitrophenylacetat

Nunc F96 MicroWell Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

SpectraMax 190 (Microplate Spectrophotometer) (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)

Software: SoftMax® Pro 4.7 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)

LC-ESI-MS/MS-Technik

ESI-MS/MS: 4000 Q TRAP® LC/MS/MS System (Linear Ion Trap) (Applied Biosystems, Foster City, USA)

LC-System: Eksigent NanoLC-1Dplus (Eksigent Technologies, Dublin, USA)

LC-Trennung: Acclaim® PepMap™ column, stationary phase: C18 (15 cm, 75  $\mu$ m i. d., particle size: 5  $\mu$ m, pore size: 300 Å) (Dionex, Sunnyvale, USA) mit C18-Trap-Säule (Agilent, Waldbronn, Deutschland)

MALDI-TOF/TOF-MS-Technik

4700 Proteomics Analyzer (MALDI-TOF/TOF) (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Software: Mascot (Matrix Science, London, Großbritannien)

Stahlplatten zur Messung

PAGE-Technik

Amicon Ultrafree-MC, 5,000 NMWL Filter Unit, Low Binding Regenerated Cellulose (Millipore, Bedford, USA)

Gel Saver I – Tips (Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland)

Geltrockner: 2003 Slab Gel Dryer (LKB Produkter, Bromma, Schweden)

Kühlzentrifuge: Biofuge fresco Heraeus (Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland)

Schüttler: IKA HS 250 basic (IKA, Staufen, Deutschland)

Xcell SureLock™ Novex Mini-Cell (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Proteintrennungstechnik

Proteintrennungsanlage: ÄKTAprime plus (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

Amicon Ultra-15, Ultra-3K, Regenerated Cellulose, 3,000 MWCO (Millipore, Cork, Irland)

Beckman  $\Phi$  45 pH Meter (Beckman Instruments, Fullerton, USA)

Zentrifuge: Heraeus Minifuge RF (Thermo Electron, Langenselbold, Deutschland)

Leersäulen: XK 26/70 und XK 26/20 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

Schleicher & Schuell, Membrane Filters, Cellulose Nitrate, 0.2  $\mu$ m, 90 mm  $\varnothing$  (Whatman, Maidstone, England)

Software: PrimeView (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

Ultraschallbad: Bandelin Sonorex Super RK 510H (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland)

Vacuubrand Membranpumpe ME 2 (Vacuubrand, Wertheim, Deutschland)

Vacuubrand Vakuum-Controller CVC 24 (Vacuubrand, Wertheim, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen 15 mL bzw. 50 mL (TPP, Trasadingen, Schweiz)

Tryptischer in-Gel-Verdau in Mikrotiterplatten

PCR Plates pierced 96 well (Genomic Solutions, Ann Arbor, USA)

Adhesive PCR Foil Seal (ABGene, Epsom, Großbritannien)

96 PCR soft tubes (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland)

PP-Masterblock, 0.5 mL (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)

Tryptischer in-Gel-Verdau in PCR-Tubes

Inkubator: Heraeus B290 (Thermo Electron, Langenselbold, Deutschland)

Polymerase Chain Reaction (PCR) Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Vakuumzentrifuge: Savant SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

ZipTip $_{\mu}$ -C18 Pipette Tip (Millipore, Billerica, USA)

Western-Blot-Technik

iBlot™ Gel Transfer Device (Invitrogen, Carlsbad, USA)

iBlot™ Gel Transfer Stacks, Regular (Transfer Membran: Nitrocellulose) (Invitrogen, Carlsbad, USA)