

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Maria Janzer, M.Sc.

aus Kurgan-Tjube, Tadschikistan

Tag der mündlichen Prüfung:

Präklinische Untersuchungen der renoprotektiven Wirksamkeit nierenspezifischer Wirkstoff-Konjugate

Synthese, Pharmakokinetik und Wirksamkeit

Gutachter: Prof. Dr. Walter Mier

Prof. Dr. Gert Fricker

Für meine Eltern

Summary

For over 35 years, the highly potent cytostatic agent cisplatin plays a central role in the treatment of different solid tumors. With an overall cure rate of about 90%, and nearly 100% for early stage diseases, it's especially successful for the treatment of testicular cancer. However, the application of cisplatin is limited by its strong nephrotoxic side effects. This has a substantial impact on the treatment success. So far, conventional supportive measures remain unsatisfied, in particular when high doses or cumulative doses of cisplatin are applied. Promising results of different protective agents and strategies against cisplatin nephrotoxicity are reported in many publications. However, only limited information is available concerning possible interferences of the tested drugs with the antitumor activity of cisplatin. Furthermore, besides amifostine none of these agents reached clinical use yet.

The purpose of this work was to protect healthy kidney cells from cisplatin-induced nephrotoxicity, using the kidney-specific peptide $(KKEEE)_3K-NH_2$ as transporter of protective agents. In comparison to systemic drug applications, the developed drug targeting approach promises an improved dose-response relationship and reduced systemic effects. Both possibly increases the efficacy of cisplatin chemotherapies.

α -Lipoic acid, silybin, carvedilol and apocynin already showed renoprotective effects against cisplatin-induced nephrotoxicity in various publications. Consequently, these compounds were selected for conjugation to the kidney-specific carrier. Depending on their functional groups, different linker strategies were used. Amide, ester and carbamate linkages showed sufficient stability in plasma. The pharmacokinetic properties of the conjugates were estimated *in vivo* with radiolabeled drugs and sintigraphic distribution studies revealed their exclusive kidney-specific accumulation.

The drugs and their corresponding conjugates showed no significant ameliorating effect on kidney function. Plasma creatinine and urea were used as parameters to evaluate the renal damages. A significant adverse effect on kidney function was determined in the group, which was treated with the lipoic acid conjugate. This effect was only detected for the conjugated form. Interestingly, the lipoic acid conjugate treated group showed an up to 43% increased platinum content in the kidneys. *In vitro* experiments revealed that under physiological conditions a trapping of cisplatin by the lipoic acid conjugate via its thiol groups occurs. This led to an increased renal uptake of cisplatin, probably promoted by simultaneous administration of cisplatin and lipoic acid conjugate.

The high variances within all animal groups receiving cisplatin led to statistically non-significant results. However, in comparison to the untreated groups, all treated animals showed generally lower

mean values in all parameters considered. Surprisingly, the unloaded carrier (KKEEE)₃K-NH₂ also had a protective effect on kidney function, together with low kidney platinum concentrations. In general, a correlation between platinum concentration and kidney deterioration was identified in all groups, but no antioxidative efficacy to protect the kidneys could be observed. The animals showed strong individual sensitivity to cisplatin. This results in high variances, in particular in the cisplatin control group. To obtain more conclusive results, larger group sizes should be used for further examinations.

It can be summarized that the potential nephroprotective drugs and their conjugates did not show the expected positive effects. Other drugs, with other modes of action and without direct interaction to cisplatin, and optimized dosing schemes could offer new opportunities. Therefore, kidney-specific drug targeting via the carrier (KKEEE)₃K-NH₂ is still an attractive method to increase protective efficacy of drugs and decrease adverse systemic side effects.

Zusammenfassung

Das hochpotente Zytostatikum Cisplatin spielt seit über 35 Jahren eine zentrale Rolle in der Behandlung unterschiedlicher solider Tumore. Bei der Therapie von Hodenkrebs führt es zu Heilungsraten von über 90 % und sogar nahezu 100 % im frühen Stadium. Die starke nephrotoxische Wirkung Cisplatin ist jedoch der dosislimitierende Faktor und hat damit Einfluss auf den Behandlungserfolg der Chemotherapie. Konventionelle Supportivmaßnahmen zur Senkung der Nephrotoxizität Cisplatin sind bis dato unbefriedigend. Dies ist insbesondere bei der Verwendung höherer Dosen sowie bei kumulativer Gabe des Zytostatikums der Fall. Zahlreiche präklinische Studien konnten bereits vielversprechende renoprotektive Ergebnisse mit unterschiedlichen Wirkstoffen und Strategien erzielen. Jedoch bestehen Bedenken darüber, dass die Wirkstoffe durch ihre systemische Verteilung im Organismus eine Einschränkung der anti-neoplastischen Wirkung von Cisplatin zur Folge haben. Zudem stehen den renoprotektiven Eigenschaften vieler Wirkstoffe teilweise auch unerwünschte Wirkungen gegenüber. Nur wenige dieser Ansätze wurden deshalb in klinischen Studien weiterverfolgt und bis heute wird lediglich Amifostin im klinischen Alltag verwendet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch den nierenspezifischen Transport protektiver Wirkstoffe gesunde Zellen vor den zytotoxischen Eigenschaften Cisplatin zu schützen. Durch das *Targeting* sollte im Vergleich zu den freien Wirkstoffen eine verbesserte Dosis-Wirkungs-Beziehung erzielt werden und die durch die unkontrollierte systemische Verteilung der Wirkstoffe resultierenden adversen Effekte vermieden werden. Als nierenspezifischer Carrier diente dabei das Peptid (KKEEE)₃K-NH₂.

Eine Auswahl literaturbekannter Antioxidantien (α -Liponsäure, Carvedilol, Silybin und Apocynin), für die bereits eine protektive Wirkung im nephrotoxischen Tiermodell gezeigt werden konnten, wurde für die Konjugation an den Carrier ausgewählt. Je nach Wirkstoff wurden unterschiedliche Verknüpfungsstrategien verwendet. Amid-, Ester- und Carbamatverbindungen zeigten bei den Konjugaten ausreichend hohe Plasmastabilitäten, um ein Wirkstoff-*Targeting* in die Nieren zu ermöglichen. Über eine Radiomarkierung der Wirkstoffe mittels ¹²⁵Iod konnte die Pharmakokinetik der Konjugate *in vivo* untersucht werden. Szintigraphische Untersuchungen bestätigten bei allen Wirkstoffen nach deren Konjugation an den Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ eine exklusive nierenspezifische Anreicherung.

Weder die freien Wirkstoffe, noch die Konjugate konnten in dem verwendeten Tiermodell, im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, signifikante Verbesserungen der Nierenfunktionsparameter Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff erzielen. Signifikante Abweichungen – allerdings in Richtung höherer Werte – wies lediglich die Liponsäure-Konjugat-Gruppe auf, was einer verstärkten Nephrotoxizität entspricht. Mit der in dieser Versuchsgruppe erhöhten Schädigung der Nieren korrelieren die im Vergleich zur unbehandelten Cisplatin-Gruppe um ca. 43 % höheren renalen Platinkonzentrationen.

In-vitro-Untersuchungen bestätigten, dass unter physiologischen Bedingungen eine Anbindung Cisplatin an die Thiole der Liponsäure stattfindet, die bei dem Konjugat zu einer erhöhten Aufnahme des Zytostatikums in den Nieren führt. Zwischen den freien Wirkstoffen und deren Konjugate konnten aufgrund der hohen Varianzen innerhalb der Gruppen ebenso keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, sodass in diesem Fall keine Aussage über einen *Targeting*-Effekt möglich ist. Tendenziell zeigten jedoch alle behandelten Gruppen niedrigere Mittelwerte im Vergleich zur unbehandelten Gruppe in allen ermittelten Parametern. Überraschenderweise wies der freie Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ einen protektiven Effekt der Nierenfunktionsparameter auf und zeigte gleichzeitig einen Einfluss auf die Cisplatin-Exkretion, da vergleichsweise niedrige Platinkonzentrationen in den Nieren gemessen wurden. Grundsätzlich ist eine Korrelation zwischen der Cisplatin-Exkretion und den Nierenfunktionsparametern in allen Gruppen zu erkennen. Ein signifikanter nephroprotektiver Effekt, der den antioxidativen Eigenschaften der Wirkstoffe zugeschrieben werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt.

Da die Tiere unterschiedlich stark auf die Cisplatingabe reagierten, sollten in Zukunft größere Tierzahlen pro Gruppe verwendet werden, um die Varianzen zu senken und damit aussagekräftigere Ergebnisse zu generieren. Schlussfolgernd kann zusammengefasst werden, dass Liponsäure bei systemischer Gabe tendenziell Cisplatin binden und somit die Effektivität des Zytostatikums reduzieren kann. Das nierenspezifische Wirkstoff-*Targeting* mit Hilfe des Carriers (KKEEE)₃K-NH₂ stellt nach wie vor eine attraktive Methode dar, um die Effektivität der protektiven Wirkung zu erhöhen und Nebenwirkungen der systemischen Gabe von Wirkstoffen zu verhindern. Es eröffnet dabei neue Behandlungsmöglichkeiten und verbessert potenziell den Behandlungserfolg einer Cisplatin-basierten Chemotherapie. Die Applikationszeitpunkte sowie die Dosisfindung spielen bei der Reduzierung der Nephrotoxizität von Cisplatin eine bedeutende Rolle und sollten im Fokus fortlaufender Forschungsarbeiten stehen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Renales <i>Targeting</i>	1
1.2	Proximale Tubuluszellen als Zielgewebe	1
1.3	Carriersysteme	3
1.3.1	(KKEEE) ₃ K als hochselektiver nierenspezifischer Carrier	5
1.3.2	Aufnahmemechanismen von peptidischen Carriern in die proximalen Tubuluszellen	7
1.4	Peptidsynthese.....	11
1.4.1	Festphasenpeptidsynthese	11
1.5	Peptid-Wirkstoff-Konjugation	14
1.5.1	Konjugationsstrategien und Linker-Design	15
1.6	Cisplatin-Therapie	22
1.6.1	Nierenschädigung als dosislimitierender Faktor	23
1.6.2	Präventions-Behandlungen/Aktuelle klinische Praxis	27
2	Aufgabenstellung.....	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Untersuchung des Aufnahmemechanismus von (KKEEE) ₃ K-NH ₂	40
3.2	Einfluss von Pegylierung auf die Pharmakokinetik von (KKEEE) ₃ K-NH ₂	42
3.3	(KKEEE) ₃ K-NH ₂ als peptoidische Struktur NTyr(NLys-NLys-NGlu-NGlu-NGlu) ₂ NLys-NH ₂	43
3.4	Einfluss unterschiedlicher parenteraler Applikationsrouten auf Pharmakokinetik von (KKEEE) ₃ K-NH ₂	45
3.5	Synthese und Pharmakokinetik potentieller Wirkstoff-Carrier-Konjugate zur supportiven Behandlung cisplatininduzierter Nierenschädigungen.....	47

3.5.1	Liponsäure-Konjugat	47
3.5.2	Carvedilol-Konjugat	56
3.5.3	Silybin-Konjugat	61
3.5.4	Apocynin-Konjugat	67
3.6	Proof of concept „NephroGuard“	71
3.6.1	Cisplatin-Dosisfindung.....	71
3.6.2	Studiendesign (24-Stunden-Modell)	74
3.6.3	Studiendesign (7-Tage-Modell)	79
3.6.4	<i>In-vitro</i> -Studie über Cisplatin-Wirkstoff-Metabolisierung.....	91
4	Diskussion.....	94
4.1	Aufnahmemechanismus von (KKEEE) ₃ K-NH ₂ (1).....	94
4.2	Erhöhung der metabolischen Stabilität von (KKEEE) ₃ K-NH ₂ (1) durch Pegylierung und Synthese eines peptoidischen Mimetikums.....	95
4.3	Einfluss unterschiedlicher parenteraler Applikationsrouten auf Pharmakokinetik von (KKEEE) ₃ K-NH ₂ (1)	97
4.4	Plasmastabilität der untersuchten Wirkstoff-Konjugate.....	99
4.5	Pharmakokinetik der untersuchten Wirkstoff-Konjugate	102
4.6	Proof of concept „NephroGuard“	106
4.6.1	Cisplatin-Dosisfindung.....	106
4.6.2	24-Stunden-Modell	108
4.6.3	7-Tage-Modell	110
4.6.4	Langfristige Alterationen des Nierengewebes	115
5	Zusammenfassung und Ausblick	116
6	Experimenteller Teil.....	118
6.1	Methoden.....	118

6.1.1	Festphasenpeptidsynthese	118
6.1.2	Peptidsynthese.....	120
6.1.3	Kaisertest.....	121
6.1.4	Radioaktive Iodierung von Peptiden	121
6.1.5	<i>In-vivo</i> -Verteilungsstudien	122
6.1.6	Szintigraphische Studien	122
6.1.7	<i>In-vitro</i> -Bestimmung der Plasmastabilität.....	123
6.1.8	<i>In-vitro</i> -Studie über Cisplatin-Wirkstoff-Metabolisierung.....	123
6.1.9	GSH-Bestimmung	124
6.1.10	Platinbestimmung	124
6.1.11	Harnstoff- und Kreatinin-Bestimmung	125
6.1.12	Histologische Untersuchungen	125
6.1.13	Peptidsynthese.....	128
6.2	Peptid-Wirkstoff-Konjugate	133
6.3	Wirkstoffmodifikationen	141
6.3.1	Liponsäure	141
6.3.2	Carvedilol.....	143
6.3.3	Silybin	144
6.3.4	Apocynin.....	145
6.4	Linker.....	147
6.5	Peptoidchemie	148
7	Literaturverzeichnis	151
	Publikationen.....	167

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Niere im Längsschnitt und Detailansicht eines Nephrons.	2
Abbildung 2: Übersicht aller literaturbekannten nierenspezifischen Carriersysteme.	4
Abbildung 3: Organverteilung von ^{125}I - γ (KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (3) nach intravenöser Applikation zu den jeweiligen angegebenen Zeitpunkten.	6
Abbildung 4: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I - γ (KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (3) nach intravenöser Applikation. .	6
Abbildung 5: Mögliche Resorptionsrouten in die proximalen Tubuluszellen.	8
Abbildung 6: Rezeptorvermittelte Endozytose eines Wirkstoff-Carrier-Konjugats und potentielle Routen des transportierten Wirkstoffs nach Freisetzung ins Zytoplasma.	10
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Festphasensynthese von Peptiden am Beispiel der Fmoc/tBu-Strategie.	12
Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung eines Wirkstoff-Peptid-Konjugats.	14
Abbildung 9: Formation und Effekte der Cisplatin-Addukte.	22
Abbildung 10: Metabolisierung Cisplatin zu einem starken Nephrotoxin über eine Glutathion-Konjugation.	25
Abbildung 11: Übersicht der pathophysiologischen Vorgänge der nephrotoxischen Wirkung Cisplatin.	26
Abbildung 12: Dephosphorylierung des Prodrugs Amifostin durch Phosphatasen in das aktive freie Thiol WR-1065.	28
Abbildung 13: α -Liponsäure in seiner oxidierten und reduzierten Form als Dihydroliponsäure.	29
Abbildung 14: Struktur des Flavanoids Silybin.	31
Abbildung 15: Strukturformel Carvedilol.	33
Abbildung 16: Strukturformel Apocynin.	36
Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Nierensektionen, eine Stunde nach intravenöser Applikation von FITC-(KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (7).	40
Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung der Nierenrinde, eine Stunde nach intravenöser Applikation von FITC-(KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (7) in einer Wildtyp-Maus und in einer Megalin-defizienten Maus.	41
Abbildung 19: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I - γ -PEG (21) und ^{125}I - γ (KKEEE) $_3$ KC(S-Mal-PEG)-NH $_2$ (15).	43
Abbildung 20: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I -NTyr(NLys-NLys-NGlu-NGlu-NGlu) $_2$ NLys-NH $_2$ (23).	44

Abbildung 21: Szintigraphische Verteilung von $^{99m}\text{Tc-LA-(NLys-NLys-NGlu-NGlu-NGlu)}_2\text{NLys-NH}_2$ (24).	45
Abbildung 22: Szintigraphische Verteilung von $^{125}\text{I-}\gamma(\text{KKEEE})_3\text{K-NH}_2$ (3) bei unterschiedlichen parenteralen Applikationsrouten.	46
Abbildung 23: HPLC-MS-Analytik von $\text{LA-(KKEEE)}_3\text{K-NH}_2$ (8) nach Abspaltung über TFA/TIS/ H_2O (v/v/v, 95/2,5/2,5).	49
Abbildung 24: Szintigraphische Verteilung von ^{99m}Tc -markierter Liponsäure.	52
Abbildung 25: Szintigraphische Verteilung von Liponsäure- $^{125}\text{I-}\gamma(\text{KKEEE})_3\text{-NH}_2$ -Konjugat (8).....	53
Abbildung 26: Übersicht unterschiedlicher LA-Konjugate mit unterschiedlichen Radiomarkierungen	54
Abbildung 27: Szintigraphische Verteilung von ^{99m}Tc -markierter Liponsäure nach intraperitonealen Applikation.....	55
Abbildung 28: Szintigraphische Verteilung von $^{99m}\text{Tc-LA(KKEEE)}_3\text{-NH}_2$ -Konjugat (8) nach intraperitonealer Applikation.	56
Abbildung 29: Plasmastabilitätsuntersuchung von Carvedilol-(KKEEE) $_3$ -NH $_2$ -Konjugat (12).	59
Abbildung 30: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I -markiertem Carvedilol.	60
Abbildung 31: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I -Carvedilol-(KKEEE) $_3$ -NH $_2$ -Konjugat (12).	61
Abbildung 32: Plasmastabilitätsuntersuchung von Silybin-(KKEEE) $_3$ -NH $_2$ -Konjugat (13).	64
Abbildung 33: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I -markiertem Silybin.....	66
Abbildung 34: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I -Silybin-(KKEEE) $_3$ -NH $_2$ -Konjugat (13).....	67
Abbildung 35: Plasmastabilitätsuntersuchung von Apocynin-(KKEEE) $_3$ -NH $_2$ -Konjugat (14) im Rattenplasma.....	69
Abbildung 36: Studiendesign Cisplatin-Dosisfindung.	72
Abbildung 37: Serum-Harnstoffkonzentration nach einmaliger Cisplatingabe (i.p.) mit unterschiedlichen Dosen und Vehikeln im zeitlichen Verlauf.	73
Abbildung 38: Serum-Kreatininkonzentration nach einmaliger Cisplatingabe (i.p.) mit unterschiedlichen Dosen und Vehikeln im zeitlichen Verlauf.	74
Abbildung 39: Platingehalt der Nierenhomogenisate, 24 h nach Cisplatin-Injektion.....	76
Abbildung 40: Platingehalt der Leberhomogenisate, 24 h nach Cisplatin-Injektion.....	77
Abbildung 41: Glutathion-Konzentration der Nierenhomogenisate, 24 h nach Cisplatin-Injektion.....	78
Abbildung 42: Glutathion-Konzentration der Leberhomogenisate, 24 h nach Cisplatin-Injektion.....	79
Abbildung 43: Studiendesign Proof of concept „NephroGuard“	80
Abbildung 44: Serum-Kreatininkonzentration der jeweiligen Gruppen im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Injektion an Tag 1	81
Abbildung 45: Serum-Harnstoffkonzentration der jeweiligen Gruppen im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Injektion an Tag 1.	82

Abbildung 46: Serum-Kreatininkonzentration der jeweiligen Gruppen, 7 Tage nach Cisplatin-Injektion.	83
Abbildung 47: Serum-Harnstoffkonzentration der jeweiligen Gruppen, 7 Tage nach Cisplatin- Injektion.....	83
Abbildung 48: Platinwerte der Nierenhomogenisate der jeweiligen Gruppen, 7 Tage nach Cisplatin- Injektion.....	85
Abbildung 49: Mikroskopische Aufnahmen des Nierencortex (400-fach) eines Tiers aus den jeweiligen Gruppen, 7 Tage nach Cisplatingabe	86
Abbildung 50: Mikroskopische Aufnahmen des Nierencortex (400-fach) eines Tiers aus den mit Carvedilol behandelten Tieren, sieben Tage nach Cisplatingabe	87
Abbildung 51: Quantitative Auswertung des fibrotischen Anteils im Nierencortex in den jeweiligen Gruppen.....	88
Abbildung 52: Quantitative Auswertung des fibrotischen Anteils im intermediären Bereich zwischen Cortex und Medulla in den jeweiligen Gruppen	89
Abbildung 53: Quantitative Auswertung des fibrotischen Anteils der Medulla in den jeweiligen Gruppen.....	90
Abbildung 54: Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen des Nierencortex (400-fach) eines Tiers aus der mit LA-Konjugat behandelten Gruppe, 7 Tage und 30 Tage nach Cisplatin-Injektion.....	91
Abbildung 55: Vergleich des fibrotischen Anteils im Nierencortex in den jeweiligen Gruppen, 7 Tage und 30 Tage nach Cisplatingabe.	91
Abbildung 56: HPLC-MS-Analytik nach <i>In-vitro</i> -Inkubation von Cisplatin und Liponsäure-Carrier- Konjugat (9).	92

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADPKD	<i>autosomal dominant polycystic kidney disease</i>
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl
BUN	<i>blood urea nitrogen</i>
Bzl	Benzyl
CKD	<i>chronic kidney disease</i>
CP	Cisplatin
Ctr1	<i>copper transporter 1</i>
CuAAC	kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
CV	Carvedilol
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	<i>N, N'</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
DTNB	Ellmanns Reagenz, 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDT	Ethandithiol

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigester
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenyl-9-methyloxycarbonyl
GBM	<i>glomerular basement membrane</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GGT	γ -Glutamyltranspeptidase
GSH	Glutathion
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HD	High dose
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICP/MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ID	injizierte Dosis
LA	α -Liponsäure
LD	Low dose
Lit.	Literatur
LMWP	<i>low molecular weight protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>

MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
n/a	nicht angegeben
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NOX	NADPH-Oxidase
OCT2	<i>organic cation transporter 2</i> , organischer Kationen-transporter 2
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Rink-Amid-Harz	4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-aminomethyl)-phenoxy – Harz
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
s.c.	subkutan
SMCC	Succinimidyl-4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
SPECT	<i>single photon emission computed tomography</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

Abkürzungsverzeichnis

TRIS	Tris(hydroxymethyl)methylamin
Trt	Trityl



1 Einleitung

1.1 Renales *Targeting*

Über 10 % der europäischen Bevölkerung leiden an einer chronischen Nierenerkrankung (CKD) [1]. In den vergangenen zehn Jahren ist insbesondere in den Industrieländern ein Anstieg der nephropathischen Erkrankungen zu verzeichnen [2-4]. Übergewicht und Fettleibigkeit führen zu erhöhten Inzidenzen von Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen, die gleichzeitig einen Anstieg der CKD-Inzidenzen mit sich bringen [5-7]. Zuletzt führt der demographische Wandel mit einem deutlichen Anstieg des Durchschnittsalters der Bevölkerung ebenso zu einer Erhöhung der CKD-Inzidenz. Aktuelle Behandlungsmethoden bewirken lediglich eine Verzögerung in der Progression der CKD [8]. Langzeitbehandlungen dieser chronischen Nierenerkrankungen bringen schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich. Gleichzeitig scheiterten vielversprechende Wirkstoffkandidaten während klinischen Phasen aufgrund von Sicherheitsbedenken und mangelnder Wirksamkeit, wie zum Beispiel Bardoxolone-Methyl [9, 10] und Paracalcitol [11, 12] für CKD, Avosentan für die Behandlung diabetischer Nephropathie [13], Sirolimus und Everolimus bei autosomal dominanter polyzystischer Nierenerkrankung (ADPKD) [14, 15]. Ein gezielter Wirkstofftransport in die Nieren (*renales Targeting*) würde die Effektivität der Wirkstoffe erhöhen, systemische Nebenwirkungen senken und somit neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. Dabei stehen eine Reihe unterschiedlicher Methoden zur Auswahl, die bereits ausgiebig in der Literatur beschrieben wurden [16, 17]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde über die Konjugation an einen nierenspezifischen Vektor, einen sogenannten Carrier, ein *renales Targeting* erzielt. Welches Gewebe spezifisch in den Nieren adressiert wurde sowie alle weiteren Informationen bezüglich des verwendeten Carriers werden in den folgenden Kapiteln ausführlich erläutert.

1.2 Proximale Tubuluszellen als Zielgewebe

Die Nieren erfüllen eine Reihe wichtiger Funktionen im Organismus. Dazu gehören unter anderem die Aufrechterhaltung des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalts und damit die langfristige Blutdruckeinstellung, die Produktion wichtiger Hormone sowie die Gluconeogenese. Eine weitere essentielle

1. Einleitung

Funktion ist die Abtrennung von Stoffwechselendprodukten und Giftstoffen über den Urin, der über die ableitenden Harnwege ausgeschieden wird. Die für die Filtration zuständigen Funktionseinheiten sind die Nephronen, bestehend aus einem Nierenkörperchen (Glomerulus) und zugehörigen Nierenkanälchen (Tubulus) (**Abbildung 1**). Jede Niere beinhaltet ca. eine Million dieser Nephronen.

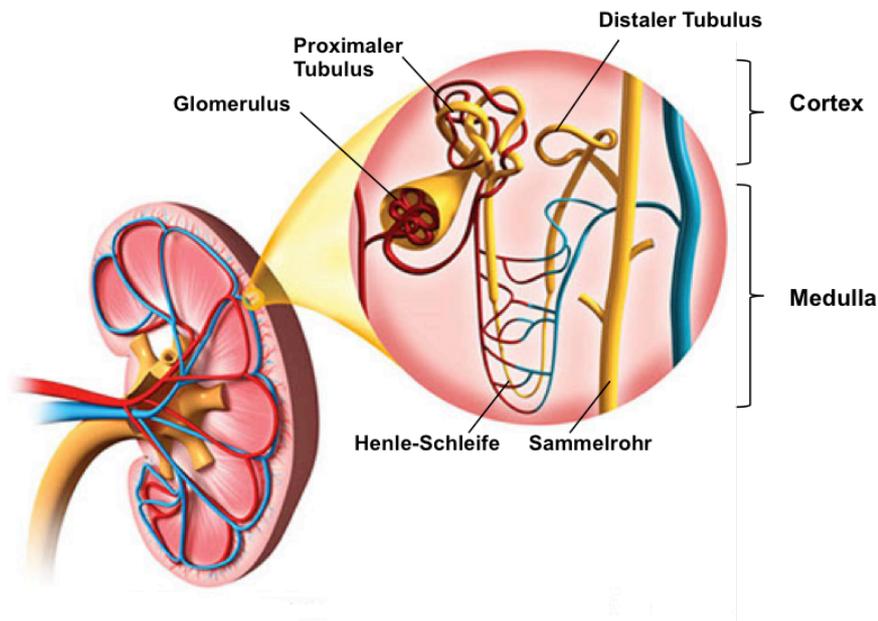


Abbildung 1: Niere im Längsschnitt und Detailansicht eines Nephrons. (Modifizierte Darstellung, Jose Sanchez, <https://www.behance.net/gallery/2900619/Libros-para-todos>)

Bis zu 25 % des Herzminutenvolumens passiert bei einem Menschen im Ruhezustand die Nieren, wo es zunächst durch die spezifische Fenestrierung der Glomeruli größenabhängig filtriert wird. Moleküle, die eine molare Masse von ca. 30 kDa überschreiten, können die glomeruläre Membran nicht überwinden und verbleiben im Körper [18]. Weitere Eigenschaften wie Flexibilität, Hydratation sowie intra- und intermolekulare Architektur der Moleküle spielen außerdem für die glomeruläre Filtration eine wichtige Rolle [18, 19]. Die Flüssigkeit, welche den Glomerulus passiert – der Primärharn – besteht größtenteils aus Wasser, Elektrolyten, harnpflichtigen Stoffen und anderen kleineren Molekülen.

Das tubuläre System ist anschließend für die Rückresorption von Wasser und physiologisch wertvoller Komponenten zuständig. Der proximale Tubulus spielt dabei die prominenteste Rolle für die Rückresorption wichtiger Substanzen, da ca. zwei Drittel des Filtratvolumens hier über aktiven oder passiven Transport zurückgewonnen werden [20].

Die Henle-Schleife, die den proximalen Tubuluszellen nachgeschaltet ist, sorgt nochmals für die Rückresorption von Wasser. Anschließend folgt der distale Tubulus, welcher für die Feineinstellung der Elektrolytkonzentration und des pH-Werts verantwortlich ist. Nach dem distalen Tubulus wird der Endharn über Sammelrohre und Harnleiter (*Ureter*) der Harnblase zugeführt.

Aufgrund dieser physiologischen Funktion weisen die Nieren eine hohe Exposition gegenüber reaktiven und toxischen Substanzen auf. Gerade im tubulären System kommt es während der Aufkonzentrierung des Primärharns zu hohen Belastungen mit toxischen, harnpflichtigen Stoffen, die Nierenschäden über unterschiedliche Mechanismen verursachen können. Der proximale Tubulus spielt durch seine Funktion dabei eine bedeutende Rolle in der Ätiologie vieler Nierenerkrankungen [21]. Ein Wirkstoff-*Targeting* zu den proximalen Tubuluszellen könnte aktuelle Behandlungstherapien von Nierenerkrankungen verbessern, gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen reduzieren oder neue Therapiemöglichkeiten eröffnen.

1.3 Carriersysteme

Bei einem Carrier handelt es sich um ein organspezifisches, idealerweise zellspezifisches Trägermolekül, das einen Wirkstoff zum gewünschten Zielort transportieren und diesen dort unverändert freisetzen kann. Durch die strukturellen Eigenschaften des Transportmoleküls kommt es zu einer spezifischen Interaktion mit dem Zielorgan, z. B. durch selektive Internalisierung mit organspezifischen Rezeptoren.

Unterschiedliche Carriersysteme, die einen spezifischen Transport in die proximalen Tubuluszellen erzielen wurden bereits beschrieben (**Abbildung 2**). Makromolekulare Carrier mit molekularen Massen < 30 kDa bieten für das *Drug Targeting* gleich mehrere Vorteile [21]. Zum einen überwiegt die molekulare Masse der Carrier meist denen des konjugierten Wirkstoffs, sodass die pharmakokinetischen Eigenschaften der Carrier denen des Wirkstoffs überwiegen. Niedermolekulare Proteine (LMWP, *low molecular weight proteins*) werden zum Beispiel schnell aus der systemischen Zirkulation gefiltert und binden spezifisch an Rezeptoren, wo anschließend durch lysosomale Hydrolyse eine Freisetzung des Wirkstoffs stattfinden kann. Zum anderen bieten LMWP, aufgrund der unterschiedlichen funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten, mehrere Verknüpfungsmöglichkeiten für Wirkstoffe an. Der prominenteste Vertreter der LMWP ist Lysozym, mit dem bereits erfolgreich ein nierenspezifischer Transport unterschiedlicher Wirkstoffe wie Naproxen und Captopril erzielt werden konnte [22-25]. Dennoch weist Lysozym auch einige Nachteile auf, die die klinische Verwendung die-

1. Einleitung

ses Carriers beeinträchtigen. So ist die Synthese eines definierten Wirkstoff-Konjugats bei der großen Anzahl reaktiver Seitenkettengruppen des Lysozyms nur schwer durchführbar. Es kommt zu unkontrollierten Konjugationen und Selbstaggregation des Proteins, die die Aufreinigung und Charakterisierung stark erschweren [21]. Des Weiteren bringt die Gabe von Lysozym schwerwiegende kardiovaskuläre Nebenwirkungen mit sich und kann je nach Konjugation immunogen wirken [26, 27].

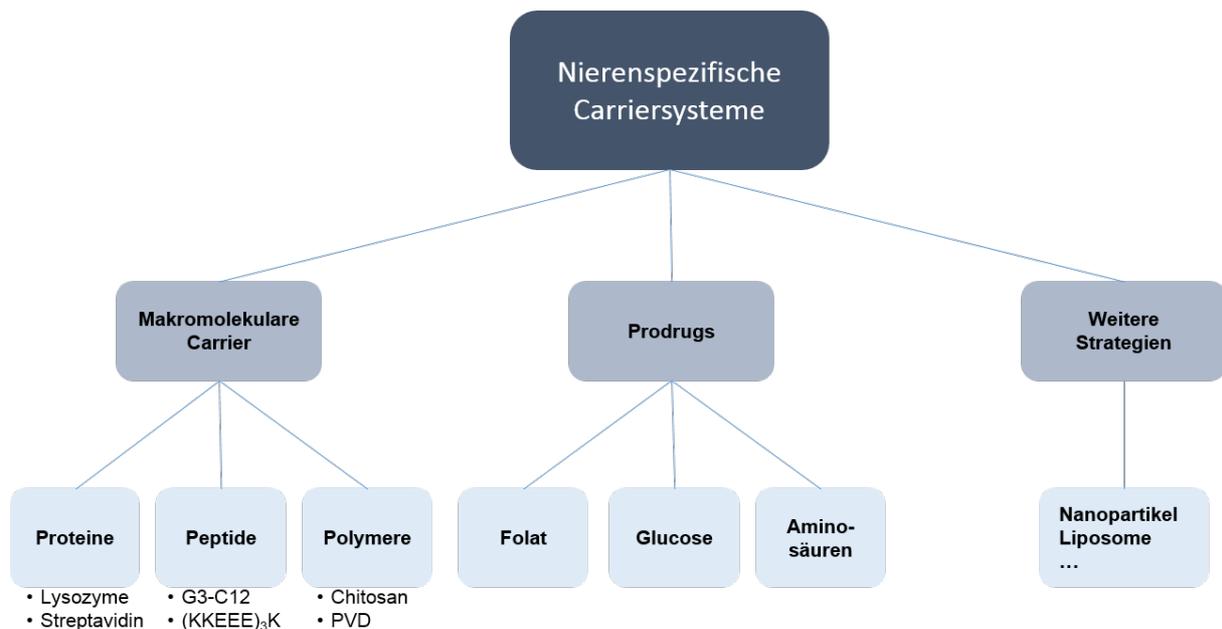


Abbildung 2: Übersicht aller literaturbekannten nierenspezifischen Carriersysteme. Modifizierte Darstellung nach Zhou et al. [21].

Peptide hingegen gewannen aufgrund ihrer Eigenschaften große Bedeutung in der Entwicklung von Carriersystemen mit unterschiedlichen Anwendungen bei Tumor-, Lymph-, Leber-, Gehirn-, Knochen- und Nieren-Targeting [28, 29]. Durch die vergleichsweise einfache automatisierte Synthese von Peptiden, die hohe Wirkstoffbeladung, sowie der Möglichkeit kontrollierte regioselektive Konjugationen durchzuführen, haben Peptide gegenüber Proteinen als Carrier einen deutlichen Vorteil. Des Weiteren weisen Peptide im Vergleich zu Proteinen hohe thermische und hydrolytische Stabilitäten auf, zeigen bessere Lagerstabilitäten und eine geringere Immunogenität [30].

In vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass viele Peptide unterschiedlicher Beladungen und Eigenschaften in den Nieren rückresorbiert werden. Dennoch konnten nicht alle nierenspezifische Peptide einen Wirkstofftransport gewährleisten und zeigten veränderte Kinetiken und Spezifitäten nach der Konjugation des Modellwirkstoffs α -Liponsäure [31].

Trotz der Multispezifität von Megalin, einem Rezeptor auf der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen (siehe auch Kapitel 1.3.2), sind nur wenige peptidische Carrier literaturbekannt. Lediglich zwei nierenspezifische Carrier konnten einen gezielten Transport von Wirkstoffen in den proximalen Tubulus der Nieren erzielen. Zum einen das Galectin-3-targetierende Peptid mit der Sequenz ANTPCGPYTHDCPVKR-NH₂, das neben seiner Tumorspezifität auch eine hohe Nierenspezifität aufweist [32]. Und zum anderen der hochselektive nierenspezifische Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**), der bereits unterschiedliche Wirkstoffe erfolgreich in die Nieren transportierte und durch seine hohe Beladungskapazität, Stabilität und guten Biokompatibilität sehr gute Eigenschaften als Carrier aufweist [33].

1.3.1 (KKEEE)₃K (**1**) als hochselektiver nierenspezifischer Carrier

Das Peptid (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**) wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten als nierenspezifischer Carrier identifiziert, detailliert analysiert und optimiert [31, 34, 35]. Im Folgenden werden die wichtigsten Eigenschaften und Erkenntnisse bzgl. Pharmakokinetik und Spezifität des Peptids (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**) zusammengefasst.

Die alternierende Sequenz aus Lysin und Glutaminsäure zeigt nach radioaktiver Markierung in einer Organverteilungsstudie mit jeweils drei Tieren pro Zeitpunkt, eine schnelle und hochspezifische Akkumulation in den Nieren (**Abbildung 3**). Nach 15 Minuten reichern sich bereits bis zu 125 %ID/g der Verbindung ¹²⁵I-γ(KKEEE)₃K-NH₂ (**3**) nach intravenöser Applikation in den Nieren an. Des Weiteren kann eine allmähliche Abnahme der gemessenen Radioaktivität detektiert werden, ca. 82 %ID/g verbleiben nach einer Stunde in den Nieren, 40 %ID/g nach zwei Stunden und ca. 10 % der injizierten Dosis pro Gramm Organ vier Stunden nach Applikation.

1. Einleitung

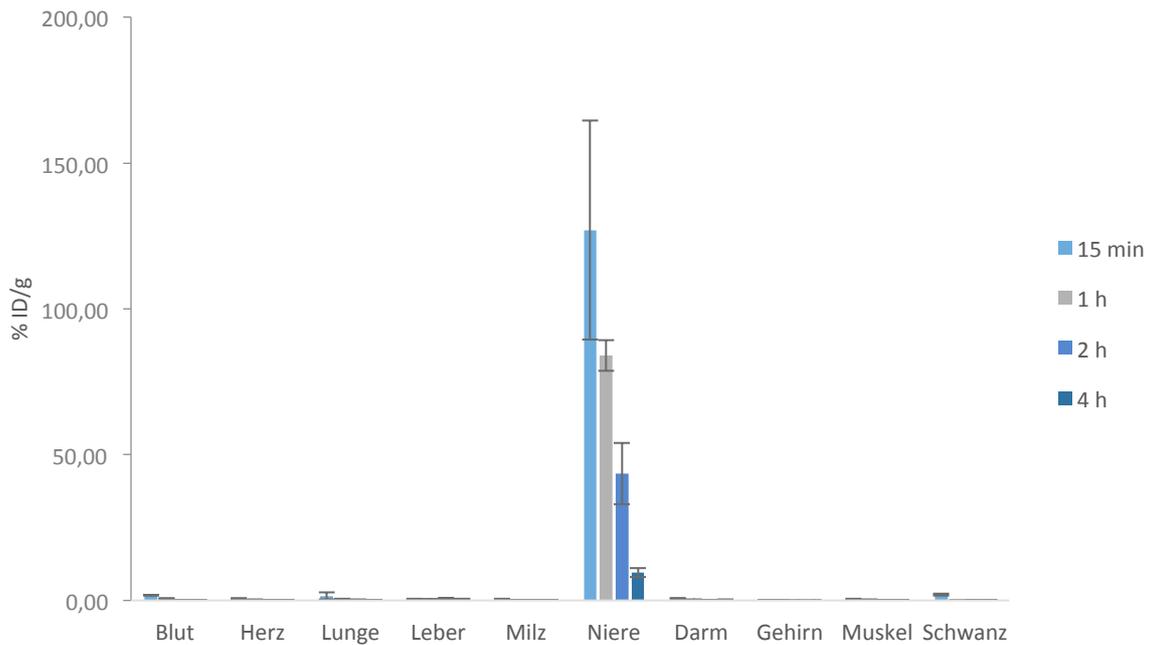


Abbildung 3: Organverteilung von ^{125}I - γ -(KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (**3**) nach intravenöser Applikation zu den jeweiligen angegebenen Zeitpunkten in jeweils drei NMRI-Mäusen (nicht veröffentlichte Daten, Artjom Wischnjow).

Die szintigraphische Verteilung von ^{125}I - γ -(KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (**3**) bestätigt die hohe und exklusive Anreicherung in beiden Nieren (Abbildung 4). Zusätzlich weisen die Szintigramme auf eine Exkretion des Peptids über den Urin in die Blase hin (2h-Wert). Über 90 % der injizierten Aktivität konnten innerhalb von 24 Stunden im Urin nachgewiesen werden und bestätigen diese Annahme, ca. 2 % werden biliär sekretiert [33].

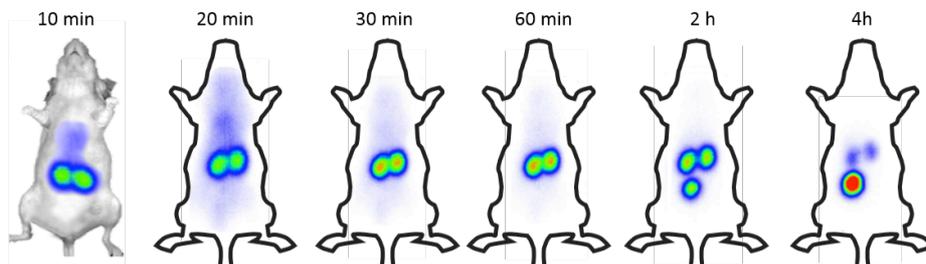


Abbildung 4: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I - γ -(KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (**3**) nach intravenöser Applikation in eine NMRI-Maus.

Organverteilungsstudien von (KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (**1**) mit Radiomarkierungen am C-Terminus weisen darauf hin, dass ein Abbau des Peptides vom C- zum N-Terminus stattfindet, da das am C-Terminus radiomarkierte Peptid (KKEEE) $_3$ K- $^{99\text{m}}$ Tc-MAG3 sehr viel schneller über die Blase ausgeschieden wird

als das N-Terminal markierte Peptid $^{99m}\text{Tc-MAG3(KKEEE)}_3\text{K}$ (nicht veröffentlichte Daten, Alexa Schieck).

Es konnten bereits erfolgreich unterschiedliche Wirkstoffe (Ciprofloxacin, Liponsäure, Kaffeesäure) über den Carrier spezifisch in die Nieren transportiert werden [31, 33]. Der Carrier zeigte dabei nur geringe Veränderungen in der Spezifität und Pharmakokinetik. Zusätzlich konnte über eine Tolerabilitätsstudie *in vivo*, eine gute Verträglichkeit des Peptids bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

1.3.2 Aufnahmemechanismen von peptidischen Carriern in die proximalen Tubuluszellen

Die Resorption von Carriern in die proximalen Tubuluszellen kann über die apikale oder basolaterale Seite erfolgen. Über welche Seite der Carrier die proximalen Tubuli erreicht ist abhängig von den anatomischen und physiologischen Gegebenheiten eines Nephrons.

Für die Aufnahme über die apikale Seite der Tubuluszellen muss der Carrier zunächst glomerulär gefiltert werden. Es handelt sich dabei um eine konzentrationsunabhängige, größen- und ladungsabhängige Filtration durch unterschiedliche Barrieren. Dazu gehört die glomeruläre Endothelwand, die 70 bis 100 nm große Fenestrierungen aufweist, die die Zufuhr von Blutkomponenten zunächst grob einschränkt [36, 37]. Daraufhin folgt die glomeruläre Grundmembran, die die wichtigste Filtrationsbarriere darstellt. Das Kollagenetzwerk der glomerulären Grundmembran beinhaltet negativ geladene Komponenten, die die Filtration von positiv geladene Carriern für die Passage favorisiert [37-39]. Das dritte Filtrationselement sind die Filtrationsschlitze der anliegenden Podozyten, die ein stabiles Netzwerk der glomerulären Grundmembran bilden. Unter normalen physiologischen Umständen werden Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 5 – 7 nm filtrierte, was in etwa einer molaren Masse < 30 kDa entspricht, und gelangen so auf die apikale Seite der proximalen Tubuluszellen [36, 40, 41].

Moleküle mit höheren molaren Massen oder kationischen Ladungen können die glomeruläre Grundmembran (GBM) nicht passieren, können aber über die basolaterale Seite in die proximalen Tubuli aufgenommen werden. Als bekanntestes Beispiel ist das Stoffwechselhormon Insulin zu nennen, das über die basolaterale Seite in die proximalen Tubuluszellen resorbiert wird [22].

1. Einleitung

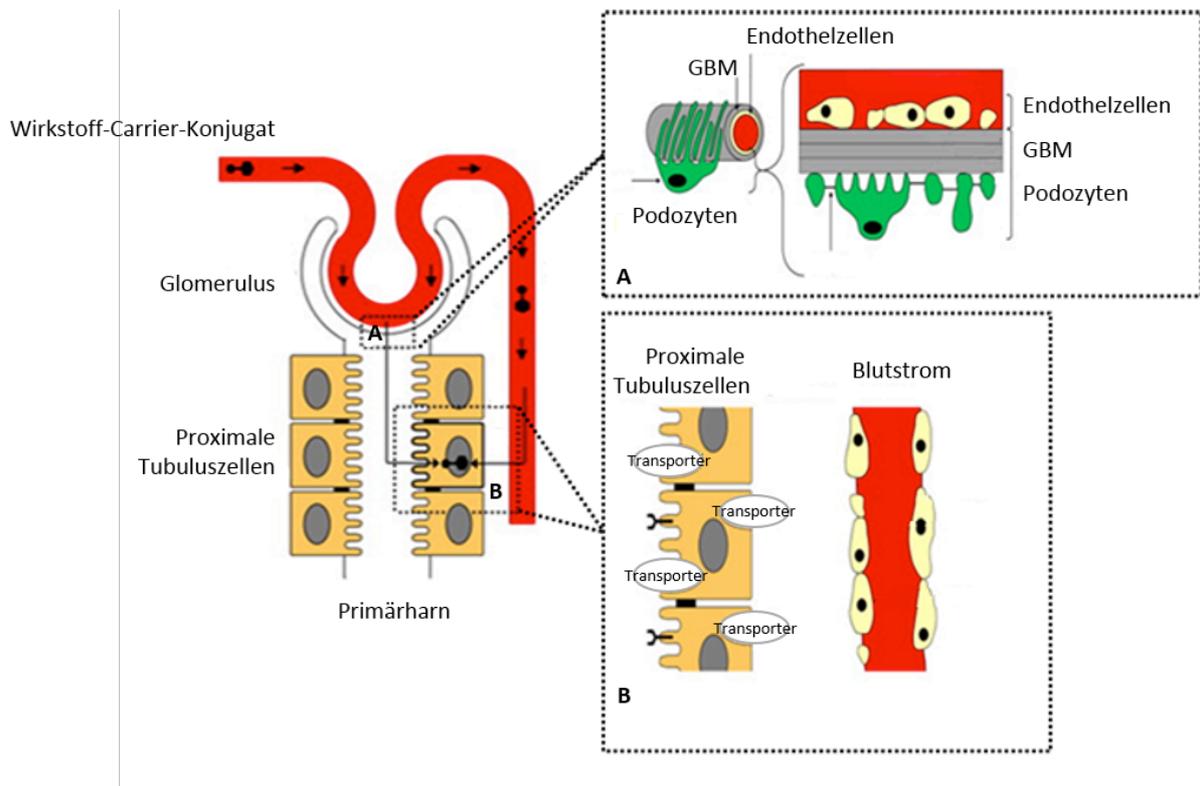


Abbildung 5: Mögliche Resorptionsrouten in die proximalen Tubuluszellen. A: Detailansicht der physiologischen Barrieren des Glomerulus. **B:** Detailansicht der basolateralen Seite der proximalen Tubuluszellen. Modifiziert nach Dolman et al. [42].

Hierzu müssen die Carrier die fenestrierte Endothelmembran der Kapillaren überwinden, die Poren von 5 – 5,5 nm Größe aufweisen [43, 44]. Welche maximale molare Masse die Moleküle für die Penetration durch die Endothelzellen besitzen können, konnte bis heute nicht genau bestimmt werden [42]. Da die Fenestrierungen der Endothelmembran negativ geladene Heparinsulfate beinhaltet, werden positiv geladene Makromoleküle und Partikel einfacher transportiert als negativ geladene Carrier [45]. Nach der Penetration der Endothelzellen befinden sich die Moleküle im tubulären Interstitium, wo Fibroblasten und dendritische Zellen lokalisiert sind, umgeben von extrazellulärer Matrix aus Glykoproteinen, Proteoglykanen, Fibrillen und interstitieller Flüssigkeit [46].

Die proximalen Tubuluszellen besitzen eine Reihe von Rezeptoren und Transportern, die für die Resorption von Peptiden verantwortlich sind [42]. Für den Einsatz von Peptiden als Wirkstoff-Carrier sind die meisten aktiven Transporter der proximalen Tubuluszellen jedoch ungeeignet, da diese gleichzeitig in anderen Geweben exprimiert werden, sodass ein spezifisches *Targeting* nur bedingt möglich ist. Oder für die Aufnahme kleinerer endogener Substanzen verantwortlich sind, die keine Substratspezifität gegenüber größeren Molekülen wie Peptiden aufweisen. Die durch Membranrezeptoren vermittelte endozytische Rückresorption in die proximalen Tubuluszellen stellt sich demnach als vielversprechendere Strategie für eine effiziente Aufnahme von peptidischen Carriern her-

aus. Da die meisten internalisierenden Rezeptoren auf der apikalen Seite der proximalen Tubuluszellen lokalisiert sind, bietet das *Drug Targeting* über diese Seite die besten Voraussetzungen für eine effiziente Aufnahme der Wirkstoff-Carrier-Konjugate [21, 42]. Wie genau die rezeptorvermittelte Endozytose stattfindet, wird im nächsten Kapitel detailliert erläutert.

1.3.2.1 Rezeptorvermittelte Endozytose und Freisetzung von Wirkstoff-Carrier-Konjugaten

Zwei gut untersuchte Rezeptoren, die auf der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen vorliegen sind Megalin und Cubilin [47-50]. Es handelt sich dabei um zwei kooperierende Rezeptoren, die für die Rückresorption einer Reihe wichtiger Substanzen unterschiedlicher Natur zuständig sind. Die Liste der bekannten Liganden wächst stetig an, was durch die strukturellen Eigenschaften der Rezeptoren erklärt werden kann. Insbesondere Megalin erlaubt durch unterschiedliche elektrostatische Oberflächenpotentiale und beweglichen Elementen des Rezeptors eine Multispezifität gegenüber unterschiedlichen Liganden [47, 48]. Cubilin dagegen weist eine einfachere Struktur auf. Nur wenige spezifische Liganden konnten für diesen Rezeptor identifiziert werden.

Die rezeptorvermittelte Endozytose beginnt mit einer Internalisierung des Konjugates mit dem Rezeptor, sodass es zur Ausbildung eines Clathrin-beschichteten Vesikels kommt. Über dieses Vesikel wird der Konjugat-Rezeptor-Komplex als Endosom in das Zytoplasma der Zelle transportiert. Durch spezielle Protonenpumpen sinkt der pH-Wert im Endosom, sodass sich die gebundenen Moleküle der Membranrezeptoren vom Endosom lösen können und ausgeschleust werden. Die ausgeschleusten Rezeptorbestandteile werden recycelt und zur Zellmembran zurück transportiert [48, 50]. Das späte Endosom transferiert das transportierte Konjugat zu lysosomalen Kompartimenten, wo es zur Hydrolyse des Konjugates durch unterschiedliche Enzyme, wie Exopeptidasen, Endopeptidasen und Esterasen kommt. Anschließend werden die hydrolysierten Bestandteile der Zelle zur Verfügung gestellt (**Abbildung 6**).

1. Einleitung

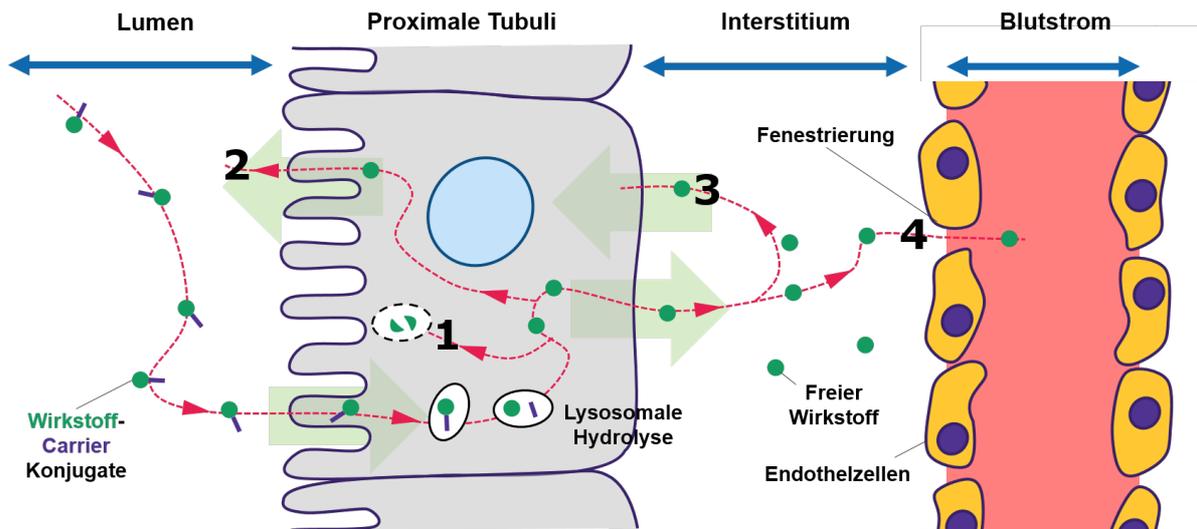


Abbildung 6: Rezeptorvermittelte Endozytose eines Wirkstoff-Carrier-Konjugats und potentielle Routen des transportierten Wirkstoffs nach Freisetzung ins Zytoplasma.

Für das *Drug Targeting* handelt es sich bei Hydrolyse und der Freisetzung der Konjugat-Bestandteile um einen elementaren Punkt für die Wirksamkeit und Effektivität eines Konjugats. Der transportierte Wirkstoff muss enzymatisch oder chemisch vom Carrier abgespalten und so in seiner aktiven Form freigesetzt werden, um eine Wirksamkeit gewährleisten zu können. Von großer Bedeutung ist dabei das Linker-Design des Konjugats und die Stabilität der gewählten Verknüpfungen (siehe Kapitel 1.5). Was nach der Freisetzung mit dem Wirkstoff passiert muss jeweils individuell analysiert werden und beruht auf den Eigenschaften des Wirkstoffs. Unterschiedliche Routen sind dabei möglich (**Abbildung 6, 1-4**): Zum einen kann nach der Freisetzung aus dem Lysosom der Wirkstoff intrazellulär seine Wirkung entfalten, metabolisiert werden oder zu den jeweiligen Zellkompartimenten (Zellkern, Mitochondrien, Golgi etc.) transportiert werden (1). Je nach Eigenschaften des Wirkstoffs kann jedoch auch ein Transporter über die apikale (2) oder basolaterale Seite (3) der proximalen Tubuli stattfinden. Bei der Exkretion über die apikale Seite gelangt der Wirkstoff über den Urin in die Blase. Über Transporter auf der basolateralen Seite hingegen wird der Wirkstoff zunächst ins Interstitium transportiert, wo sich ggfs. Targets bzw. Rezeptoren für die gewünschte Wirkung befinden. Zuletzt kann der Wirkstoff aus dem Interstitium erneut in die Blutlaufbahn aufgenommen werden (4) und im Organismus systemisch seine Wirkung entfalten. Die jeweilig eingeschlagene Route des Wirkstoffs ist essentiell für die Effektivität des *Drug Targeting*-Konzepts.

1.4 Peptidsynthese

Peptide und Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut und erfüllen in der Natur viele verschiedene physiologische Funktionen. Viele katalytische Enzyme, einige Hormone und Neurotransmitter aus Aminosäuren aufgebaut (z. B. Insulin, Somatostatin, Endorphin, Oxytocin, Secretin). Während die Biosynthese komplexer Proteine und Peptide *in vivo* nur wenige Sekunden oder Minuten beansprucht, ist die chemische Laborsynthese in Lösung sehr ineffizient. Die erste chemische Synthese von Insulin in den frühen 1960er Jahren benötigte beispielsweise zwei Jahre [51]. Heute jedoch ist die Synthese von Peptiden durch eine automatisierbare Festphasensynthese oder durch rDNA-Techniken wesentlich effizienter.

1.4.1 Festphasenpeptidsynthese

Das Konzept der Festphasenpeptidsynthese (engl. *solid phase peptide synthesis*, SPPS) wurde durch Robert Bruce Merrifield im Jahre 1963 entwickelt und war aufgrund vieler Vorteile gegenüber der Synthese in Lösung ein Durchbruch in der Peptidchemie. Dabei wird das Peptid schrittweise an einem unlöslichen Träger (Harz) vom C- zum N-Terminus aufgebaut (**Abbildung 7**). Sowohl die α -Aminofunktion als auch die funktionelle Gruppen der Seitenketten müssen dabei mit geeigneten Schutzgruppen geschützt werden, um Nebenreaktionen zu verhindern. Zum Schutz der Aminofunktion dient entweder die basenlabile Fluorenyl-9-methyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc/*t*Bu-Strategie) oder die säurelabile Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc/Bzl-Strategie). Nach Entschützung der ersten polymergebundenen Aminosäure wird die nächste N-geschützte Aminosäure entweder voraktiviert oder unter Verwendung von verschiedenen Kupplungsreagenzien zugegeben. Die wichtigsten Reagenzien zur Aktivierung mit Carbodiimiden sind *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) [52] und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) [53]. Modernere Aktivierungsreagenzien sind die Uronium-Salze TBTU, HBTU oder HATU. Sie leiten sich von *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBT) bzw. *N*-Hydroxy-7-Azabenzotriazol (HOAt) ab.

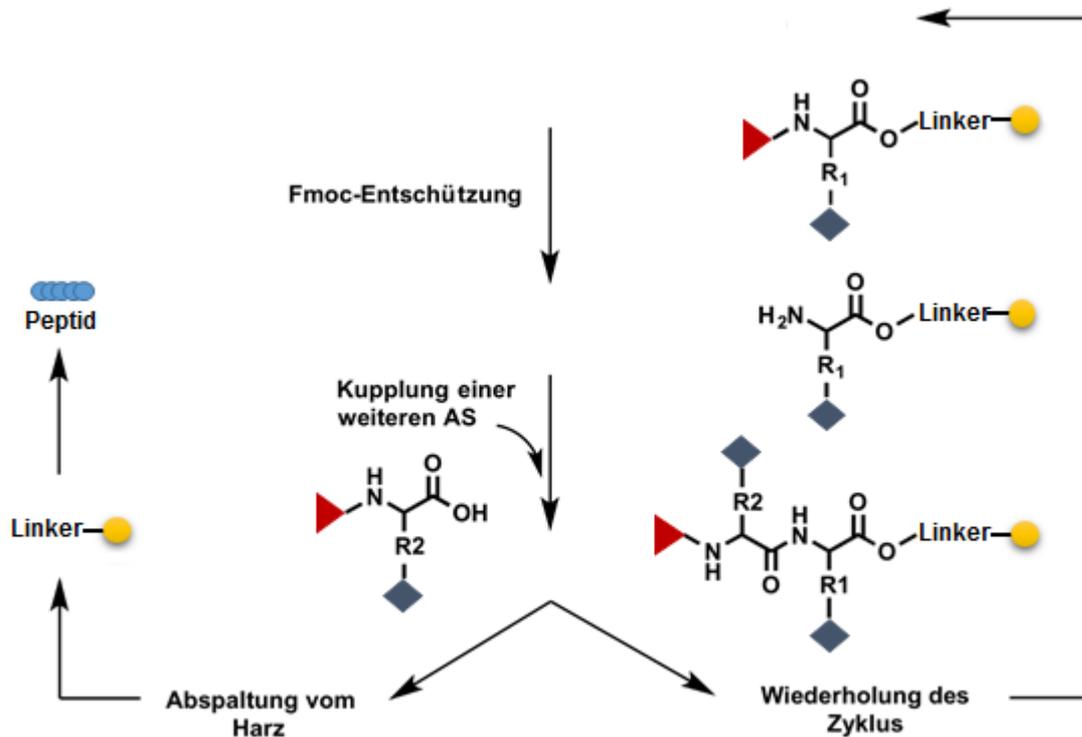


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Festphasensynthese von Peptiden am Beispiel der Fmoc/tBu-Strategie.

Die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe wird mit Piperidin, die säurelabile Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten. Die Schutzgruppen der Seitenketten werden meist simultan mit der Abspaltung des Peptids vom Harz entfernt. Hierbei wird für die Fmoc/tBu-Strategie TFA, für die Boc/Bzl-Strategie Flusssäure oder Trifluormethansulfonsäure verwendet. Als Lösungsmittel dienen DMF/NMP bzw. DCM.

1.4.1.1 Das Harz – polymerer Träger und Linker

Der polymere Träger spielt in der SPPS eine ausschlaggebende Rolle in Bezug auf die Ausbeute der Synthese. Der Träger sollte chemisch inert, mechanisch stabil, leicht zu filtrieren und unlöslich in den genutzten Lösungsmitteln sein. Aufgebaut wird der polymere Träger aus vernetzten Mikropartikeln (*beads*) mit einem Durchmesser von 20 – 80 μm , die durch unterschiedliche organische Lösungsmittel zum vier- bis sechs-fachen Volumen aufquellen können. Es handelt sich bei dem Träger meist um Polystyrol, das durch den Zusatz von 1 bis 2 % Divinylbenzol nur schwach vernetzt ist. Die Beladung an funktionellen Gruppen liegt meist im Bereich von 0,2 bis 0,8 mmol/g. Im Lösungsmittel suspen-

diert handelt es sich bei einem Harz also nicht um eine statische feste Matrix, sondern um ein gut solvatisiertes Gel mit mobilen polymeren Ketten [51]. Bei hydrophileren Peptiden, bei denen die physikalischen Eigenschaften stark von denen des Polymers abweichen, eignen sich Polystyrol- Polyethylenglycol (PS-PEG)-basierte Harze besser für die Peptidsynthese.

Die Einführung von Verbindungsgruppen (Linker) an einen polymeren Träger ist Voraussetzung für die Anwendung der Peptidsynthese. Dabei werden bifunktionelle Linker eingesetzt, die zum einen den Anforderungen für eine Schutzgruppe und deren Abspaltung unter milden Bedingungen entsprechen und zum anderen eine Bindung zum polymeren Träger ermöglichen.

1.5 Peptid-Wirkstoff-Konjugation

Drug Targeting bedingt die Verwendung biologischer Vektoren (Carrier), die als Transportsystem Wirkstoffe spezifisch zum Wirkort/Zielorgan/Zielgewebe transportieren. Im Rahmen dieser Arbeit handelt es sich bei dem biologischen Vektor um ein Peptid, welches sich spezifisch in den proximalen Tubuluszellen der Nieren anreichert. Wirkstoffe müssen kovalent an das Peptid gekoppelt werden, um einen nierenspezifischen Transport zu ermöglichen. **Abbildung 8** zeigt eine vereinfachte Darstellung eines solchen Wirkstoff-Peptid-Konjugats, in dem der Wirkstoff über einen Linker an den peptidischen Carrier verknüpft vorliegt. Um einen erfolgreichen Transport zu gewährleisten, müssen beide Verknüpfungsstellen spezielle Eigenschaften bezüglich ihrer Stabilität vorweisen. Insbesondere die Wirkstoff-Linker-Verknüpfung bedingt besondere Aufmerksamkeit. So muss eine gewisse Labilität/Spaltbarkeit gegeben sein, damit der Wirkstoff nach Erreichen des Zielgewebes frei in seiner aktiven Form vorliegt, um dessen Wirksamkeit zu gewährleisten. Gleichzeitig muss diese Verknüpfung jedoch auch eine ausreichende Stabilität während des systemischen Transports aufweisen, da sonst kein spezifischer Transport erfolgen kann.

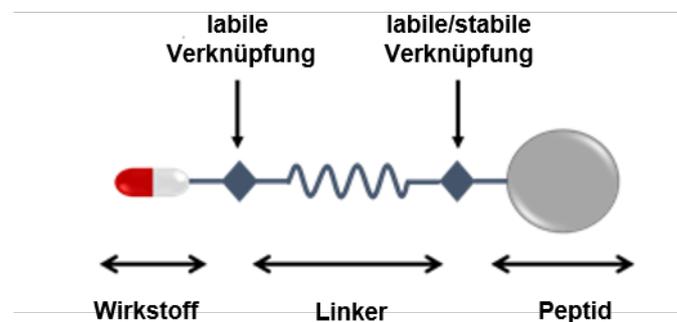


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung eines Wirkstoff-Peptid-Konjugats.

Verschiedenste Parameter spielen dabei eine Rolle. So bedingen beispielsweise unterschiedliche Applikationsrouten unterschiedlich lange Retentionen an der Injektionsstelle bis zur Aufnahme in die Blutbahn. Somit muss die Stabilität der Verknüpfungen des Peptid-Wirkstoff-Konjugats der Applikationsroute und der Pharmakokinetik angepasst werden. Des Weiteren liegen unterschiedliche Bedingungen im Zielgewebe vor (Enzyme, pH-Wert, Transportsysteme etc.), die Einfluss auf die Spaltbarkeit der Wirkstoff-Linker-Verknüpfung haben können. Zuletzt beeinflussen Abgangsgruppen sowohl

bei der enzymatischen als auch bei der chemischen Spaltung die Reaktionskinetik. Deswegen empfehlen sich individuelle Analysen der Plasmastabilität jedes einzelnen synthetisierten Konjugats. Abschließend ist festzuhalten, dass die Wahl der Verknüpfungen eines Wirkstoff-Peptid-Konjugats großen Einfluss auf dessen Stabilität und Effektivität hat und somit eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Wirkstoff-*Targeting*-Konzepten spielt.

1.5.1 Konjugationsstrategien und Linker-Design

Peptide weisen sowohl am *N*- und *C*-Terminus, als auch an ihren Seitenkettengruppen unterschiedliche funktionelle Gruppen auf, die eine Konjugation mit einem Wirkstoff ermöglichen. Durch die große Vielfalt an funktionellen Gruppen der Peptide ergibt sich für die Konjugation eine große Palette an Verknüpfungsstrategien. Da Peptide eine hohe Stabilität gegenüber unterschiedlichen Synthesebedingungen wie pH-Wert-Einwirkungen, Temperatur, Katalysatoren und Sauerstoff aufweisen, sollten sich die Synthesestrategie nach den Eigenschaften des Wirkstoffs orientieren. Die Konjugation des Wirkstoffs kann dabei direkt an das Peptid oder über einen bifunktionellen Linker erfolgen (**Abbildung 8**). Wie bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt, muss die Wirkstoffverknüpfung eine gewisse Labilität aufweisen, um die Effektivität der Wirkstoffe gewährleisten zu können. Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der bioreversiblen Verbindungen, die für die Wirkstoff-Verknüpfungen in Frage kommen.

Tabelle 1: Übersicht über labile kovalente Verknüpfungsmöglichkeiten eines Wirkstoffs.

Funktionelle Gruppen der Wirkstoffe	Mögliche labile Verknüpfungsmöglichkeiten
$R-OH$	Ester, Carbamat, Carbonat
$R-C(=O)OH$	Ester
$R-C(=O)H$	Hydrazon
$R-C(=O)R$	Hydrazon
$R-NH_2$	Carbamat, <i>cis</i> -Aconityl, Amid
$R-SH$	Disulfid

Aufgrund der hohen Hydrolysestabilität von Amidbindungen, erfordert die Spaltung dieser Verknüpfung hydrolytische Enzyme am Wirkort [54]. Lysosomen beispielsweise beinhalten unterschiedliche Proteasen (Endo- und Exopeptidasen), die die Spaltung einer Amidbindung ermöglichen [55, 56]. Lysosomale Hydrolysen können auch bei den weniger stabilen Verknüpfungen (Carbamat-, Carbonat-, Esterverbindungen) über Esterasen oder katalysiert durch den niedrigen pH-Wert von ca. 4 – 5 innerhalb des Lysosoms stattfinden [54, 57, 58]. Hydrazon-Verknüpfungen weisen bei mild sauren Bedingungen bereits eine hohe Labilität auf [59], was weitere Verarbeitungsschritte des Moleküls stark einschränkt und erschwert. Gleiche Bedingungen gelten für *cis*-Aconityl-Verknüpfungen, die labile Verknüpfungen mit Aminen eingehen. Die entstehende Amidbindung einer *cis*-Aconityl-Verknüpfung wird durch die benachbarte *cis*-Carboxylgruppe destabilisiert, sodass die Verknüpfung bereits bei mild sauren Bedingungen hydrolysiert wird. Nachfolgende Syntheseschritte sind dadurch stark eingeschränkt und wirken sich negativ auf die Syntheseausbeuten aus. Eine weitere labile Verknüpfung, die bereits für unterschiedliche Wirkstoffkonjugationen angewandt wurde, sind Disulfidbindungen [24, 54, 60]. Die hohe intrazelluläre Konzentration am Glutathion (GSH) von über 5 mM

begünstigt den Thiolaustausch des konjugierten Wirkstoffs. Durch die niedrige extrazelluläre GSH-Konzentration dagegen bleibt die Verknüpfung während der Zirkulation stabil [59].

Die beschriebenen Verknüpfungsstrategien benötigen Wirkstoffe, die mindestens eine geeignete funktionelle Gruppe besitzen. Für einige Wirkstoffe ohne reaktive Gruppen hingegen wurde eine Anwendung beschrieben, die eine reversible Wirkstoff-Konjugation über Koordinationschemie erlaubt [42, 61]. Platin(II) bildet dabei Metall-Ligand-Wechselwirkungen mit aromatischen Stickstoffatomen oder Thiolgruppen als Elektronendonator aus. Diese nicht-kovalenten Verknüpfungen weisen relativ hohe Stabilitäten auf und erlauben weitere Aufarbeitungsschritte ohne unmittelbare Dissoziation des Konjugats [62, 63]. In wie weit eine Freisetzung des Wirkstoffs nach Erreichen des *Targets* erfolgt, wurde bisher noch nicht eingehend untersucht.

Für selektive Konjugationen haben sich sogenannte „Klick“-Reaktionen bei der Synthese unzähliger Peptid- und Protein-Konjugate bereits als Standard etabliert. Im folgenden Kapitel werden diese vorgestellt und eine Auswahl der angewandten Reaktionen näher erläutert.

1.5.1.1 Klick-Chemie bei der Peptid-Wirkstoff-Konjugation

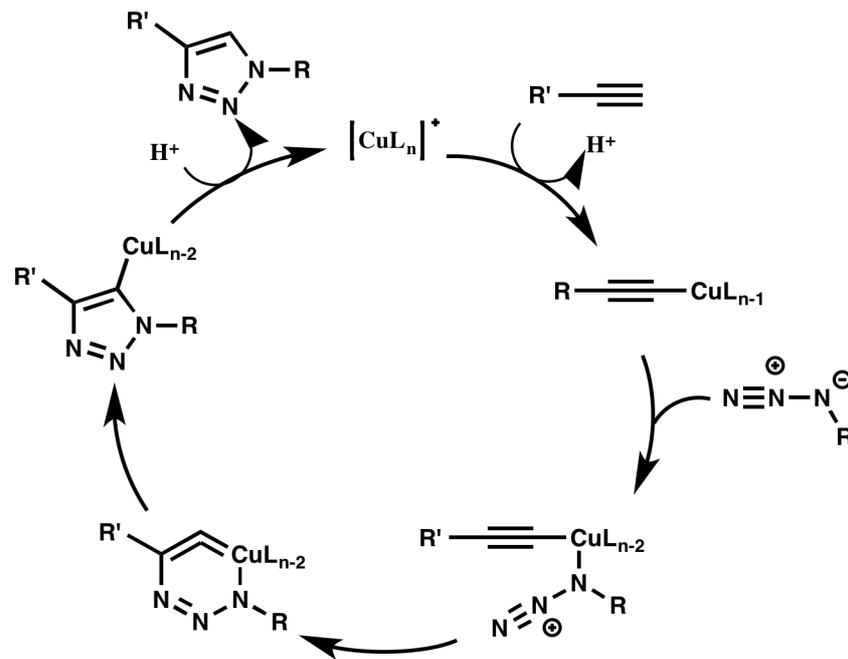
Mit der Natur als Vorbild wurden leistungsfähige, gut funktionierende und selektive Reaktionen für die effiziente Synthese neuartiger nützlicher Verbindungen entwickelt, die K.B. Sharpless 2001 als „Klick-Chemie“ bezeichnete [64]. Diese Reaktionen müssen dabei strenge Kriterien erfüllen: Sie sollten stereospezifisch sein, hohe Ausbeuten generieren, kurze Reaktionszeiten aufweisen, unter biologischen Reaktionsbedingungen durchführbar sein (wässrige Medien, gemäßigte Temperaturen, nahezu physiologischer pH-Wert) sowie bestenfalls keine Nebenprodukte erzeugen [64-66]. Um diese Kriterien zu erfüllen bedingen die Reaktionen starke thermodynamische Triebkräfte, typischerweise Energiegewinne von mehr als 84 kJ/mol. Typische Reaktionen dieser Art sind Kohlenstoff-Heteroatom-Verbindungen, wie zum Beispiel Cycloadditionen ungesättigter Verbindungen, nukleophile Substitutionen, insbesondere Ringöffnungsreaktionen, nichtaldolartige Carbonylreaktionen und Additionen an C-C-Mehrfachbindungen [64]. Tang und Becker (2014) liefern eine breite Übersicht aller möglichen Klick-Reaktionen, die bereits erfolgreich für die Synthese von Peptid-Konjugaten angewandt wurden [65].

Da die spezifischen Eigenschaften des Carriers durch die Einführung „klickbarer“ funktioneller Gruppen nicht beeinträchtigt werden dürfen, kommen für das Wirkstoff-*Targeting* nur wenige Klick-

Reaktionen in Frage. In den folgenden Kapiteln werden die prominentesten Klick-Reaktionen im Rahmen der Synthese von Peptid-Wirkstoff-Konjugaten vorgestellt und näher erläutert.

1.5.1.1.1 1,3-Dipolare Cycloaddition nach Huisgen

Die prominenteste Reaktion in der „Klick-Chemie“ ist die kupferkatalysierte dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen (CuAAC) nach Huisgen [67]. Die kupferkatalysierte Cycloaddition zeichnet sich mit einer 10^7 bis 10^8 -fachen Beschleunigung gegenüber der unkatalysierten Reaktion aus, erlaubt Umsetzungen in einer großen Temperatur- und pH-Wert-Spanne und toleriert eine große Bandbreite an funktionellen Gruppen. **Schema 1** zeigt den Mechanismus der kupferkatalysierten Cycloaddition: Dabei kommt es zunächst zu einer Anbindung des Kupfers an das Alkin. Anschließend bindet auch das Azid an das Kupfer, wobei es zu einer Ausbildung eines sechsgliedrigen Kupfer(III)-Metallzyklus kommt. Nach einer Ringverengung zum Triazol-Kupfer-Derivat und anschließende Protonolyse bildet sich das 1,2,3-Triazol aus und schließt den katalytischen Zyklus [68]. Als Katalysator werden Kupfer(I)-Spezies benötigt, die ausgehend von Cu(I)- oder Cu(II)-Salzen generiert werden können, letzteres durch die Zugabe eines Reduktionsmittels wie Natriumascorbat. Ein Überschuss an Natriumascorbat verhindert gleichzeitig die Bildung oxidativer Homokupplungs-Produkte und wirkt sich zusätzlich positiv auf die Reaktionskinetik und die Ausbeute aus [68]. Die Koordination von Kupfer(I) an das Alkin ist in Acetonitril als Lösungsmittel endotherm, in Wasser hingegen exotherm, was eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit in Wasser erklärt.



Schema 1: Mechanismus der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) [68].

Die CuAAC fand bereits breite Anwendung in der peptidischen Wirkstoffentwicklung [69]. Aufgrund der strukturellen Analogie wurde die Triazol-Verknüpfung stellvertretend für Amid- und Disulfid-Verknüpfungen eingeführt, was die metabolische Stabilität der Peptide bedeutend erhöhte [70-72]. Auch in der Biokonjugation konnte die „Klick-Chemie“ durch ihre Bioorthogonalität, der Biokompatibilität und der Stereo- und Regioselektivität an großer Bedeutung gewinnen. Durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen von Peptiden können jedoch die Umsatzraten der sonst sehr effizienten CuAAC beeinträchtigt werden. Abhängig von der Peptidsequenz und der Struktur der zu konjugierenden Komponente können die Ausbeuten von 5 – 90 % variieren [65]. Durch erhöhte Reaktionstemperaturen und dem Einsatz mikrowellenunterstützten Synthesen konnte eine Verbesserung der Ausbeuten erzielt werden [73-75]. Die Entwicklung von Cu(I)-bindenden Liganden, die Schutz vor Oxidation bieten, konnten zudem die Reaktionskinetiken der CuAAC maßgeblich steigern [76-78]. Des Weiteren wurden bereits Ultraschallwellen [79] und elektrochemische Aktivierung der Cu(I)-Spezies [80] in der Peptid-Konjugation angewandt, um erhöhte Umsetzungen zu generieren. Eine große Vielfalt an Linkern mit geeigneten „klickbaren“ funktionellen Gruppen ist kommerziell verfügbar. Aufgrund der hohen Stabilität der Triazol-Verknüpfung und den bereits genannten Vorteilen der CuAAC-Reaktion handelt es sich bei diesem Reaktionstyp um ein geeignetes Werkzeug für die Verknüpfung von Linker-Peptid-Verbindungen (**Abbildung 8**).

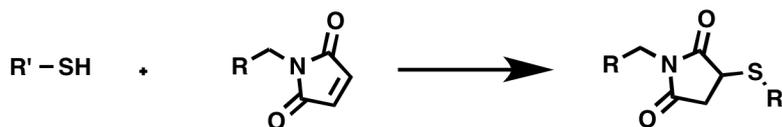
Basierend auf der bereits erläuterten Cycloaddition nach Huisgen, wurde eine katalysatorfreie Variante der Azid-Alkin-Reaktion entwickelt [81]. Vorgespannte Cyclooctine, die mit Fluorgruppen verse-

1. Einleitung

hen sind, ermöglichen die Beschleunigung dieser kupferfreien Klick-Chemie [82]. Die Reaktionsbedingungen erlauben somit den Einsatz dieser Reaktion in lebenden Organismen und können unter für dynamische *In-vivo*-Bildgebungen angewandt werden [83] sowie für die bioorthogonale Konjugation von Wirkstoffen and Carrier.

1.5.1.2 Thiol-Maleinimid-Addition

Die Thiol-Maleinimid-Reaktion gehört zu den effektivsten Thiol-Michael-Additionen. Sie ist durch hohe Spezifität, schnelle Kinetiken und quantitative Umsetzungen unter physiologischen Bedingungen gekennzeichnet. Bei dieser Reaktion kommt es zum nukleophilen Angriff eines Thiols an ein Alken mit benachbarten elektronenziehenden Atomen, wobei eine stabile Thioester-Verknüpfung entsteht (**Schema 2**).



Schema 2: Thiol-Maleinimid-Reaktion.

Bei der Peptid-Konjugation agieren die Thiole der Cystein-Seitenkettengruppe meist als Nukleophil für die Thiol-Maleinimid-Reaktion. Benachbarte Aminosäuren in der Peptidsequenz können dabei die Reaktionskinetik beeinflussen. Positiv geladene Aminosäuren, wie Arginin oder Lysin erhöhen den pK_a der benachbarten Thiole, wohingegen negativ geladene Aminosäure, wie Glutaminsäure den entgegengesetzten Effekt zeigen [84].

Da weitere nukleophile Gruppen in Peptiden vorhanden sind, müssen für die spezifische Thiol-Maleinimid-Verknüpfung bestimmte Bedingungen beachtet werden. Maleinimide reagieren spezifisch mit Thiolen in einem pH-Wert-Bereich zwischen 6,5 – 7,5. Bei einem pH-Wert von 7 erfolgt die Reaktion mit Thiolen bis zu 1000-mal schneller als die mit Aminen. Bei höheren pH-Werten hingegen können Nebenreaktionen mit freien Aminogruppen stattfinden [85-87]. Hydrolytische Ringöffnungen des Maleinimids zur Maleinsäure können ebenso bei höheren pH-Werten auftreten, die anschließend keine Reaktivität gegenüber Thiolen aufweisen. Diese Ringöffnungsreaktionen sind zusätzlich abhängig von der benachbarten chemischen Gruppe des Maleinimid-Rings [88]. Beim SMCC-Linker bei-

spielsweise erhöht der Cyclohexan-Ring durch seinen sterischen Effekt die Stabilität des Maleinimid-Rings [88]. Hingegen zeigte unter physiologischen Bedingungen der über *N*-Ethylmaleinimid synthetisierte Succinimid-Thioether bei der Anwesenheit anderer thiolhaltiger Komponenten, wie beispielsweise Glutathion, Disulfid-Austauschreaktionen [89]. Mehrere Arbeiten zur langfristigen Stabilitäts-erhöhung der Maleinimid-Thiol-Konjugate wurden bereits publiziert. Eine gezielte Ringöffnung soll dabei den Thiolaustausch unterdrücken und somit eine Erhöhung der Stabilität bewirken [90, 91].

Da Peptide teilweise bereits Cystein enthalten, müssen in solchen Fällen keine zusätzlichen Modifikationen für die „Klick-Reaktion“ vorgenommen werden. Falls keine thiolhaltigen Gruppen vorhanden sind, hat der Einbau von Cystein in die Peptidsequenz nur einen geringen Einfluss auf die spezifischen Eigenschaften des Carriers. Um Oxidationen der Thiole zu verhindern, können durch Zugabe von Reduktionsmitteln, wie Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) oder Dithiothreitol (DTT) unerwünschte Disulfidbrücken verhindert werden. Bei eigenständiger Synthese des Peptids genügt bereits die richtige Wahl des Abspaltungscocktails mit erhöhtem Anteil starker Reduktionsmittel, wie Ethandithiol (EDT) oder Anisolen.

Im Vergleich zur CuAAC benötigt die Thiol-Maleinimid-Reaktion keinen Einsatz metallhaltiger Katalysatoren, die unter Umständen Interaktionen mit Edukten eingehen können und somit die Reaktion beeinträchtigen oder aufwendige Aufreinigungen nach sich ziehen. Des Weiteren erschwert der Einsatz von Katalysatoren die Löslichkeit, was wiederum ein Vorteil der katalysatorfreien Thiol-Maleinimid-Reaktion ist. Alles in Allem stellt die Thiol-Maleinimid-Reaktion die effizienteste „Klick-Reaktion“ mit den höchsten Ausbeuten für die Synthese größerer Peptid-Konjugaten dar [65].

1.6 Cisplatin-Therapie

Cisplatin (*cis*-Diammindichloridoplatin) ist eines der meist verwendeten und hoch effektiven Zytostatika bei der Behandlung unterschiedlicher solider Tumoren, wie Blasen-, Kopf-, Lungen-, Eierstock- und testikulären Karzinomen. Bereits 1978 wurde die Substanz in die klinische Praxis eingeführt und ist bis heute der Goldstandard bei der Behandlung von Hodenkrebs mit Heilungsraten von über 90 % [92]. Bei Cisplatin handelt es sich um eine planare Substanz, die in der extrazellulären Flüssigkeit als Prodrug vorliegt. Nach der Aufnahme findet aufgrund der niedrigen zellulären Chlorid-Konzentration ein Austausch der Chloratome des Cisplatin statt [92, 93]. Dabei entstehen die wesentlich reaktiveren Cisplatin-Addukte $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ und $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. Aufgrund der hohen Elektrophilie des Aqua-Cisplatin-Komplexes kommt es durch kovalente Verknüpfungen des Platinatoms mit dem N⁷-Atom von Guanin und Adenin der DNA zu Quervernetzungen (**Abbildung 9**). Es kann dabei zur Ausbildung von Quervernetzung innerhalb eines DNA-Stranges kommen oder zwischen benachbarten DNA-Strängen. Beides bewirkt eine Hemmung von Reparaturmechanismen und der Telomeraseaktivität, was letztendlich zur Apoptose der betroffenen Zellen führen kann [94, 95].

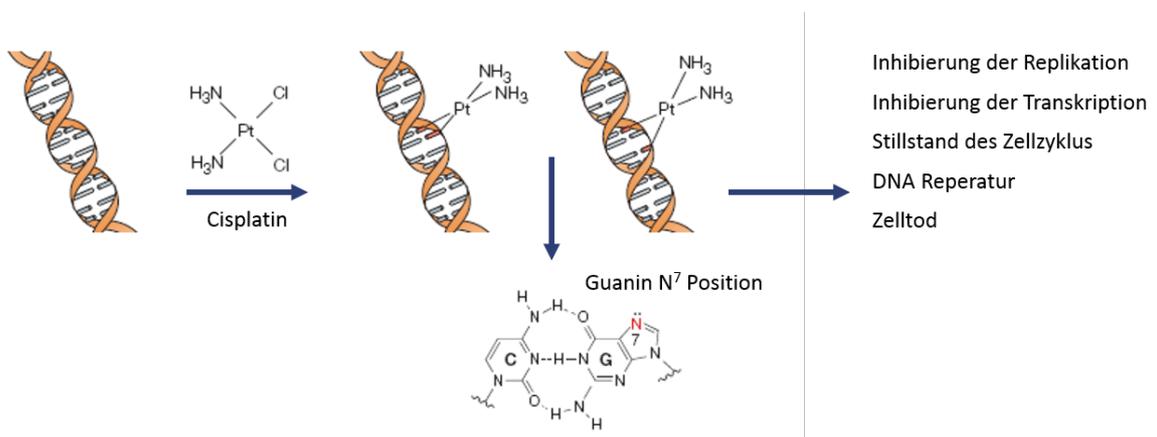


Abbildung 9: Formation und Effekte der Cisplatin-Addukte. Nach der intrazellulären Hydratisierung Cisplatin zu den wesentlich reaktiveren Formen $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ und $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ bindet das Platinatom kovalent an die N⁷-Positionen des Purins und bildet dabei 1,2- oder 1,3-Querverknüpfungen aus. Diese Cisplatin-DNA-Addukte hemmen DNA-Reparaturmechanismen, sodass es zur Apoptose der Zellen kommt. Quelle: in Anlehnung an Wang and Lippard [92].

Nach intravenöser Applikation diffundiert Cisplatin rasch ins Gewebe, 90 % liegen dabei plasmaproteingebunden vor und weisen eine triphasische Kinetik auf ($t_\alpha = 20 - 30$ min, $t_\beta = 40 - 70$ min, $t_\gamma = 24$ h). Bis zu 50 % des Zytostatikums werden renal ausgeschieden, weitere Anreicherungen in der

Leber, Milz, Prostata, Blase, Hoden und Muskulatur sowie Tumorgewebe sind nachweisbar [96]. Die Halbwertszeiten in den unterschiedlichen Organen variieren dabei stark.

Cisplatin besitzt ein hohes emetogenes Potenzial und löst bei den Patienten starke teils irreversible Nebenwirkungen wie Neurotoxizität, Ototoxizität, allergische Reaktionen sowie Gastrotoxizität und Myelosuppressionen aus. Durch die renale Ausscheidung des Zytostatikums weisen die Nieren eine besonders hohe Exposition der toxischen Substanz auf. Die Konzentrationen im Epithel der Proximalen Tubuluszellen sind fünfmal so hoch wie die Serumkonzentration [97]. Akute Nierenfunktionsstörungen treten bereits wenige Tage nach einer Standardbehandlung mit 50 – 120 mg/m² auf, welche an einem Anstieg des Serum-Kreatinins und des Serum-Harnstoffs zu erkennen sind [98]. Die Nephrotoxizität stellt für die Cisplatintherapie den dosislimitierenden Faktor dar und beeinträchtigt damit den Behandlungserfolg der Chemotherapie [97, 99, 100]. Die detaillierten Erkenntnisse über die nierenschädigende Wirkung Cisplatins werden im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.6.1 Nierenschädigung als dosislimitierender Faktor

20 % aller Patienten, die eine Hochdosis an Cisplatin erhielten, zeigten in einer Studie schwerwiegende renale Nierenfunktionsstörungen [101]. Eine retrospektive Studie von Finkel *et al.* verdeutlichte, dass alle mit Cisplatin behandelten pädiatrischen Patienten glomeruläre und tubuläre Anomalitäten entwickelten, die durch eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Kalium- und Magnesiumkonzentrationen im Serum sowie einer Zunahme des Serum-Kreatinins und der Serum-Harnstoffkonzentration kenntlich wurden [102, 103].

Cisplatin wird überwiegend über die Nieren ausgeschieden, sodass es durch den Exkretionsprozess zu einer Aufkonzentrierung des Zytostatikums in den Nephronen, besonders in den proximalen und distalen Tubuli, kommt [104, 105]. Das S3-Segment der proximalen Tubuli weist dabei die höchsten Konzentrationen Cisplatins auf, gefolgt vom distalen Tubulus und dem S1-Segment des proximalen Tubulus. Die Aufnahme erfolgt zum einen durch passive Diffusion aufgrund des hohen Konzentrationsgefälles und zum anderen durch unterschiedliche aktive Transportsysteme, die zum Großteil für die Aufnahme Cisplatins verantwortlich sind [106]. Der organische Kationentransporter 2 (OCT2) liegt auf der basolateralen Seite der proximalen Tubuli hoch exprimiert vor. Bei diesem Transporter handelt es sich sowohl im Tier als auch beim Menschen um den kritischen Transporter für die Aufnahme Cisplatins in die proximalen Tubuluszellen. Die Cisplatin-Analoga Carboplatin und Oxaliplatin interagieren dagegen nicht mit dem OCT2-Rezeptor und weisen deshalb eine geringere Nephrotoxizität auf [107]. Ishida *et al.* zeigte in seinen Versuchen, dass der Kupfer-Transporter (Ctr1) ebenso an der Cisplatin-

1. Einleitung

aufnahme beteiligt ist. Durch den *knock-down* dieses Transporters konnte eine Reduzierung der intrazellulären Akkumulation Cisplatins erreicht werden [108].

Die Mechanismen der cisplatininduzierten Nephrotoxizität sind sehr komplex und involvieren unterschiedliche zelluläre Prozesse, wie oxidativen Stress, Apoptose und Entzündungsprozesse. **Abbildung 11** zeigt eine Übersicht aller pathophysiologischen Vorgänge der nephrotoxischen Wirkung Cisplatins.

Die tumortoxische Wirkung Cisplatins durch Quervernetzungen der DNA und der damit zusammenhängenden Apoptose (Kapitel 1.6) der Zellen spielt bei der nephrotoxischen Wirkung Cisplatins nur eine untergeordnete Rolle, da Tubuluszellen nur geringe Zellproliferationsraten aufweisen [109, 110]. In unterschiedlichen Studien wird über eine Metabolisierung Cisplatins berichtet, die das Zytostatikum zu einem starken Nephrotoxin konvertiert. **Abbildung 10** zeigt eine Übersicht dieses Metabolisierungsprozesses. Dabei erfolgt zunächst eine Konjugation an das Tripeptid Glutathion (GSH) über eine Pt-S-Bindung. Anschließend wird das Konjugat auf der basolateralen Seite der proximalen Tubuli durch die γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) zu einem nephrotoxischen Metabolit hydrolysiert [110]. Über weitere enzymkatalysierte Metabolisierungsprozesse entsteht intrazellulär ein hoch reaktives Thiol-Cisplatin-Derivat mit potenter nephrotoxischer Wirkung. Die Beteiligung weiterer Enzyme, wie Aminopeptidasen, renale Dipeptidasen und Cysteins-S-Konjugat- β -Lyase bei der Metabolisierung Cisplatins zum Nephrotoxin wurde in unterschiedlichen Studien berichtet [110, 111]. Das GGT-Enzym spielt bei der Nephrotoxizität Cisplatins eine bedeutende Rolle. GGT-defiziente Mäuse zeigten in einer Studie eine Resistenz gegenüber nephrotoxischen Effekten Cisplatins [112].

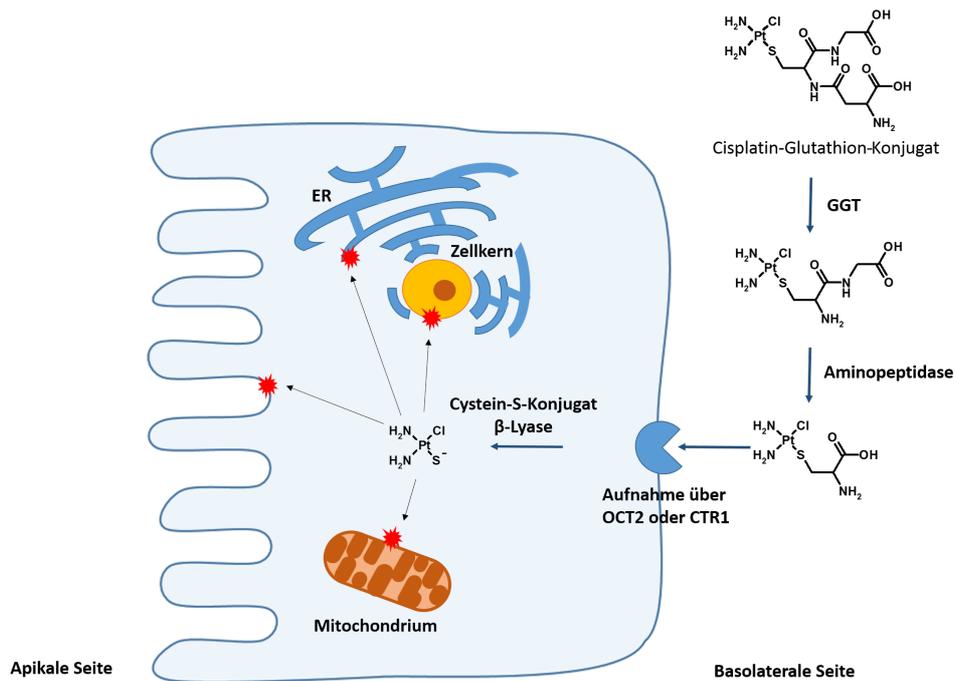


Abbildung 10: Metabolisierung Cisplatins zu einem starken Nephrotoxin über eine Glutathion-Konjugation.

Durch die teilweise kovalente Anbindung Cisplatins an Enzyme (siehe GSH-Konjugation) kommt es zu Inhibierungen antioxidativer Enzyme, was letztendlich zu einer nachteiligen Verschiebung des intrazellulären Redoxstatus führt [101, 109, 113]. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können direkt an unterschiedlichen Zellkomponenten, wie Lipiden, Proteine und der DNA binden und Strukturschäden verursachen. Durch strukturelle Schädigungen der Mitochondrien-Zellwand zum Beispiel kommt es durch Beeinträchtigung der respiratorischen Kette zur erhöhten ROS-Produktion. Des Weiteren scheinen ROS in der Aktivierung wichtiger intrinsischer Apoptose-Signalkaskaden involviert zu sein, wie p38- oder p53-Aktivierung [114]. Oxidativer Stress gehört zu den wichtigsten Faktoren bei der Pathogenese der cisplatininduzierten Nierenschädigung [101, 113].

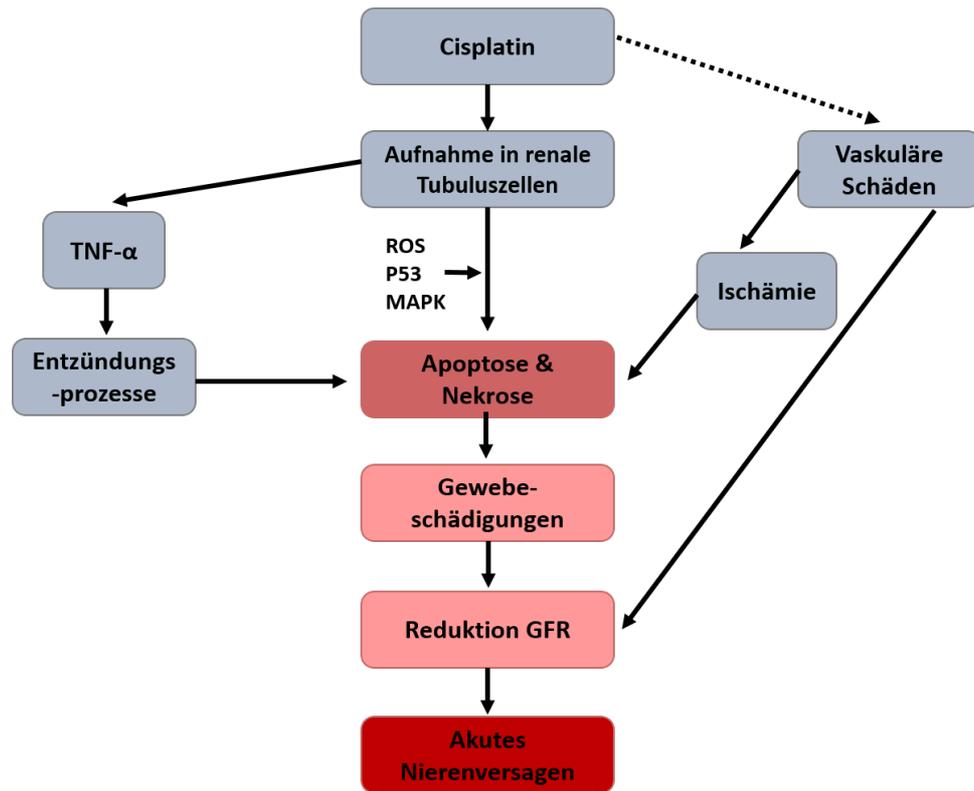


Abbildung 11: Übersicht der pathophysiologischen Vorgänge der nephrotoxischen Wirkung Cisplatin. Quelle: in Anlehnung an Pabla et al. 2008 [114].

Zusätzlich werden durch extrinsische Signalkaskaden – insbesondere in den proximalen Tubuluszellen – Entzündungsprozesse ausgelöst, die zu Veränderungen des renalen Gewebes führen. Dabei spielt das entzündungsfördernde Zytokin TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) in Zusammenhang mit den Zellwandrezeptoren TNFR1 und TNFR2 eine besondere Rolle [115, 116].

Vaskuläre Schäden gehören zu einer weiteren Nebenwirkung Cisplatin, die die nephrotoxische Wirkung zusätzlich verstärken können. Defekte an den Epithelzellen der Blutbahn führen zu einer geringeren Durchblutung des gesamten Organs, sowie zu einer Erniedrigung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Des Weiteren können Gewebeschädigungen entstehen, die gegebenenfalls irreversible Nierenschäden auslösen. Langzeiteffekte einer Cisplatintherapie auf die Nierenfunktion sind noch nicht vollständig geklärt. Retrospektive Studien zeigten eine irreversible Reduzierung der glomerulären Filtrationsrate [103, 117].

1.6.2 Präventions-Behandlungen/Aktuelle klinische Praxis

Eine zentrale Rolle bei der Prävention der Nephrotoxizität durch Cisplatin spielt die ausreichende Hydratation vor und nach Cisplatingabe. Eine Erhöhung des Urinvolumens auf 100 ml/h während der Cisplatinapplikation und 12 – 24 h danach sind essenziell, um eine Reduktion nephrotoxischer Effekte zu erzielen. Geeignete Hydratationslösungen sind dabei Glucose 5 % und NaCl 0,9 % unter Zusatz von 20 mmol KCl und 4 mmol Magnesium pro Liter. Unmittelbar vor Cisplatingabe konnte durch die Gabe eines Diuretikums, z. B. 125 – 250 ml Mannitol 20 % oder Furosemid 20 mg i.v., in Kombination mit der Hydratation, eine signifikante Reduzierung der Nephrotoxizität erzielt werden. Diese Prävention gehört zu den Standardbehandlungen während einer Cisplatintherapie [101].

Unumgänglich ist zudem die Evaluation der Kreatinin-Clearance vor jedem Zyklus einer cisplatinhaltigen Chemotherapie. Bei einer starken Herabsetzung der Kreatinin-Clearance muss die Cisplatinosis reduziert werden oder der Wechsel auf weniger nephrotoxische Cisplatin-Analoga erwogen werden. Da während einer Cisplatintherapie schwere Hypomagnesiämien beobachtet wurden, sollten zur Elektrolytsubstitution für einige Tage oral mit 160 mg/d Magnesium verabreicht werden [118]. Tägliche Kontrollen der Elektrolytkonzentrationen im Serum (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) sowie Gewichtskontrollen gehören ebenso zu den Standardanalysen bei der Gabe platinhaltiger Zytostatika.

Trotz der konventionellen präventiven Maßnahmen der Hydratation und der osmotischen Diurese verbleiben die nephrotoxischen Auswirkungen nach einmaliger Gabe Cisplatins unbefriedigend, insbesondere bei Dosen über 100 mg/m^2 oder kumulativen Dosen von über 300 mg/m^2 [119, 120]. Des Weiteren stellen Alter, Geschlecht, Nierenfunktion sowie bestehende Krankheiten wie Diabetes, CKD oder Herzinsuffizienz weitere dosislimitierende Faktoren für die Behandlung mit diesem Zytostatikum dar. Auch die nur marginal erforschten Langzeitschäden einer Cisplatintherapie, insbesondere bei pädiatrischen Patienten, erfordert die Erforschung und Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten zum Schutz des gesunden renalen Gewebes. Von großer Bedeutung ist dabei, dass die Behandlung keinen limitierenden Einfluss auf die therapeutische Wirkung Cisplatins haben darf. Unterschiedliche Ansätze und Schutzmaßnahmen wurden bereits getestet. Ein besonderer Fokus lag dabei auf dem durch Cisplatin induzierten oxidativen Stress, der durch die Gabe unterschiedlicher antioxidativer Substanzen gehemmt werden sollte. Im Folgenden wird eine Auswahl literaturbekannter Wirkstoffe vorgestellt und deren protektiver Effekt auf die Nephrotoxizität von Cisplatins näher erläutert.

1.6.2.1 Amifostin

Bei Amifostin handelt es sich um ein Thiophosphat, das durch die *Food and Drug Administration* (FDA) für die Reduktion der zytotoxischen Wirkung von kumulativen Cisplatingaben bei fortgeschrittenem Eierstockkrebs oder bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs zugelassen wurde [121]. Es ist ein Prodrug, welches durch membranständige alkalische Phosphatasen in seine aktive freie Thiolform WR-1065 konvertiert wird (**Abbildung 12**). Da gesunde Zellen im Vergleich zu Tumorzellen eine höhere Expression von zellmembranständigen alkalischen Phosphatasen aufweisen, erfolgt die intrazelluläre Aufnahme von Amifostin weitgehend selektiv. Experimentell konnte eine 50 – 100-fach erhöhte Anreicherung von Amifostin in gesunden Zellen des Organismus, im Vergleich zu neoplastisch transformierten Zellen, nachgewiesen werden [122]. Die intrazelluläre Aufnahme des Wirkstoffs erfolgt sehr rasch, 5 – 10 min nach Applikation sind bereits über 90 % aus dem Plasma eliminiert.

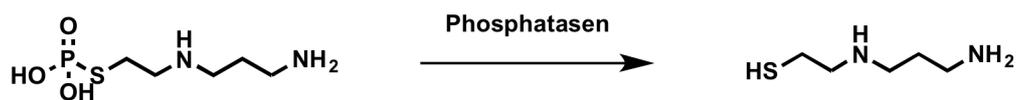


Abbildung 12: Dephosphorylierung des Prodrugs Amifostin durch Phosphatasen in das aktive freie Thiol WR-1065.

Exakte Wirkmechanismen des aktiven Metabolits WR-1065 sind bis dato noch weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass Amifostin durch seine Thiolgruppe freie Radikale bindet und antagonisiert und somit Cisplatin-DNA-Addukte und Interstrang-*Crosslinks* verhindert. Gleichzeitig erleichtert Amifostin als Wasserstoffdonator intrazelluläre Reparaturvorgänge. Um diese zellprotektive Wirkung Amifostins zu erzielen, muss der Wirkstoff 30 min vor Cisplatingabe appliziert werden. Die Gabe erfolgt dabei intravenös, mit einer Konzentration von 740 – 910 mg/m², gelöst in 0,9 %iger Natriumchloridlösung als 15 minütige Kurzinfusion [122]. In zahlreichen Studien konnte eine selektive Protektion gesunden Gewebes ohne negative Beeinflussung der Cisplatinwirkung im Tumorgewebe bewiesen werden. Insbesondere konnte ein signifikanter renoprotektiver Effekt Amifostins durch konstante Kreatinin-*Clearance* während der gesamten Behandlungsdauer nachgewiesen werden [123]. Gerade bei mehreren Chemotherapiezyklen erwies sich die Gabe Amifostins als sehr wirkungsvoll, da im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Dosisreduzierungen aufgrund von erhöhten Nierenfunktions Einschränkungen angewandt werden mussten. Dennoch stehen den protektiven Eigenschaften Amifostins auch unerwünschte Wirkungen gegenüber. Im Vordergrund steht dabei ein vorübergehender starker Abfall des Blutdrucks sowie Übelkeit und Erbrechen. Des Weiteren bestehen Bedenken über

mögliche Einschränkungen der anti-neoplastischen Cisplatinwirkung durch gleichzeitige Gabe Amifostins [124, 125].

Trotz der assoziierten Nebenwirkungen, den Bedenken der Beeinträchtigung der Cisplatinwirkung sowie hohen Behandlungskosten, wird die Gabe von Amifostin als präventive Applikation in der klinischen Praxis angewandt, gerade bei älteren Patienten mit bereits eingeschränkten Nierenfunktion und anderen Risikofaktoren. Ob die langfristigen Auswirkungen dieser Supportivmaßnahme positiver oder negativer Natur bestehen, ist aktuell nicht bekannt.

1.6.2.2 Liponsäure

α -Liponsäure (5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentansäure, LA) ist als Coenzym Bestandteil der mitochondrialen Enzyme, die im Pyruvatdehydrogenase-Komplex oxidative Decarboxylierungen katalysieren [126]. Sowohl in eukaryotischen, als auch in prokaryotischen Zellen ist das Coenzym enthalten. Der vollständige enzymatische Ablauf der *De-novo*-Synthese von α -Liponsäure konnte bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden [127]. Das Dithiol weist sowohl in seiner reduzierten Form (Dihydroliponsäure), als auch in der oxidierten Form, potente antioxidative Eigenschaften auf.

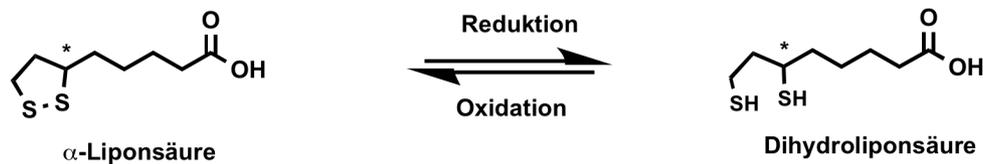


Abbildung 13: α -Liponsäure in seiner oxidierten und reduzierten Form als Dihydroliponsäure.

Beide Formen können Metallkomplexe ausbilden und eignen sich als Radikalfänger von reaktiven Sauerstoffspezies im Zytosol und in hydrophoben Kompartimenten. Die reduzierte Form verfügt über stärkere antioxidative Eigenschaften und spielt eine bedeutende Rolle bei zellulären Recyclingmechanismen wichtiger Radikalfänger, wie Glutathion, Ascorbat und Tocopherol [127]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde α -Liponsäure bereits in unterschiedlichsten Anwendungen getestet und zeigte therapeutisches Potential bei neurodegenerativen Erkrankungen, Schwermetallvergiftungen und oxidativen Gewebeschädigungen [128-131]. Da oxidativer Stress unter anderem ein Schlüsselement der nephrotoxischen Nebenwirkungen Cisplatins ist (Kapitel 1.6.1), wurde der Wirkstoff

1. Einleitung

bereits in mehreren präklinischen Studien als Protektivum wirkungsvoll eingesetzt. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht literaturbekannter Studien mit allen wichtigen Parametern des Studiendesigns.

Tabelle 2: Übersicht der präklinischen Studien über den therapeutischen Effekt von α -Liponsäure auf die Nephrotoxizität Cisplatin.

Tiermodell	LA-Dosis [mg/kg]	Appl.-route	Lsgs.-mittel	CP-Dosis [mg/kg], i.p.	Euthanisierung	Lit.
Wistar-Ratte	25, 50, 100	i.p.	NaCl	16	Tag 3	[132]
C57/BL/6-Maus	10, 100	i.p.	n/a	20	Tag 3	[133]
Sprague-Dawley-Ratte	50	i.p.	n/a	6	Tag 3	[134]
Swiss-Albino-Maus	20	oral	EtOH	12	Tag 18	[135]
Sprague-Dawley-Ratte	100	i.p.	n/a	7	Tag 4	[136]
Wistar-Ratte	100	i.p.	n/a	10	+ 24 h	[137]

Die Applikationszeitpunkte und Häufigkeiten der Liponsäuregabe variierten dabei sehr stark, jedoch kann zusammengefasst werden, dass in allen Studien vor Cisplatingabe mindestens eine Dosis des Protektivums verabreicht wurde. Bei der Hälfte der sechs Studien wurden zusätzlich nach dem Zytostatikum weitere Dosen der α -Liponsäure appliziert. Unbefriedigend sind die Angaben hinsichtlich der verwendeten Lösungsmittel. Da als Vehikel in der Placebo-Gruppe fast alle isotonische Kochsalzlösung verwendeten, kann davon ausgegangen werden, dass in einem Großteil der Studien Wirkstofflösungen in 0,9 %iger NaCl verwendet wurden. Dennoch bleibt dieser Parameter ungeklärt.

Unterschiedliche Parameter dienten der Untersuchung des therapeutischen Effekts der α -Liponsäure auf die Nierenfunktion. Neben klassischen Nierenfunktionsparametern, wie Kreatinin und Harnstoff dienten Glutathion- und Lipidperoxidationskonzentrationen als Marker für oxidativen Stress. TNF- α - und Platinkonzentrationen, Caspase-3-Aktivitäten, und histopathologische Untersuchungen wurden als Parameter für den Einfluss der Liponsäure auf die nephrotoxische Wirkung des Cisplatin herangezogen.

Alle erwähnten Studien zeigten signifikante Verbesserungen der Nierenfunktionen durch die Gabe von α -Liponsäure in den unterschiedlichen verwendeten Dosen (**Tabelle 2**). α -Liponsäure bewirkte eine Abnahme des oxidativen Stresses, was sich positiv auf die Nierenfunktionsparameter auswirkte [132-135, 137]. Des Weiteren wurden positive Auswirkungen auf Entzündungsprozesse (TNF- α) und Apoptose-Kaskaden (Caspase-3-Aktivität) ermittelt [135, 137]. Interessanterweise konnte sogar ein Einfluss auf die Cisplatin-Eliminierung in den Nieren beobachtet werden, da die behandelten Tiere geringere Platinkonzentrationen aufwiesen [132]. Somani *et al.* konnte sogar eine dosisabhängige

Wirkung der α -Liponsäure (25, 50 und 100 mg/kg) in fast allen untersuchten Parametern nachweisen. Bae *et al.* berichtete hingegen, dass die Hochdosis α -Liponsäure von 100 mg/kg in Vorversuchen toxisch auf die Tiere wirkte, was durch hohe Mortalitätsraten und starker Gewichtsabnahme kenntlich wurde. Hingegen zeigte die Niedrigdosis von 10 mg/kg bei den Sprague-Dawley-Ratten keine Wirkung auf die Nierenfunktion [134].

Aufgrund des Potentials der α -Liponsäure Metalle zu komplexieren, bestehen bei der Behandlung mittels α -Liponsäure Bedenken darüber, ob die Antitumorwirkung Cisplatin durch die Anbindung von α -Liponsäure an Cisplatin beeinträchtigt werden könnte [113]. Hussein *et al.* konnte in seinen Versuchen mit einem Tumor-Mausmodell keinen Einfluss der Liponsäure auf die anti-neoplastische Wirkung Cisplatin ermitteln [137]. Dabei galt die Abnahme des Tumorumfanges als Parameter in einem Zeitraum von 24 Stunden.

Trotz der sehr vielversprechenden Ergebnisse, die bereits durch unterschiedliche Studien im Tiermodell bestätigt werden konnten, sind keine klinischen Studien bekannt, die α -Liponsäure als Supportivmaßnahme einer Cisplatin-Chemotherapie in Betracht gezogen haben. Gegebenenfalls werden weitere präklinische Studien benötigt, um eine Beeinträchtigung der Cisplatin-Wirkung durch α -Liponsäure ausschließen zu können.

1.6.2.3 Silybin

Bei Silybin, auch Silibinin genannt, handelt es sich um die pharmakologisch potenteste Substanz des Stoffkomplexes Silymarin, das aus den Früchten der Mariendistel gewonnen wird. Aufgrund seiner antioxidativen [138] und antiinflammatorischen [139] Eigenschaften wird der Naturstoff klinisch bei chronischen Entzündungserkrankungen der Leber, bei Leberzirrhose sowie bei akuten Vergiftungen durch die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes eingesetzt [140, 141]. Der leberschützende Effekt Silybins ist auf die zellmembranstabilisierende Wirkung und die Erhöhung der intrazellulären Glutathion-Konzentration zurückzuführen [142, 143].

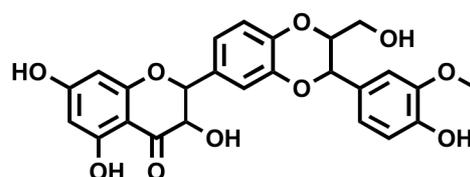


Abbildung 14: Struktur des Flavanoids Silybin.

1. Einleitung

Des Weiteren konnten bereits *in vitro* und *in vivo* zusätzlich nephroprotektive Wirkungen des Flavonoids gezeigt werden [144-150]. Dabei galt ein besonderes Augenmerk der Studien auf die cisplatininduzierte Nephrotoxizität. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht aller bereits durchgeführten *In-vivo*-Studien mit allen wichtigen Parametern wieder. Die Applikationszeitpunkte variierten von einer bis zwei Stunden vor Cisplatingabe sowie zwei Stunden danach.

Tabelle 3: Übersicht aller *In-vivo*-Studien über die nephroprotektive Wirkung Silybins bei Cisplatingabe.

Tiermodell	Dosis	App.-Route	Infusionslösung	Cisplatin-Dosis	Euthanisierung	Lit.
Wistar-Ratte	200 mg/kg Silybin	i.v.	NaCl	5 mg/kg, i.v.	Tag 7	[150]
Wistar-Ratte	200 mg/kg Silybin	i.v.	NaCl	5 mg/kg, i.v.	Tag 11	[144]
Wistar-Ratte	50 mg/kg Silymarin	i.p.	NaCl/Methyl-cellulose	3 mg/kg, i.p.	Tag 5	[145]
Sprague Dawley	50 mg/kg Silymarin	i.p.	Propylenglycol/NaCl	5 mg/kg, i.v.	Tag 14	[149]

Alle Studien konnten durch die Gabe des Naturstoffs Silybin einen protektiven Effekt erzielen. Als Parameter dienten dabei die Kreatinin-Clearance, Serum-Harnstoffkonzentrationen sowie Magnesiumkonzentrationen und die Exkretion tubulärer Enzyme. Bei der Überprüfung der Signifikanzen fällt jedoch auf, dass lediglich eine Studie signifikante Verbesserungen der Nierenfunktionsparameter im Vergleich zur Cisplatin-Kontrollgruppe aufzeigen konnte [145]. Gaedeke *et al.* und Bokemeyer *et al.* konnten in den Nierenfunktionsparametern Harnstoff und Kreatinin lediglich Verbesserungen im Mittelwert aufzeigen, die jedoch aufgrund von hohen Standardfehlern keine statistische Signifikanz aufweisen [144, 150]. Abdelmeguid *et al.* fokussierte sich lediglich auf histologische Veränderungen, so dass hier keine Daten der Nierenfunktionsparameter vorliegen [149]. *In-vitro*-Studien in drei unterschiedlichen etablierten Hodentumor-Zelllinien konnten durch die gleichzeitige Gabe von Silybin und Cisplatin keine Inhibierung der anti-neoplastischen Wirkung Cisplatin ermitteln [150]. Diese Ergebnisse lieferten die Basis für eine randomisierte klinische Studie im Jahr 2015, die die nephroprotektive Wirkung des Stoffkomplexes Silymarins auf die cisplatinassoziierte Nephrotoxizität bei Patienten untersuchte [151]. 60 Patienten mit unterschiedlichen malignen Tumoren nahmen an der Studie teil. Die Behandlungsgruppe erhielt jeweils 140 mg zweimal pro Tag Silymarin oral verabreicht, sieben Tage vor Cisplatingabe und währenddessen. Drei Tage nach der Cisplatinbehandlung konnten keine signifikanten Unterschiede bei Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff ermittelt werden, jedoch zeigten sich signifikante Unterschiede 14 Tage nach der Behandlung in beiden ermittelten Parametern ($p(\text{BUN}) = 0,027$ vs. Kontrolle, $p(\text{Kreatinin}) = 0,001$) [151]. Trotz fehlender Placebo-Gruppe, so-

wie fehlenden Langzeituntersuchungen und weiteren Dosis-Wirkungs-Tests, wird die Gabe Silymarins aufgrund der ermittelten Ergebnisse, den geringen Nebenwirkungen und dem guten Sicherheitsprofil, als Prophylaktikum bei Cisplatin-Behandlungen empfohlen.

Interessanterweise konnte Giacomelli *et al.* *in vitro* und *in vivo* durch die Gabe Silybins sogar eine verstärkende anti-Tumorwirkung Cisplatins feststellen [152]. Silybin wurde dabei als Phospholipid-Komplex verabreicht, der die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs erhöht. Die genauen Wirkungsmechanismen und der potenzierende Effekt konnten durch diese Studie nicht näher erklärt werden und benötigen weitere Studien.

1.6.2.4 Carvedilol

Carvedilol ist ein verschreibungspflichtiger Wirkstoff aus der Gruppe der Betablocker, der zur Behandlung gegen Bluthochdruck, Angina Pectoris und bei chronischer Herzinsuffizienz zum Einsatz kommt. Dem Wirkstoff selbst und seinen Metaboliten werden starke antioxidative Eigenschaften zugeschrieben, die über zehnmal höher als bei Vitamin E sein sollen [153].

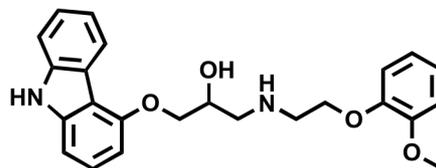


Abbildung 15: Strukturformel Carvedilol.

Die Wirkung Carvedilols und seiner Metabolite wird dem Carbazol-Rest des Wirkstoffs zugesprochen [154-156]. Zwei unterschiedliche antioxidative Mechanismen wurden dabei diskutiert: Zum einen ermöglicht der Wirkstoff das Abfangen freier Radikale und zum anderen konnten Carvedilol-Eisenchelate isoliert werden, was die Ausbildung freier Hydroxylradikale inhibiert [157-159]. Dos Santos *et al.* erforschte in den letzten Jahren ausgiebig die protektive Wirkung Carvedilols auf cisplatinassoziierte renale Schädigungen [160-165]. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der verwendeten Tiermodelle mit allen wichtigen Parametern der Studiendesigns.

1. Einleitung

Tabelle 4: Übersicht aller In-vivo-Studien über die nephroprotektive Wirkung Carvedilols bei Cisplatingabe.

Tiermodell	Dosis	Appl.-Route	Infusionslösung	Cisplatin-Dosis	Euthanisierung	Lit.
Wistar-Ratte	5 mg/kg	oral	H ₂ O + Methylcellulose	7 mg/kg, i.p.	Tag 5	[166]
Swiss-Maus	10 mg/kg	oral (Sonde)	H ₂ O + Methylcellulose	25 mg/kg i.p.	Tag 3	[162, 163]
Wistar-Ratte	1 mg/kg	i.p.	DMSO	10 mg/kg i.p.	Tag 3	[161, 164]

In allen angegebenen Studien konnten in beiden Tiermodellen erstaunliche Verbesserungen der Nierenfunktionsparameter ermittelt werden. Die Serumkonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff zeigten durch die Behandlung mit Carvedilol nur einen sehr geringen bis keinen Anstieg vom Normalwert. Histologische Untersuchungen unterstützen die Ergebnisse der Nierenfunktionsparameter. Parameter oxidativen Stresses, wie Glutathion- und NADPH-Konzentrationen erreichten durch die Gabe Carvedilols teilweise höhere Konzentrationen als in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die protektive Wirkung Carvedilols auf dessen antioxidative Eigenschaften beruht [158, 161, 164, 166]. In weiterführenden Untersuchungen zu den antioxidativen Eigenschaften Carvedilols konnte gezeigt werden, dass durch den Wirkstoff keine Neutralisierung freier Radikale wie DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) und TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy) stattfand. Jedoch konnte beobachtet werden, dass Carvedilol effizient freie Eisentome bindet und damit Fenton-Reaktionen aktiv inhibiert, die für die Formation von Hydroxylradikalen verantwortlich ist [162]. Bei Hydroxylradikalen handelt es sich um hochreaktive Sauerstoffspezies, die bei der Nephrotoxizität Cisplatins eine Schlüsselrolle spielen [167].

Des Weiteren konnte Rodrigues *et al.* zeigen, dass Carvedilol keine Konjugation mit dem platinhaltigen Zytostatikum eingeht und nicht die Akkumulation von Cisplatin im Tumor oder den Nieren senkt [161-163]. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die protektive Wirkung Carvedilols auf einer Senkung der renalen Cisplatinakkumulation beruht. Die Gabe Carvedilols zeigte im Tumormausmodell keine Beeinträchtigung der anti-neoplastische Wirkung Cisplatins [162].

Da es sich bei Carvedilol um einen Beta-Blocker handelt, bestehen Bedenken darüber, ob durch die Gabe des Wirkstoffs gegebenenfalls unerwünschte Wirkungen auf Blutdruck, Puls sowie Beeinflussungen der renalen Hämodynamik auftreten. Diesbezüglich werden weitere Studien benötigt, um unerwünschte Nebeneffekte dieser Supportivmaßnahme auch bei niedriger Dosen auszuschließen. Vermutlich wurden aufgrund dieses Risikopotentials bisher keine klinischen Studien durchgeführt.

1.6.2.5 Apocynin

Bei Apocynin, meist auch Acetovanillon genannt, handelt es sich um einen Inhibitor der NADPH-Oxidase (NOX) [168-170]. Dieses Enzym ist für den Transport von Elektronen verantwortlich, die zur Reduktion von Sauerstoff zum reaktiven Superoxid (O_2^-) führt. Superoxide sind reaktive Sauerstoffspezies, die teilweise zu weiteren höher toxischen Substanzen, wie Hydrogenperoxid oder Peroxidnitrit konvertieren können [171]. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen auch bei der cisplatininduzierten Nephrotoxizität eine bedeutende Rolle, wobei noch nicht geklärt werden konnte, wie es zu den erhöhten Konzentrationen von ROS in renalen Zellen kommt. Die Entstehung der Superoxide könnte mit der mitochondrialen Atmungskette und den zugehörigen Oxidase-Enzymen, wie zum Beispiel NOX zusammenhängen. Durch extrazelluläre Stimulatoren, wie zum Beispiel Cisplatin, kommt es zu Phosphorylierungen von NOX, was zu einer Überproduktion an ROS führt [172]. In unterschiedlichen Nierenerkrankungen findet sich eine erhöhte Expression der NADPH-Oxidase, was zu erhöhtem oxidativem Stress führt [173, 174]. Die inhibierende Wirkung Apocynins auf die NOX, und damit auf die Entstehung von ROS, könnte bei der cisplatininduzierten Nephrotoxizität positive Effekte zeigen. Zwei unterschiedliche Studien wurden bereits durchgeführt, um die protektive Wirkung Apocynins bei Cisplatingabe zu erforschen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht aller In-vivo-Studien über die nephroprotektive Wirkung Apocynins bei Cisplatingabe.

Tiermodell	Dosis	Appl.-Route	Infusionslösung	Cisplatin-Dosis	Euthanisierung	Lit.
Wistar-Ratte	n/a	oral im Trinkwasser	H ₂ O	7,5 mg/kg, i.p.	Tag 3	[172]
C57BL/6 Maus	3, 10 mg/kg	i.p.	NaCl	20 mg/kg, i.p.	Tag 3	[175]

Die Ergebnisse der Studien zeigten, dass durch Apocynin die cisplatininduzierte Erhöhung der Serumkonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff um ca. 50 % gesenkt werden konnte. Renale Gewebeveränderungen durch die Gabe des Zytostatikums konnten ebenso durch die Behandlung über Apocynin stark eingedämmt werden. Der protektive Effekt Apocynins steht eindeutig mit der Senkung cisplatininduzierten oxidativen und nitrosativen Stresses in Zusammenhang, was über die Messung der renalen Malondialdehyd-Konzentration bestätigt werden konnte [172]. Durch die Inhibierung der NOX durch Apocynin konnte eine Senkung des oxidativen Stresses erzielt werden. Wang *et al.* konnten sogar eine dosisabhängige Verbesserung der Nierenfunktionsparameter ermitteln. Dennoch verweist er darauf, dass durch die Gabe Apocynins kein vollständiger Schutz vor renalen Schä-

1. Einleitung

digungen erzielt werden konnte, da andere ROS-Quellen identifiziert werden müssen sowie weitere Mechanismen (p53, Glutathion, MAPKs etc.) zur Nephrotoxizität Cisplatins beitragen [175].

Des Weiteren konnte trotz hoher Apocyninkonzentrationen kein Einfluss auf die Proliferation von humanen Blasenkrebszellen beobachtet werden. Damit kann eine Beeinträchtigung der Antitumor-Wirkung Cisplatins durch eine prophylaktische Behandlung mittels Apocynins offensichtlich ausgeschlossen werden. Es konnten sogar verstärkte anti-neoplastische Wirkungen Cisplatins in Kombination mit Apocynin erzielt werden [175]. Welcher Mechanismus jedoch hinter der verstärkenden Wirkung liegt, gilt es dabei noch zu klären.

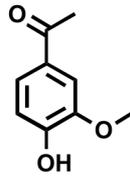


Abbildung 16: Strukturformel Apocynin.

Die verwendeten Dosen waren für die Tiere gut verträglich. Es konnten keine adversen Effekte oder Veränderungen des Körpergewichts oder im Verhalten beobachtet werden [175]. In Kombination mit der erzielten protektiven Wirkung ist Apocynin neben einer Hydratation potentiell als Supportivmaßnahme bei Cisplatinbehandlungen geeignet. Dennoch wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt keine klinischen Studien durchgeführt.

2 Aufgabenstellung

Konventionelle Maßnahmen zur Senkung der Nephrotoxizität Cisplatin verbleiben bis dato unbefriedigt, insbesondere bei der Verwendung höherer Dosen sowie bei kumulativen Gaben des Zytostatikums. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch einen gezielten Transport von literaturbekannten protektiven Wirkstoffe in die proximalen Tubuluszellen eine Erhöhung der Wirksamkeit dieser Wirkstoffe erzielt werden. Ferner galt als Ziel, potentielle Nebenwirkungen sowie Beeinträchtigungen der anti-neoplastischen Wirkung Cisplatin durch das renale *Targeting* zu umgehen. Das Peptid (KKEEE)₃K-NH₂ wurde dabei als nierenspezifischer Carrier verwendet, um die Wirkstoffe gezielt in die proximalen Tubuluszellen zu transportieren.

Als Grundlage sollten zunächst stabilisierende Modifikationen des Carriers getestet werden, um frühzeitige proteolytische Spaltungen zu vermeiden. Anschließend galt es eine Auswahl potenter Wirkstoffe an den Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ zu konjugieren. Um eine ausreichende Stabilität der Konjugate sowie eine Freisetzung des Wirkstoffs zu evaluieren, wurden Plasmastabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Darauf aufbauend sollten γ -szintigraphische Untersuchungen Aufschluss über die pharmakokinetischen Eigenschaften der Konjugate liefern und einen Wirkstofftransport in die Nieren bestätigen.

Über die Auswahl eines geeigneten Tiermodells und Parameter sollte anschließend eine Erhöhung der Wirksamkeit der konjugierten Wirkstoffe im Vergleich zu den freien Wirkstoffen *in vivo* gezeigt werden. Die Ergebnisse sollten zum einen den *Targeting*-Effekt aufzeigen und zum anderen als Grundlage für weiterführende Studien zur Supportivmaßnahme einer Cisplatin-Chemotherapie dienen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Aufnahmemechanismus von $(KKEEE)_3K-NH_2$

Um die genaue Lokalität der Anreicherung des Peptids zu analysieren, wurde eine FITC-Antikörper-Färbung durchgeführt (Kapitel 6.1.12.1). Dazu wurde ein FITC- $(KKEEE)_3K$ -Konjugat (**7**) synthetisiert, welches intravenös appliziert wurde. Eine Stunde nach der Applikation erfolgte eine Euthanasierung des Tiers und Entnahme der Organe. Über eine indirekte Immunfluoreszenz-Methode mittels Primär- und Sekundärantikörper entsteht bei Vorhandensein des FITC- $(KKEEE)_3K$ -Konjugat (**7**) ein sichtbarer Farbstoff [176], was in dem angewandten Protokoll eine braunrote Verfärbung entspricht. **Abbildung 17, A+B** zeigen diese braunrote Färbung im äußeren Ring der Niere, was auf eine erhöhte Aufnahme des FITC-Konjugats (**7**) im Nierencortex deutet. Unter vergrößerter Ansicht ist eine Akkumulation des Konjugats an der apikalen Seite der proximalen Tubuluszellen und innerhalb zu erkennen (**Abbildung 17, C**). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass keine Anreicherung des Peptids im Glomerulum der Nieren stattfindet (**Abbildung 17 D**).

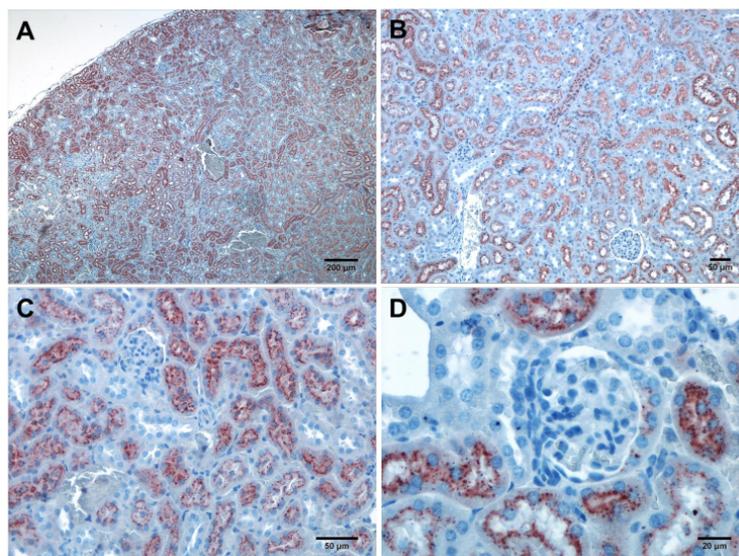
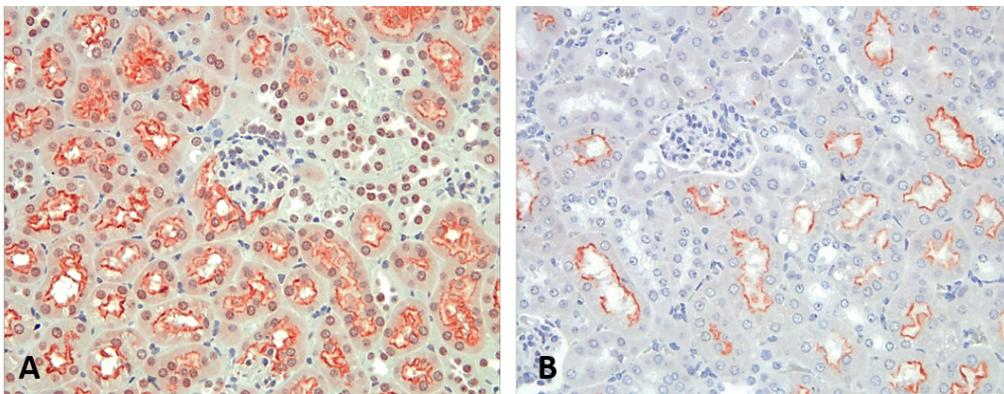


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Nierensektionen, eine Stunde nach intravenöser Applikation von FITC- $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**7**) [33]. **A+B:** Die braunrote Färbung weist auf eine erhöhte Aufnahme von FITC- $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**7**) im Nierencortex hin. **C:** Verstärkte Braunfärbung der apikalen Seite der proximalen Tubuli. **D:** Aufnahme von FITC- $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**7**) in proximale Tubuli, keine Akkumulation im Glomerulum.

Um detaillierte Informationen über die Aufnahme von $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) in die proximalen Tubuluszellen zu erhalten, wurden Versuche mit Megalin-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Histoschnitte in **Abbildung 18** zeigen die Aufnahme des FITC-Konjugats (**7**) im Wildtyp (**A**) im Vergleich zu der signifikant niedrigeren Aufnahme, gemessen an der Braunfärbung bei der Megalin-defizienten Maus (**B**). Daraus kann geschlossen werden, dass das Peptid $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) spezifisch über den Megalin-Rezeptor endozytisch in die proximalen Tubuli aufgenommen wird. Absättigungsversuche über das Peptid Octreotid, das über den Megalin-Rezeptor aufgenommen wird [177], verstärken diese Annahme [35].



*Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung der Nierenrinde, eine Stunde nach intravenöser Applikation von FITC- $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**7**) in einer Wildtyp-Maus (**A**) und in einer Megalin-defizienten Maus (**B**) [33].*

3.2 Einfluss von Pegylierung auf die Pharmakokinetik von $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**)

Plasmastabilitätsuntersuchungen in humanem Plasma ergaben Stabilitäten des Peptids $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) von über 24 Stunden [33]. Um dennoch eine Erhöhung der proteolytischen Resistenz des Carriers zu erzielen und somit gleichzeitig den Wirkstoff-Transport zu optimieren, wurden unterschiedliche Modifikationen durchgeführt und pharmakokinetisch untersucht.

Eine Methode zur Verhinderung des proteolytischen Abbaus peptidischer Wirkstoffe ist die Pegylierung. Dabei werden Polyethylenglycolketten (PEG-Ketten) an den Wirkstoff gekoppelt, die diesen vollständig umhüllen/maskieren und dadurch zuverlässig einen Abbau durch Antikörper oder körpereigenen Enzymen verhindern [178, 179]. Zur Untersuchung des Einflusses einer Pegylierung auf die Pharmakokinetik von $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) wurde eine funktionalisierte 5-kDa-PEG-Kette über eine Thioetherbindung an den Carrier gebunden. Details zur Synthese des PEG-Konjugats (**15**) sind im Abschnitt 6.2 näher erläutert.

Die szintigraphische Verteilung des pegylierten Carriers (**15**) zeigt weiterhin eine schnelle und sehr spezifische Akkumulation in beide Nieren (**Abbildung 19**). Trotz der erheblichen Veränderung der molaren Masse durch die PEG-Kette kann keine signifikante Veränderung der Spezifität des Carriers beobachtet werden (siehe im Vergleich **Abbildung 4**). Laut Literatur bewirkt Pegylierung längere Verweilzeiten der Wirkstoffe im Organismus und deutlich verlangsamte renale Ausscheidungen, sodass eine verbesserte pharmakologische Effizienz (Dosis-Wirkungs-Beziehung) erzielt wird [179]. Dieser Einfluss kann mit den hier gezeigten Daten nicht bestätigt werden, da keine verlängerte Zirkulation szintigraphisch ersichtlich ist.

Dennoch kann beobachtet werden, dass der pegylierte Carrier (**15**) im Vergleich zum „nackten“ Carrier (**1**) in den Nieren deutlich langsamer abgebaut wird (**Abbildung 19**). Erst nach vier Stunden können erste Mengen radioaktiver Strahlung in der Blase detektiert werden. Des Weiteren befinden sich im Vergleich zum Carrier noch größere Mengen in den Nieren, was daraufhin deutet, dass die Pegylierung scheinbar den proteolytischen Abbau auch innerhalb der Zellen inhibiert.

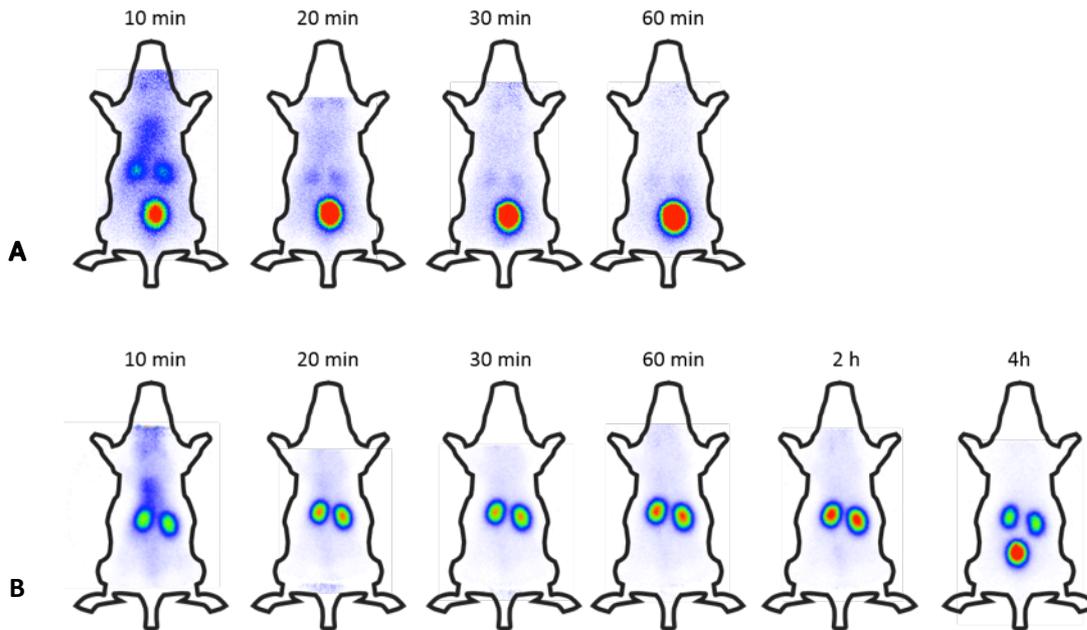


Abbildung 19: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I -y-PEG (21) (A) und ^{125}I -y(KKEEE)₃KC(S-Mal-PEG)-NH₂ (15) (B) nach intravenöser Applikation in jeweils eine NMRI-Maus.

3.3 (KKEEE)₃K-NH₂ als peptoidische Struktur NTyr(NLys-NLys-NGLu-NGLu-NGLu)₂NLys-NH₂ (23)

Bei Peptoiden (oligo-*N*-substituierte Glycine) handelt es sich um eine neuartige Klasse von Peptidmimetika, die sich von Peptiden dahingehend unterscheiden, dass ihre Seitenketten anstatt am α -Kohlenstoff an das Stickstoffatom gebunden sind. Peptoide können keine klassischen Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen ausbilden, da ihre tertiären Amine keine Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können [180]. Jedoch kann es durch die Einführung bestimmter Seitenkettengruppen zur Ausbildung komplexer peptoidspezifischer Strukturen vergleichbar mit α -Helix, β -Faltblättern, Schleifen und Drehungen kommen [181, 182], die strukturelle Eigenschaften von Peptiden nachahmen können. Diese einzigartige Struktur verleiht den Peptoiden unterschiedliche pharmakologische Vorteile im Gegensatz zu Peptiden. So zum Beispiel sind Peptoide sehr viel stabiler gegenüber proteolytischem Abbau und verfügen über eine verbesserte Bioverfügbarkeit durch eine erhöhte Zellpermeabilität (Resorption) im Vergleich zu Peptiden [180, 183]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde der Carrier mit seiner alternierenden Sequenz aus Lysin und Glutaminsäure als peptoidische Struktur als NTyr(NLys-NLys-NGLu-NGLu-NGLu)₂NLys-NH₂ (23) synthetisiert, radiomarkiert und szintigraphisch auf dessen pharmakokinetischen Eigenschaften untersucht. Details zur Synthese können Kapitel 6.1.2 entnommen werden.

3. Ergebnisse

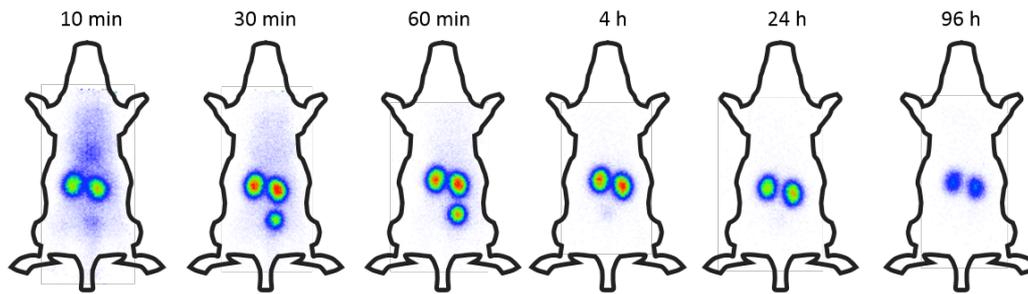


Abbildung 20: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I -NTyr(NLys-NLys-NGlu-NGlu-NGlu) $_2$ NLys-NH $_2$ (**23**) nach intravenöser Applikation in eine NMRI-Maus.

Die Ergebnisse der szintigraphischen Verteilung veranschaulichen ähnliche Eigenschaften des Peptids (**23**) im Vergleich zum peptidischen Carrier (**1**) (**Abbildung 20**). Eine rapide Akkumulation in den Nieren mit hoher Spezifität kann ebenfalls bereits 10 Minuten nach intravenöser Applikation beobachtet werden. Dennoch zeigen sich im Vergleich zum Peptid unterschiedliche Exkretionskinetiken. Bereits 30 Minuten nach der Injektion können größere Mengen Radioaktivität in der Blase detektiert werden. Gleichzeitig jedoch können drei Tage nach Injektion immer noch Anreicherungen des markierten Peptoids in den Nieren ermittelt werden, woraus sich eine Resistenz des Peptoids gegenüber proteolytischem Abbau ableiten lässt.

Nach Konjugation von α -Liponsäure an den peptidischen Carrier NTyr(NLys-NLys-NGlu-NGlu-NGlu) $_2$ NLys-NH $_2$ (**23**) kann ein spezifischer Transport des markierten Wirkstoffs in die Nieren bestätigt werden (**Abbildung 21**). Neben einer spezifischen Anreicherung in den Nieren, ist allerdings auch im oberen Abdomen weitere Radioaktivität sichtbar. Da auch hier eine proteolytische Resistenz des Peptoid-Konjugats besteht, kann angenommen werden, dass es sich um abgespaltenes Technetium handelt, das sich im Magen des Tiers anreichert. Vier Stunden nach Injektion wurde eine letzte szintigraphische Aufnahme durchgeführt, die immer noch hohe Mengen des Konjugats in den Nieren aufweist. Es kann von ähnlichen Pharmakokinetiken wie die des „nackten“ Peptoids (**Abbildung 20**) ausgegangen werden, sodass auch hier nur eine sehr langsame Eliminierung des Peptoids stattfindet. Detaillierte Eliminierungsmechanismen von Peptoiden sind jedoch aktuell nicht bekannt.

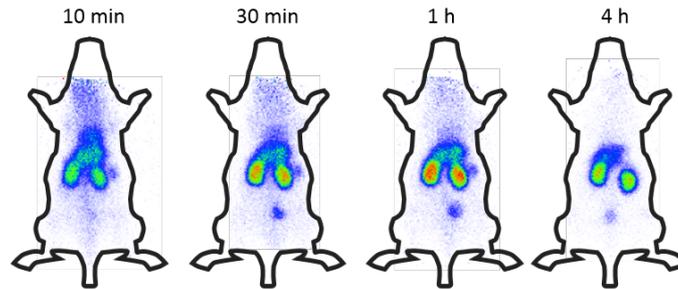


Abbildung 21: Szintigraphische Verteilung von $^{99m}\text{Tc-LA-(NLys-NLys-NGlu-NGlu-NGlu)}_2\text{NLys-NH}_2$ (24) nach intravenöser Applikation in eine NMRI-Maus.

3.4 Einfluss unterschiedlicher parenteraler Applikationsrouten auf Pharmakokinetik von $(\text{KKEEE})_3\text{K-NH}_2$ (1)

Peptide besitzen bekanntlich eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, weshalb bei der Untersuchung verschiedener Applikationsrouten lediglich parenterale Strategien in Frage kommen. Um den Einfluss der unterschiedlichen Applikationsrouten auf die Pharmakokinetik des Carriers $(\text{KKEEE})_3\text{K-NH}_2$ (1) zu untersuchen, wurden Szintigraphien nach intravenöser, subkutaner und intraperitonealer Applikation von $^{125}\text{I-}\gamma(\text{KKEEE})_3\text{K-NH}_2$ (3) durchgeführt und miteinander verglichen. **Abbildung 22** zeigt, dass nach intravenöser Applikation die schnellste nierenspezifische Anreicherung erzielt werden kann im Vergleich zu subkutaner und intraperitonealer Injektion. Bei subkutaner Gabe kann zunächst eine längere Verweildauer des Peptids an der Injektionsstelle beobachtet werden. Erst nach 40 Minuten ist eine spezifische Anreicherung des Peptids in beiden Nieren detektierbar, während die Aktivität an der Injektionsstelle abnimmt. Gleiche Eigenschaften können nach intraperitonealer Verabreichung beobachtet werden. Jedoch ist eine flächenmäßig größere Verteilung des Peptids an der Einspritzstelle ersichtlich im Vergleich zur subkutanen Injektion. Nach zwei Stunden zeichnet sich bei allen Applikationsrouten das gleiche Bild ab: Eine hohe Anreicherung in den Nieren und gleichzeitig bereits eine Exkretion über den Urin in die Blase.

3. Ergebnisse

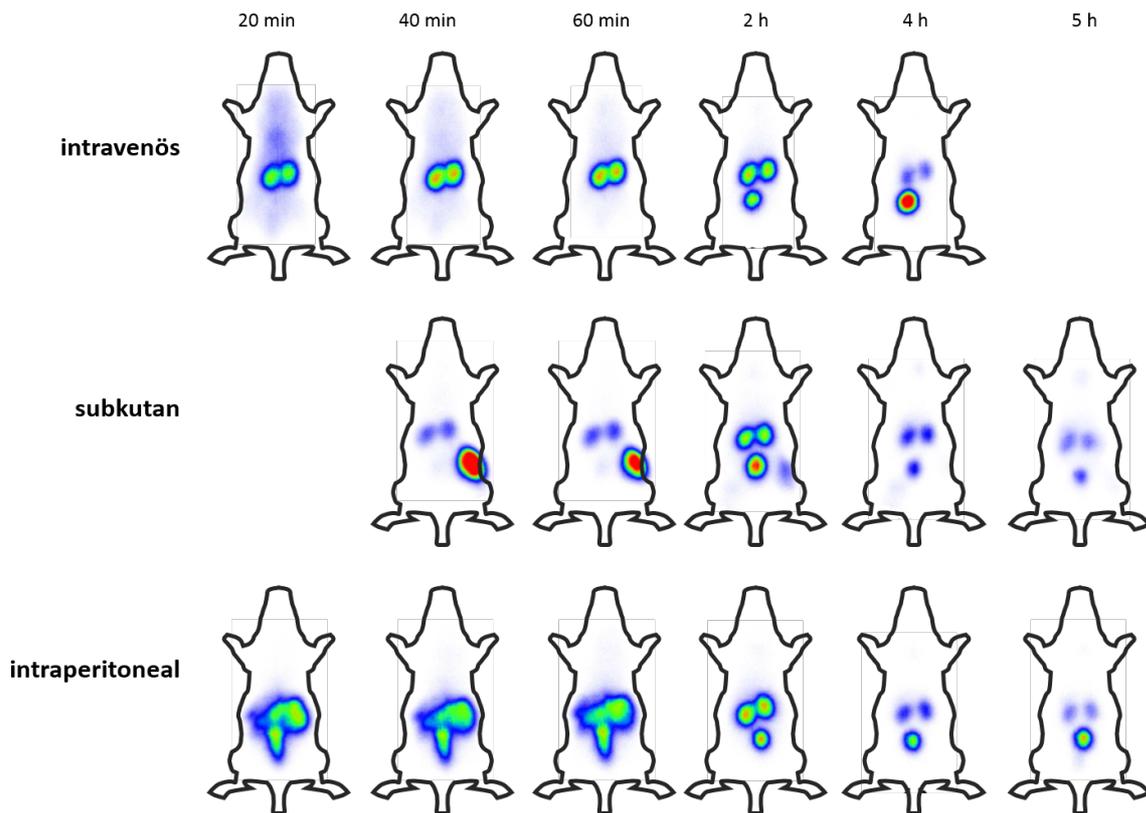


Abbildung 22: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I - γ -(KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (**3**) in jeweils eine NMRI-Maus bei unterschiedlichen parenteralen Applikationsrouten (intravenös, subkutan und intraperitoneal).

Es kann zusammengefasst werden, dass mittels intravenöser Gabe die schnellste nierenspezifische Anreicherung erzielt werden kann. Bei subkutane und intraperitoneale Verabreichung eine um ca. eine Stunde verzögerte Anreicherung von (KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (**1**) in den Nieren beobachtet werden kann.

3.5 Synthese und Pharmakokinetik potentieller Wirkstoff-Carrier-Konjugate zur supportiven Behandlung cisplatininduzierter Nierenschädigungen

In den folgenden Kapiteln werden unterschiedliche Wirkstoffe mit potenten antioxidativen Eigenschaften an den Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**) konjugiert. Dabei werden die verwendeten Synthesestrategien mit den angewandten Linker-Taktiken dargestellt und detailliert erläutert. Die Auswirkungen dieser Wirkstoffkopplungen werden anschließend *in vivo* über γ -Szintigraphien pharmakokinetisch untersucht. Um einen erfolgreichen Transport des Wirkstoffs zum Zielgewebe zu gewährleisten, sollten die synthetisierten Konjugate mit den verwendeten Verknüpfungsstrategien für den Transport ausreichende Plasmastabilitäten aufweisen. Deswegen wurden zuvor die Plasmastabilitäten der Konjugate in Maus-, Ratten- und Humanplasma unter physiologischen Bedingungen getestet. Die Ergebnisse dienen als Basis für die nachfolgenden Versuche der „NephroGuard-Studie“ (Kapitel 3.6).

3.5.1 Liponsäure-Konjugat

Bei α -Liponsäure (1,2-Dithiopentansäure) handelt es sich um einen Naturstoff, der als Coenzym im Fettstoffwechsel bei fast allen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen vorkommt. Zusammen mit seiner reduzierten Form, Dihydroliponsäure (6,8-Dithiooctansäure), wirkt es als starkes Antioxidans und Radikalfänger, welches für die Regeneration anderer wichtiger Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin E und Glutathion zuständig ist [127, 184]. Seit dem Jahre 1966 wird der Wirkstoff in Deutschland als Arzneistoff gegen Lebererkrankungen und bei peripheren Polyneuropathien eingesetzt [184]. Mit einem logP von 2,25¹ weist es lipophile Eigenschaften auf und verändert deshalb trotz geringer Molekülmasse von 204,2 g/mol die Eigenschaften des polaren Carriers (KKEEE)₃K-NH₂ erheblich. Detaillierte Informationen zu dem Wirkstoff und dessen protektive Wirkung während einer Cisplatin-Therapie sind in Kapitel 1.6.2.2 näher erläutert.

3.5.1.1 Synthese

Bei dem lipophilen Wirkstoff handelt es sich um eine Fettsäure, die zwei Schwefelatome in einer Ringstruktur beinhaltet. Diese Ringstruktur verleiht der Liponsäure ihre Wirkung als Komplexbildner und Antioxidans [127]. Deshalb könnte sich eine Konjugation des Wirkstoffs über die Schwefelatome

¹ berechnet über eine Software von www.molinspiration.com

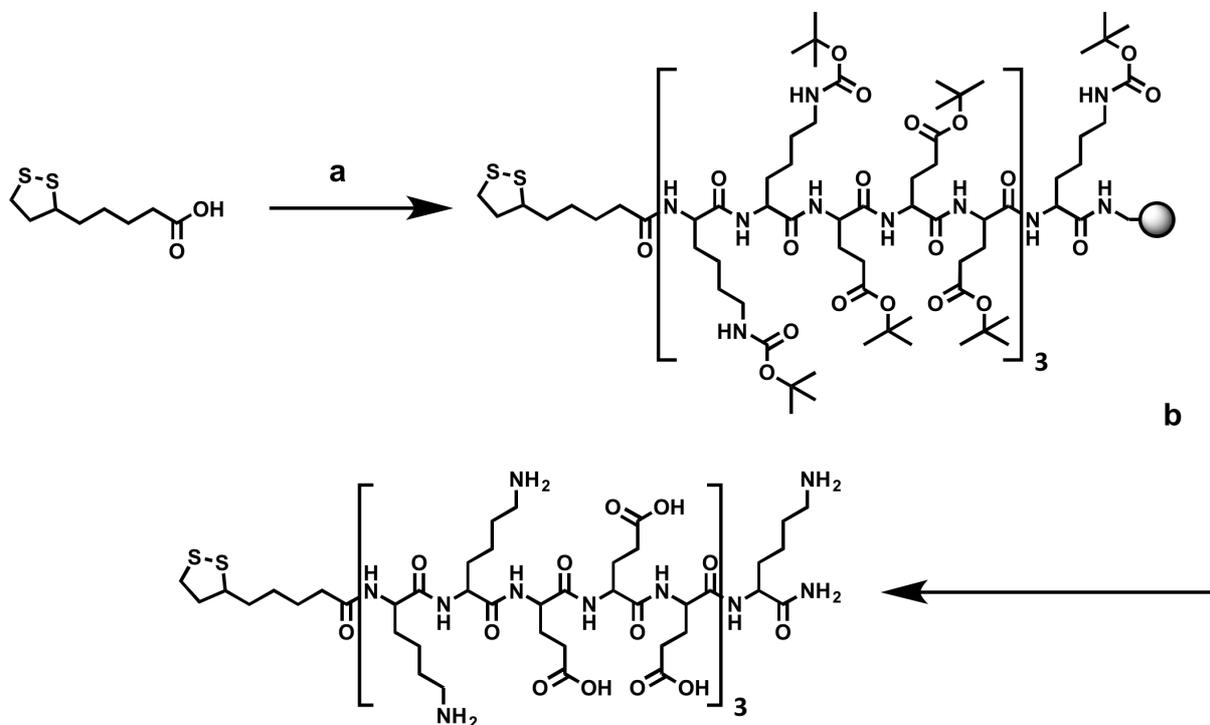
3. Ergebnisse

nachteilig auf die Effektivität der Liponsäure auswirken. Die Carboxygruppe hingegen eignet sich sehr gut für die Anbindung an den Carrier und eröffnet unterschiedliche Verknüpfungsmöglichkeiten. So ist zum Beispiel eine direkte Anbindung der Liponsäure an den Carrier über ein freies Amin möglich oder durch den Einsatz von Linkern kämen Ester- und Carbonat-Verknüpfungen in Frage. Es ist bereits literaturbekannt, dass Liponsäure intrazellulär teilweise proteingebunden durch die Ausbildung eines Amids zwischen der Carboxygruppe der Liponsäure und ϵ -Aminogruppen von Lysinen vorliegt [185]. Da die pharmakologische Effektivität der Liponsäure trotz Anbindung an Proteinen beibehalten bleibt und eine amidische Verknüpfung von allen Auswahlmöglichkeiten die größte Stabilität besitzt, wurde für alle folgenden Liponsäure-Konjugaten diese Verknüpfungsstrategie gewählt.

Neben der natürlichen L-Konfiguration ist auch die D-Liponsäure biologisch aktiv, sodass der Wirkstoff üblich als Racemat verwendet wird [186]. In allen folgenden Synthesen wurde deshalb das Racemat, DL- α -Liponsäure (Merck, Darmstadt) eingesetzt.

3.5.1.1.1 Liponsäure-(KKEEE)₃K (8) und Liponsäure-(KKEEE)₂K-Konjugat (9)

Bei der einfachen Beladung des Carriers wurden die besten Ausbeuten mit folgender Synthesestrategie erzielt (**Schema 3**).



Schema 3: Syntheschema der N-terminalen Anbindung von Liponsäure an den Peptidcarrier (KKEEE)_nK-NH₂ (1, 2). (a) α -Liponsäure, HBTU, DIEA, NMP, 1 h bei RT. (b) TFA/Thioanisol/Anisol (v/v/v, 90/8/2), 1 h bei RT.

Die Kopplung des Wirkstoffs wird auf der festen Phase durchgeführt nach bereits erfolgter Synthese des Carriers $(KKEEE)_nK-NH_2$. Da es aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten von Peptid und Liponsäure zu Löslichkeitsproblemen bei Reaktionen in homogener Phase gekommen wäre, bietet die Konjugation auf fester Phase diesbezüglich einen großen Vorteil. Die für die Festphase verwendeten Lösungsmittel NMP und DCM eigneten sich optimal für die Lösung aller verwendeten Substanzen (Liponsäure, HBTU, DIEA).

Nach Verwendung des Standard-Abspaltungscocktails TFA/TIS/ H_2O (v/v/v, 95/2,5/2,5) konnten über HPLC-MS-Analytik Nebenprodukte mit Molekularmassen von + 57 g/mol und 113 g/mol detektiert werden (**Abbildung 23**).

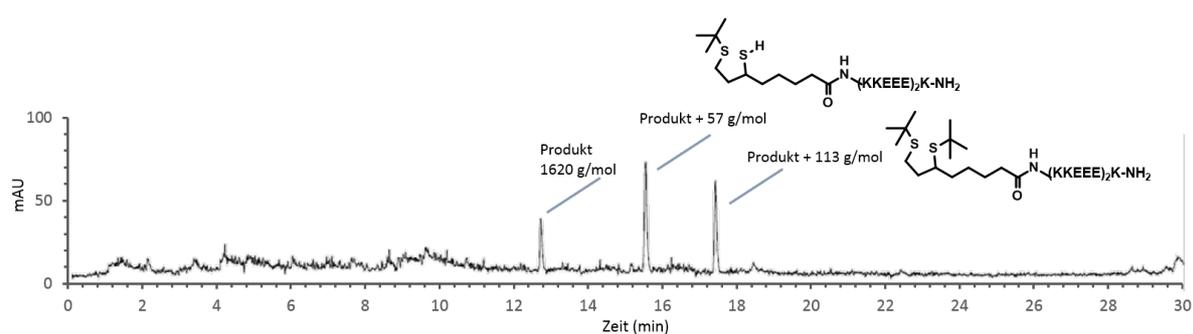


Abbildung 23: HPLC-MS-Analytik von $LA-(KKEEE)_3K-NH_2(8)$ nach Abspaltung über TFA/TIS/ H_2O (v/v/v, 95/2,5/2,5).

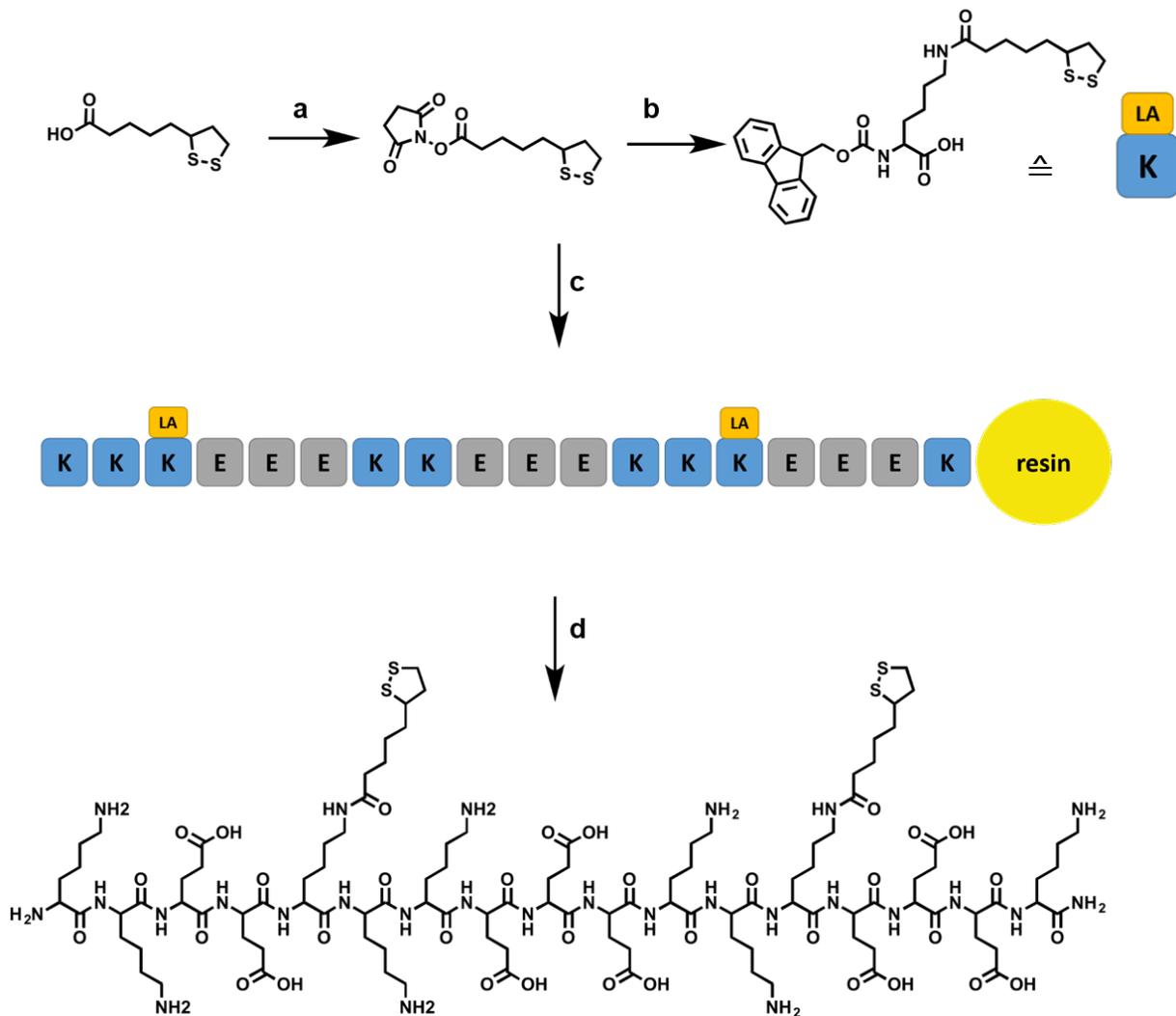
Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt mit gleichzeitiger globaler Entschützung der funktionellen Gruppen der Seitenketten. Der hohe Anteil der *tert.*-Butyl-haltigen Schutzgruppen führt unter den sauren Bedingungen der Abspaltung zu Alkylierungen der Schwefelatome der Liponsäure, was der mittels HPLC-MS-Analytik identifizierten Nebenprodukte mit einer Zunahme der Molekülmasse von 57 g/mol (einfach alkyliert) und 113 g/mol (zweifach alkyliert) entspricht (siehe auch **Abbildung 23**).

Die Verwendung anderer Scavenger-Reagenzien wie Thioanisol und Anisol statt Triisopropylsilan (TIS) verbessern die Ausbeute erheblich. Der verwendete Abspaltungscocktail TFA/Thioanisol/Anisol (v/v/v, 90/8/2) führte unter sonst gleichen Durchführungsbedingungen zu verbesserten Ausbeuten von bis zu 62 % im Vergleich zu 14 % Ausbeute bei Verwendung des Standard-Abspaltungscocktails.

3.5.1.1.2 $\text{KKK}_\epsilon(\text{LA})\text{EEEKKK}_\epsilon(\text{LA})\text{EEEKKK}_\epsilon(\text{LA})\text{EEEEK-NH}_2$ (10)

Um eine mehrfache Wirkstoffbeladung eines Peptids zu erreichen, müssen Konjugationen an den funktionellen Gruppen des Peptidrückgrats genutzt werden. Die Verwendung von orthogonalen Schutzgruppen für die ϵ -Aminogruppe von Lysin, zum Beispiel von Fmoc-Lys(Mmt)-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH oder Fmoc-Lys(Alloc)-OH neben Boc und *t*Bu wurde zunächst als bevorzugte Synthesestrategie angewandt. Jedoch führten die Kopplungsversuche nach orthogonaler Abspaltung der erwähnten Schutzgruppen zu starken Verunreinigungen und unbefriedigenden Ausbeuten. Deswegen wurden Aminosäure-Bausteine synthetisiert, die bereits mit dem Wirkstoff beladen wurden (**Schema 4, obere Reihe**). Diese synthetisierten Bausteine werden wie alle anderen Aminosäuren in der gewünschten Sequenz und Anzahl für die automatisierte Peptidsynthese eingesetzt (siehe Zweifach- oder Dreifachbeladung 10 und 11.).

Auch hier wurde eine Abspaltung mittels TFA/Thioanisol/Anisol (v/v/v, 90/8/2) angewandt, um Alkylierungen der Schwefelatome der Liponsäure zu verhindern (siehe vorheriges Kapitel). Da es sich bei der Liponsäure um eine lipophile Substanz handelt, entstanden nach Dreifachbeladung Löslichkeitsprobleme in wässrigen Formulierungen. Höhere Beladungsgrade (vierfache, fünffach, etc.) wurden deshalb nicht hergestellt.



Schema 4: Syntheschema einer multiplen Liponsäure-Konjugation am Peptidrückgrat über Lysin- ϵ -Verknüpfungen (10). (a) *N*-Hydroxy-succinimide, EDC, DMF; 4 h bei RT. (b) Fmoc-Lys-OH, HEPES-Puffer, pH 7.4/ Aceton (v/v, 1/1), 3 h bei RT. (c) Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, HBTU, DIEA, automatisierte Synthese. (d) TFA/Thioanisol/Anisol (v/v/v, 92/8/2) 1 ml/100 mg Resin, 1 h bei RT.

3.5.1.2 Plasmastabilität

Bei der Untersuchung der Plasmastabilität von Liponsäure-(KKEEE)₃K-NH₂ (**8**) traten unspezifische Matrixeffekte auf, sodass keine Quantifizierung der Substanz nach Proteinfällung durchgeführt werden konnten. Nach der Proteinfällung mittels ACN konnte sowohl im ACN-Überstand, als auch in der Plasmamatrix kein Peak via HPLC-MS detektiert werden.

Eine Proteinfällung über TFA statt ACN zeigte keine Besserung bezüglich der Detektion von Liponsäure-(KKEEE)₃K-NH₂. Die Stabilitätsuntersuchung im Phosphat-Puffer konnte dagegen erfolgreich durchgeführt werden, was auf eine Wechselwirkung des Konjugats mit Plasmaproteinen hindeutet.

3. Ergebnisse

Interessanterweise zeigte der nackte Wirkstoff α -Liponsäure keine Wechselwirkung mit den Plasmaproteinen, da eine Detektion nach Ausfällung durchführbar war. Im Puffer konnte eine Stabilität des Konjugats von > 8 h gemessen werden.

3.5.1.3 Pharmakokinetik

Im Folgenden werden pharmakokinetische Eigenschaften des freien Wirkstoffs im Vergleich zu der konjugierten Form erörtert. Zur Analyse wurden die Wirkstoffe oder Konjugate jeweils radioaktiv markiert und anschließend die Bioverteilung *in vivo* über γ -Szintigraphien untersucht und miteinander verglichen. Als Applikationsrouten wurden intravenöse und intraperitoneale Injektionen angewandt.

3.5.1.3.1 ^{99m}Tc -markierte Liponsäure nach intravenöser Applikation

Die über Technecium- 99m markierte Liponsäure zeigt nach intravenöser Applikation eine schnelle und spezifische Akkumulation in der Leber. Pharmakokinetische Untersuchungen aus der Literatur bestätigen die hier gezeigte Leberspezifität der Liponsäure [187]. Nach ca. 30 Minuten können im abdominalen Raum weitere Verteilungen des radioaktiv markierten Wirkstoffs beobachtet werden. Zwei Stunden nach Applikation wurden nur noch geringe Mengen in der Leber detektiert, gleichzeitig ist eine höhere Aktivität im Bauchraum ersichtlich, was auf eine Exkretion der Liponsäure über die Gallenwege in den Darm deutet. Auch dieses Erkenntnis steht in Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien von Gregus *et al.* [188].

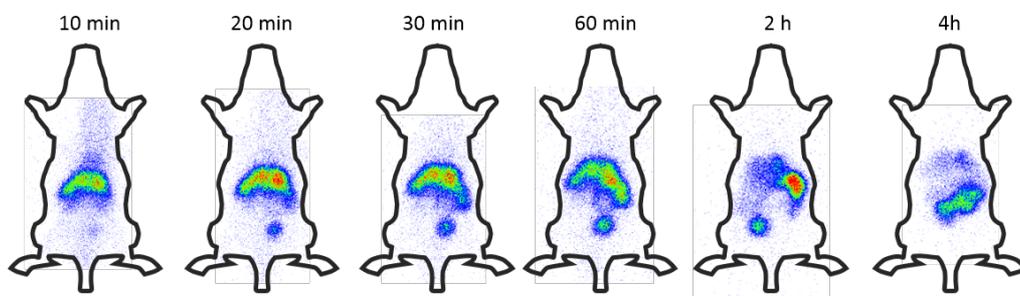


Abbildung 24: Szintigraphische Verteilung von ^{99m}Tc -markierter Liponsäure nach intravenöser Applikation in eine NMRI-Maus.

Des Weiteren ist zu beobachten, dass neben der Exkretion über die Gallenwege, kleinere Mengen der markierten Liponsäure gleichzeitig über den Urin ausgeschieden werden.

3.5.1.3.2 Liponsäure- ^{125}I - γ (KKEEE) $_3$ -NH $_2$ -Konjugat nach intravenöser Applikation

Nach Konjugation der Liponsäure an den Carrier ist eine völlig veränderte Pharmakokinetik der Liponsäure zu erkennen. Das Konjugat zeigt eine spezifische Anreicherung in den Nieren (**Abbildung 25**). Die Spezifität und Kinetik des „nackten“ Carriers (**Abbildung 4**) verändern sich dabei nur unerheblich. Geringfügig schnellere Ausscheidungen des Wirkstoff-Konjugats über den Urin in die Blase können im Vergleich zum Peptid detektiert werden. Die Anreicherungen im Magen und der Schilddrüse, zwei Stunden nach i.v.-Applikation deuten auf eine Deiodierung des Iod-Nuklids und dessen spezifischen Anreicherung in den Schilddrüse und Magen hin. Gleiches gilt auch für die Aufnahme nach vier Stunden. Warum nach Konjugation der Liponsäure eine schnellere Deiodierung stattfindet, gilt noch zu untersuchen. Hierzu wären detaillierte Untersuchungen der Metabolisierung von Peptid und Wirkstoff-Konjugat in den proximalen Tubuluszellen hilfreich. Jedoch kann zusammengefasst werden, dass eine gezielte Anreicherung des Peptids auch nach Wirkstoffbeladung in den Nieren stattfindet. Aufgrund der indirekten Markierung des Liponsäure-Wirkstoffkonjugats über eine Iodmarkierung eines zusätzlich eingebauten Tyrosins kann ein nierenspezifischer Transport der Liponsäure in diesem Versuch nicht eindeutig bewertet werden. Eine direkte Markierung des Wirkstoffs gibt hierzu weitere Aufschlüsse (siehe folgendes Kapitel 3.5.1.3.3).

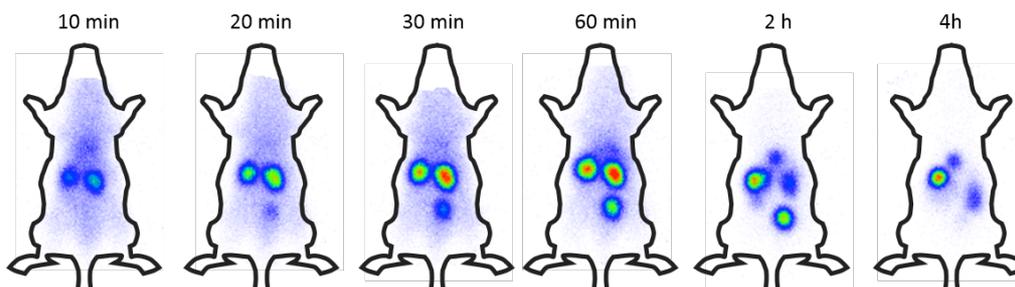


Abbildung 25: Sztigraphische Verteilung von Liponsäure- ^{125}I - γ (KKEEE) $_3$ -NH $_2$ -Konjugat (8) nach intravenöser Applikation in eine NMRI-Maus.

3.5.1.3.3 Übersicht unterschiedlicher Liponsäure-(KKEEE)₃K-Konjugate

Um die Carrier-Eigenschaften des Peptids (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**) weiter zu evaluieren, wurden Moleküle mit multiplen Wirkstoffbeladungen synthetisiert und diese szintigraphisch auf Spezifität und Kinetik untersucht (**Abbildung 26**). Des Weiteren wurde eine verkürzte Form des Carriers synthetisiert (11mer statt 16mer), um das Masseverhältnis Wirkstoff zu Carrier zu erhöhen. Zusätzlich wurde eine direkte Wirkstoffmarkierung angewandt, sodass der Wirkstoff selbst verfolgt werden kann (**Abbildung 25**). Die Ergebnisse ermöglichen somit eine Aussage über einen gezielten Transport des Wirkstoffs selbst und erlauben gleichzeitig die Validierung der D-Tyrosin-markierten Konjugate.

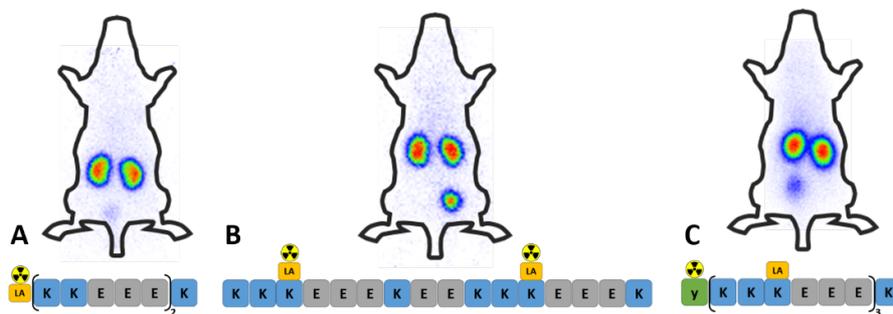


Abbildung 26: Übersicht unterschiedlicher LA-Konjugate mit unterschiedlichen Radiomarkierungen in jeweils einer NMRI-Maus, 1 h nach intravenöser Applikation. (A) ^{99m}Tc-LA-(KKEEE)₂K-NH₂ (**9**), einfache Beladung am N-Terminus; (B) KKKε(LA-^{99m}Tc)EEEEKKε(LA-^{99m}Tc)EEEE-NH₂ (**10**) doppelte Beladung über Lysin-ε-Verknüpfung; (C) ¹²⁵I-γ(KKKε(LA)EEE)₃K-NH₂ (**11**), dreifache Beladung über Lysin-ε-Verknüpfung.

Die Ergebnisse der Bioverteilungen zeigen, dass weder das LA-11mer-Konjugat signifikante Veränderungen der Pharmakokinetik im Vergleich zum unbeladenen Carrier (**Abbildung 4**) aufweist, noch die zweifache oder dreifache Beladung (**B und C**) mit dem lipophilen Wirkstoff die Eigenschaften des Peptids beeinflussen. Durch die direkte Wirkstoffmarkierung konnte ein spezifischer Transport des Wirkstoffs durch Konjugation an den Carrier in die Nieren bestätigt werden.

3.5.1.3.4 Pharmakokinetik Liponsäure-Konjugate nach intraperitonealer Applikation

Intraperitoneale Injektionen bieten im Vergleich zur intravenösen Applikation eine bedeutend leichtere Durchführbarkeit. Zusätzlich lösen intraperitoneale Injektionen weniger Stress im Tier aus, sodass gerade bei mehrfachen Injektionen während einer Studie die i.p.-Injektion einen großen Vorteil

aus ethischer Sicht mit sich bringt. Auf Basis dieser Überlegungen lag der Fokus folgender Arbeiten auf den pharmakokinetischen Profilen der Liponsäure und des LA-Konjugats nach i.p.-Applikation sowie den Unterschieden zu den bereits erläuterten Eigenschaften nach i.v.-Gabe (Kapitel 3.5.1.3.1 und 3.5.1.3.2).

3.5.1.3.4.1 ^{99m}Tc -markierte Liponsäure nach intraperitonealer Applikation

Die Szintigramme der markierten α -Liponsäure nach intraperitonealer Applikation zeigen zunächst eine längere Verweilzeit der injizierten Lösung an der Einstichstelle am unteren rechten abdominalen Raum der Maus. Im Vergleich zur i.v.-Gabe konnte eine um ca. 20 Minuten verzögerte Akkumulation in der Leber beobachtet werden. Erst nach 30 – 60 Minuten wurde eine spezifische Akkumulation in der Leber detektiert. Vorherige Aufnahmen zeigen hohe Aktivitäten im oberen rechten Abdomen, evtl. bereits Ansammlungen in der Galle. Nach zwei Stunden ist bereits eine Abnahme der Radioaktivität in der Leber ersichtlich, während in der Blase eine Zunahme an Aktivität beobachtet werden kann. Vier Stunden nach intraperitonealer Applikation sind vergleichbar mit der Szintigraphie nach i.v.-Injektion geringere Mengen weiterhin im Magen-Darm-Trakt ersichtlich. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die intraperitoneale Gabe lediglich Einfluss auf die Kinetik hat, jedoch in diesem Fall keinen signifikanten Einfluss auf Spezifität und Exkretion des Wirkstoffs.

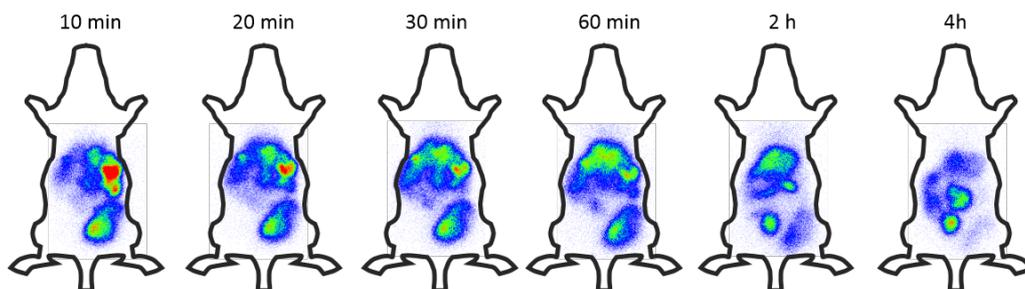


Abbildung 27: Szintigraphische Verteilung von ^{99m}Tc -markierter Liponsäure nach intraperitonealen Applikation in eine NMRI-Maus.

3.5.1.3.4.2 ^{99m}Tc -Liponsäure-(KKEEE)₃K-NH₂-Konjugat nach intraperitonealer Applikation

Die Bioverteilungen des LA-Konjugats nach intraperitonealer Injektion sind vergleichbar mit den Bildern des unbeladenen Carriers nach i.p.-Gabe (**Abbildung 22**). Auch hier ist eine längere Verweilzeit der injizierten Dosis an der Einstichstelle zu beobachten. Nach der Aufnahme der Lösung in den Blutkreislauf kann nach 20 – 30 Minuten eine Akkumulation in den Nieren detektiert werden, wobei gleichzeitig weitere Radioaktivität oberhalb der Nieren zu sehen ist. Um welches Organ/Gewebe es sich dabei handelt kann nicht zuverlässig beantwortet werden, hierzu wären Organverteilungsstudien notwendig. Zwei Stunden nach der Injektion jedoch ist eine spezifische Anreicherung der Liponsäure in den Nieren ersichtlich, sodass ein gezielter Transport durch den Carrier bestätigt werden kann. Weitere zwei Stunden später ist der Großteil des Konjugats bereits ausgeschieden, nur noch geringe Mengen sind in den Nieren detektiert worden und verhältnismäßig größere Mengen in der Blase. Auch hier zeigt sich, dass die Veränderung der Applikationsroute lediglich einen Einfluss auf die Kinetik zu haben scheint und keinen auf die Spezifität. Dennoch ist es durch die längere Verweilzeit des Konjugats im Organismus von großer Bedeutung ausreichende Stabilitäten der Wirkstoff-Verknüpfungen sowie des Carriers vorliegen zu haben.

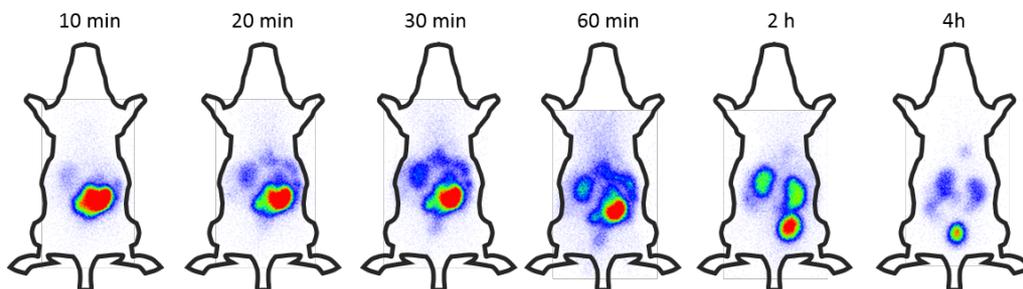


Abbildung 28: Szintigraphische Verteilung von ^{99m}Tc -LA(KKEEE)₃-NH₂-Konjugat (8) nach intraperitonealer Applikation in eine NMRI-Maus.

3.5.2 Carvedilol-Konjugat (12)

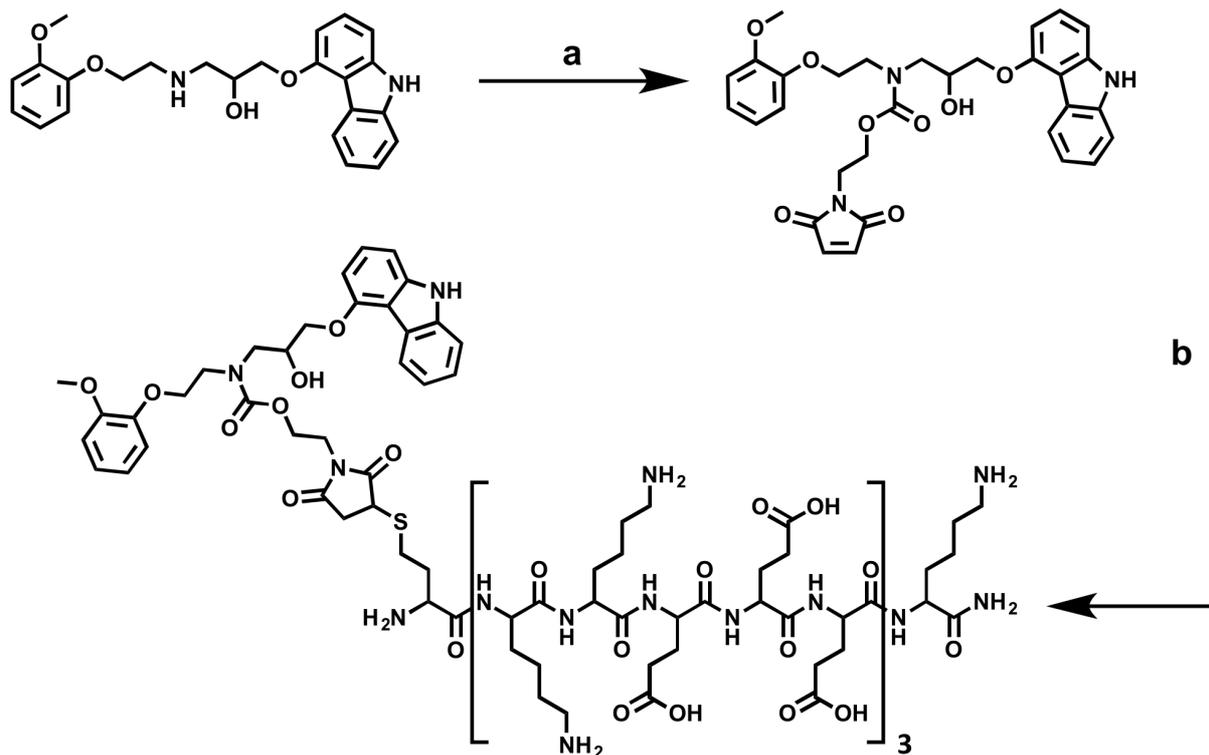
Bei Carvedilol handelt es sich um einen β -Blocker, der als Racemat bei arterieller Hypertonie, Angina pectoris und chronischer Herzinsuffizienz eingesetzt wird. Des Weiteren zeigte der Wirkstoff im Tiermodell potente antioxidative Eigenschaften bei diabetischer Nephropathie [189, 190] und bei renalen Reperfusionsschäden [191, 192]. Diese protektive Wirkung von Carvedilol auf renales Gewebe

fürte zu der Auswahl dieses Wirkstoffs für die hier betrachteten Studien mit Cisplatin. Detaillierte Informationen sind in Kapitel 1.6.2.4 zu finden.

3.5.2.1 Synthese

Der lipophile Wirkstoff ($\log P = 3,5^2$) weist gleich mehrere funktionelle Gruppen auf, die Verknüpfungsstellen zur Konjugation bieten. Neben einer Hydroxylgruppe beinhaltet der Wirkstoff zwei sekundäre Amine, die zum einen aliphatisch gebunden und zum anderen cyclisch gebunden als Carbazol vorliegen. Die Basizität aliphatischer Amine ist aufgrund des positiven induktiven Effekts höher als bei Aminen, die in aromatischen Ringsystemen inkooperiert sind (negativer induktiver Effekt) [193]. Da es sich bei Carvedilol um eine lipophile Substanz handelt wurden bei den Synthesen aprotisch-unpolare Lösungsmittel (DCM) verwendet, welche die Basizität der Amine nicht weiter beeinflussen. Daraus ergibt sich eine höhere Nukleophilie des aliphatisch gebundenen Amins im Vergleich zum Carbazol-Amin, sodass eine definierte Anbindung möglich ist. Da der Wirkstoff in seiner aktiven Form nach Transport zum Zielorgan vorliegen sollte und somit die Verknüpfung eine gewisse Labilität aufweisen muss, wurde eine Carbamat-Verbindung für die Konjugation von Carvedilol gewählt. Folgende Synthesestrategie führte zu dem gewünschten Carvedilol-Konjugat (**12**).

² berechnet über die Software von www.molinspiration.com



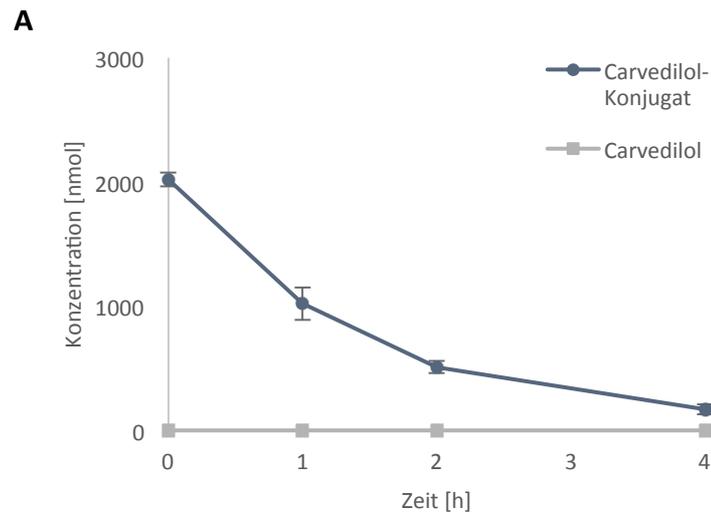
Schema 5: Syntheschema des Carvedilol-(KKEEE)₃-NH₂-Konjugats (12). (a) Chlorameisensäure-2-maleinimidoethylester (22), Triethylamin, getrocknetes DCM, Zugabe bei 0 °C für 30 min, dann 12 h bei RT. (b) C(KKEEE)₃K-NH₂ (4), DMF, pH= 6,5, 2 h bei RT unter Argon.

Unter basischen Bedingungen konnte eine schnelle Umsetzung des Carvedilols mit dem reaktiven Linker Chlorameisensäure-2-maleinimidoethylester (22) zum gewünschten Zwischenprodukt erzielt werden. HPLC-MS-Analytik und ¹H-NMR bestätigten die Anbindung des Linkers am aliphatischen Amin des Wirkstoffs. Anschließend erfolgte eine spezifische Anbindung des Wirkstoffs an den Carrier in homogener Phase über eine Thiol-Maleinimid „Klick“-Reaktion (Michael Addition) bei einem pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5. Die Anbindung konnte über HPLC-MS bestätigt werden.

3.5.2.2 Plasmastabilität

Die verwendeten Verknüpfungen des Carvedilol-Konjugats (12) weisen unterschiedliche Stabilitäten auf. Thioetherbindungen (R₁-S-R₂) bieten nach Literatur hohe Plasmastabilitäten im Gegensatz zu labilen Carbamat-Verknüpfungen, die bei der Synthese von Prodrugs große Verwendung finden [194]. Somit ist die untersuchte Stabilität des Konjugats limitiert durch die labile Carbamat-Verknüpfung, die eine Freisetzung des Carvedilols in seiner aktiven Form mit sich bringt.

Die Versuche im Plasma unterschiedlicher Spezies lieferten Halbwertszeiten des Konjugats im Mittel von 1,4 Stunden. Geringfügige Unterschiede in der Plasmastabilität konnten dabei je nach Spezies ermittelt werden. Im Mausplasma zeigte das Konjugat eine Halbwertszeit von 1,8 Stunden, im Rattenplasma konnte eine Halbwertszeit von 1,1 Stunden bestimmt werden. Während die Plasmakonzentration des Konjugats im zeitlichen Verlauf immer weiter abnehmen, konnte gleichzeitig kein freier Wirkstoff im Plasma über die angewandte Methode detektiert werden (Diagramm, **Abbildung 29, A**).

**B**

Berechnete Halbwertszeiten $t_{1/2}$	
Phosphat-Puffer:	2,2 h
Ratte:	1,1 h
Maus:	1,8 h
Human:	1,3 h

Abbildung 29: Plasmastabilitätsuntersuchung von Carvedilol-(KKEE)₃-NH₂-Konjugat (12) im Rattenplasma (A), pH= 7,4 und berechnete Halbwertszeiten in Maus und Human-Plasma sowie Phosphat-Puffer, pH= 7,4 (B) (Diagramme nicht abgebildet).

3.5.2.3 Pharmakokinetik

3.5.2.3.1 ¹²⁵I-Carvedilol

Die Ergebnisse der szintigraphischen Verteilung des markierten Wirkstoffs nach intravenöser Applikation zeigen eine spezifische und rapide Akkumulation in der Leber (**Abbildung 30**). Nach ca. 60 Minuten konnte eine Verlagerung und Verteilung der gemessenen Aktivität im mittleren abdominalen Raum beobachtet werden und eine gleichzeitige punktuelle Anreicherung im oberen Abdomen, was auf eine Akkumulation des freien Iods in der Schilddrüse deutet. Des Weiteren konnte keine Exkretion des Wirkstoffs über den Urin beobachtet werden. Die Ergebnisse übereinstimmen mit pharmakokinetischen Studien aus der Literatur [195, 196]. Die Studien zeigten eine spezifische hepatische Aufnahme, in welcher eine oxidative Metabolisierung des Wirkstoffs stattfindet. Anschließend werden die Metabolite über die Galle ausgeschieden und über Fazes eliminiert. Eine Ausscheidung über den Urin findet nur in sehr geringen Anteilen von 16 % statt [197].

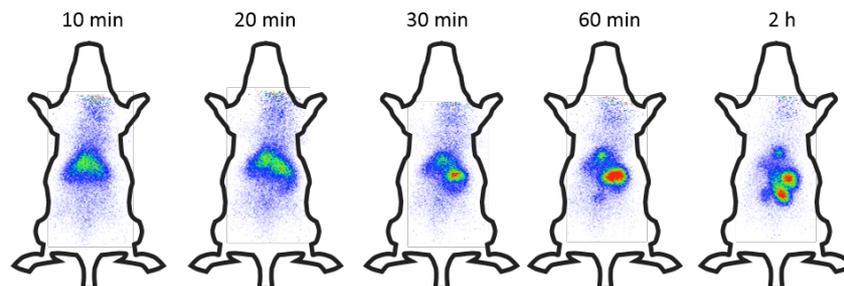


Abbildung 30: Szintigraphische Verteilung von ¹²⁵Iod-markiertem Carvedilol nach intravenöser Applikation in eine NMRI-Maus.

3.5.2.3.2 ¹²⁵I-Carvedilol-(KKEEE)₃-NH₂-Konjugat

Die Ergebnisse des konjugierten Wirkstoffs zeigen im Vergleich zum freien Wirkstoff völlig veränderte pharmakokinetische Eigenschaften (**Abbildung 31**). Durch die Konjugation an den Carrier konnte ein spezifischer Transport des Carvedilols in die Nieren erzielt werden. Da auch bei dem Konjugat der Wirkstoff selbst markiert wurde, ist auch die Exkretion des Wirkstoffs nach dem Transport in die Nieren nachvollziehbar. Da nur sehr geringe Mengen in der Blase aufzufinden sind, kann eine veränderte Exkretion über den Urin ausgeschlossen werden. Zwei Stunden nach Injektion können fortwährend größere Mengen des Carvedilols in den Nieren ermittelt werden, jedoch ist eine breitere Verteilung

der Aktivität im linken Abdomen zu beobachten. Da sich in der Höhe der Nieren mehrere Organe überlagern (Leber, Magen, Dünndarm, Galle) kann hier keine zuverlässige Aussage über die Anreicherung des Carvedilols getroffen werden.

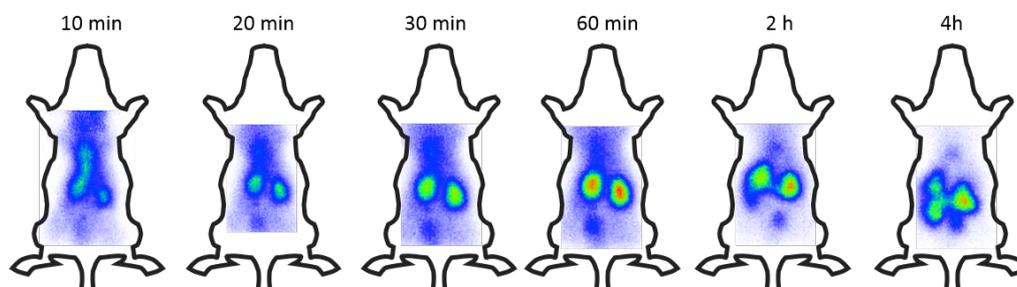


Abbildung 31: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I -Carvedilol-(KKEEE)₃-NH₂-Konjugat (12) nach intravenöser Applikation in eine NMRI-Maus.

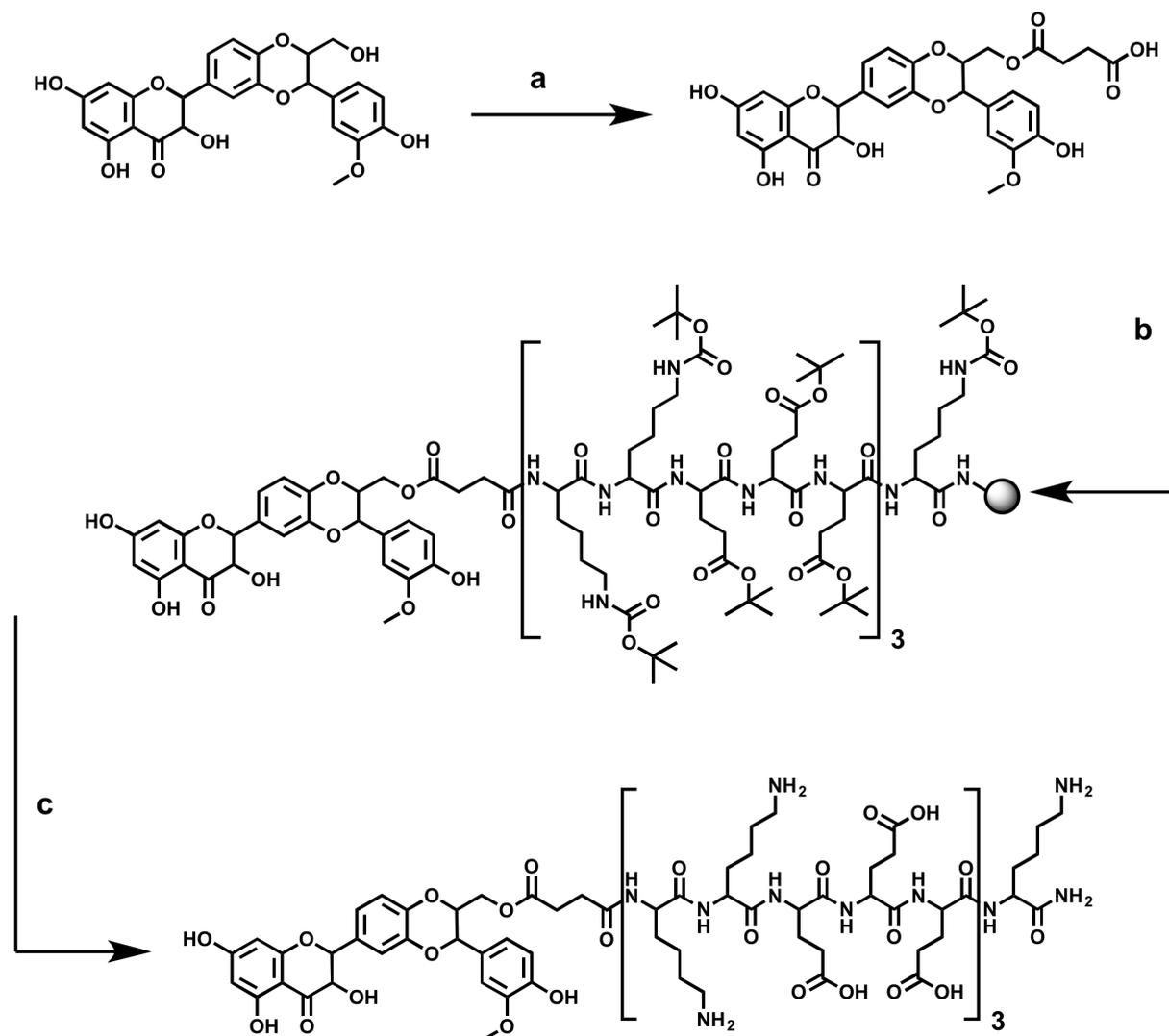
3.5.3 Silybin-Konjugat (13)

Bei Silybin handelt es sich um die pharmakologisch aktivste Substanz der drei Isomere des Stoffkomplexes Silymarin, welches aus den Früchten der Mariendistel (*Silybum marianum*) gewonnen wird. Der lipophile Wirkstoff ($\log P = 2,07^3$) weist typisch für Flavanoide eine geringe Bioverfügbarkeit auf, die mit Absorptionsleveln zwischen 20 und 50 % zusätzlich stark variieren [198]. Zellmembranstabilisierende, entzündungshemmende, RNA- und Proteinsynthese stimulierende sowie antioxidative Eigenschaften wurden in präklinischen und klinischen Studien nachgewiesen [199-202]. In mehreren Studien konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass bei der Gabe von Cisplatin die Behandlung mit Silybin eine protektive Wirkung auf die Nierenfunktion bewirkt [144-146]. Detaillierte Informationen zu den Studien können Kapitel 1.6.2.3 entnommen werden. Um eine erhöhte Dosis-Wirkungs-Beziehung in den Nieren zu erzielen, wurde der Wirkstoff für die geplanten Tierversuche ausgewählt und synthetisch an den nierenspezifischen Carrier konjugiert.

³ berechnet über eine Software von www.molinspiration.com

3.5.3.1 Synthese

Das Polyphenol Silybin weist fünf Hydroxygruppen sowie ein Ketogruppe als mögliche Verknüpfungsstellen auf. Da die Ketogruppe Teil des Flavanonol-Grundgerüsts ist und somit essentiell für die pharmakologischen Eigenschaften des Wirkstoffs ist, könnte eine Verknüpfung an dieser Stelle Einfluss auf die Wirksamkeit haben. Bei den fünf Hydroxygruppen handelt es sich bei drei um phenolische Alkohole, bei einem um einen sekundären aliphatischen und bei wiederum einem um einen primär aliphatischen Alkohol. Diese einzige primäre Hydroxygruppe weist die geringste sterische Hinderung auf und wird deswegen von dem Enzym Lipase B (Novozym 435®) von *Candida antarctica* bevorzugt acetyliert [200].



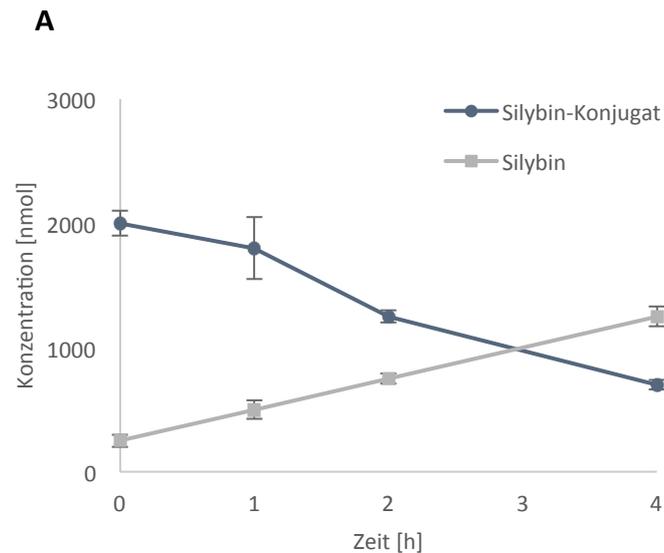
Schema 6: Syntheschema des Silybin-(KKEE)₃-NH₂-Konjugats (13). (a) Bernsteinsäureanhydrid, Novozym 435 Lipase, getrocknetes ACN, 50 °C, 24 h. (b) Geschütztes (KKEE)₃-NH₂-Resin, EDAC, HOBt, getrocknetes DMF, 2 h bei RT. (c) TFA/TIS/H₂O (v/v/v, 95/2,5/2,5) 1 ml/100 mg Resin, 1 h bei RT.

Durch Inkubation des Silybins mit dem Enzym wurde durch die Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid eine Anbindung an der primären Hydroxylgruppe des Wirkstoffs erzielt (**Schema 6**), was mittels $^1\text{H-NMR}$ bestätigt werden konnte. Durch die Carboxylgruppe des konjugierten bifunktionellen Linkers konnte eine stabile Verknüpfung an den Carrier über eine Amidbindung erzielt werden. Die Kopplung erfolgte dabei an der festen Phase über EDC und HOBt als Kopplungsreagenzien. Die Zugabe einer Base war in diesem Fall nicht möglich, da das Silybinhemisuccinat (**19**) Instabilitäten unter alkalischen Bedingungen aufwies. Die Ester-Verknüpfung zeigte unter den stark sauren Bedingungen während der Abspaltung keine größeren Instabilitäten. Es konnten nur geringe Mengen des Linker-Carriers-Derivats im Rohprodukt ausfindig gemacht werden. Ausbeuten von über 29 % konnten über den erläuterten Syntheseweg erzielt werden.

3.5.3.2 Plasmastabilität

Der Wirkstoff Silybin wurde über einen bifunktionellen Linker an den *N*-Terminus des Carriers $(\text{KKEEE})_3\text{K-NH}_2$ (**1**) konjugiert. Während bei der Verknüpfung zwischen Linker und Carrier eine stabile Amidbindung vorliegt, ist hingegen der Wirkstoff labil über eine Esterverbindung an den Linker gebunden (**Schema 6**). Ester-Verknüpfung können enzymatisch oder chemisch hydrolysiert werden. Je nach Abgangsgruppe entstehen dabei erhöhte Tendenzen zur chemischen Hydrolyse. Plasmastabilitätsuntersuchungen sind somit in diesem Fall unabdinglich, um eine ausreichende Stabilität für den Transport des Wirkstoffs zum Zielgewebe zu gewährleisten.

3. Ergebnisse



B

Berechnete Halbwertszeiten $t_{1/2}$	
Phosphat-Puffer:	7,6 h
Ratte:	2,5 h
Maus:	4,1 h
Human:	4,2 h

Abbildung 32: Plasmastabilitätsuntersuchung von Silybin-(KKEE)₃-NH₂-Konjugat (13) im Rattenplasma (A), pH= 7,4 und berechnete Halbwertszeiten in Maus und Human-Plasma sowie Phosphat-Puffer (B), pH= 7,4 (Diagramme nicht abgebildet).

Bei der Plasmastabilitätsuntersuchung im Rattenplasma konnte eine Halbwertszeit von 2,5 Stunden ermittelt werden, was bei der erwarteten Pharmakokinetik des Konjugats einer ausreichenden Stabilität entspricht. Das Diagramm zeigt eine gleichzeitige Zunahme des freien Silybins bei kontinuierlicher Abnahme des Konjugats im zeitlichen Verlauf. Da bei der Analyse ein stabiler pH-Wert von 7,4 vorlag und das Konjugat im Phosphatpuffer bei gleichen pH-Wert-Bedingungen eine sehr viel höhere Plasmahalbwertszeit von 7,6 Stunden aufweist, muss es sich beim Abbau des Konjugats um enzymatisch katalysierte Hydrolysen der Ester-Verbindungen handeln. Anders als beim Carvedilol findet außerdem keine Anbindung des Wirkstoffs mit Plasmaproteinen statt, sodass der freie Wirkstoff in seiner aktiven Form detektiert werden konnte. Die ermittelte Stabilität erlaubt neben i.v.-Injektionen sowohl intraperitoneale und subkutane Injektionen, die beide eine um ca. eine Stunde verzögerte Anreicherung in den Nieren aufweisen.

Im Vergleich größere Unterschiede konnten in der Plasmastabilität des Konjugats je nach Spezies ermittelt werden. Während im Rattenplasma eine geringere Halbwertszeit von 2,5 Stunden errechnet

wurden, zeigte das Konjugat eine fast doppelt so große Stabilität im Maus- und Humanplasma (Mw = 4,15 Stunden). Eine erhöhte Aktivität von Esterasen im Plasma der Ratte im Vergleich zu den anderen untersuchten Spezies ist jedoch nicht bekannt.

3.5.3.3 Pharmakokinetik

3.5.3.3.1 ¹²⁵I-Silybin

Die Pharmakokinetik Silybins wurde bereits in mehrere Studien über unterschiedliche Methoden untersucht. Wie bereits erwähnt, weist das Flavonoid eine geringe Bioverfügbarkeit auf, die bei oraler Gabe aufgrund einer ineffizienten intestinalen Absorption gerade mal bei 0,95 % liegt [203]. Nach intravenöser Applikation des Prodrugs (Silybinhemisuccinat), das aufgrund einer besseren Wasserlöslichkeit verwendet wird, kann eine schnelle Aufnahme des Wirkstoffs im hepatobiliären System beobachtet werden. Einer rapiden Akkumulation folgt eine langsame Eliminationsphase des Wirkstoffs über die Galle [203, 204]. In allen weiteren Organen konnten nur sehr geringe Mengen Silybins oder dessen Metabolite detektiert werden. Skottova *et al.* bestätigte die beschriebenen Erkenntnisse mit pharmakologischen Untersuchungen des über ¹²⁵Iod markierten Silybins. Im Vergleich zu einem über C14-Markierung Silybins zeigte die Iodmarkierung keinen Einfluss auf die pharmakokinetischen Eigenschaften des Wirkstoffs [204]. Die Ergebnisse dieser Studie erlauben uns eine Validierung der von uns gewählten Methode der radioaktiven Markierung über Iod-125. **Abbildung 33** stellt die bereits erläuterten pharmakologischen Eigenschaften aus der Literatur szintigraphisch dar, wobei nach 30 Minuten eine Zuordnung der Anreicherung szintigraphisch erschwert ist, da im oberen Bereich des Abdomens sich mehrere Organe überlagern. Dennoch kann zusammengefasst werden, dass eine schnelle spezifische Anreicherung in der Leber zu erkennen ist. Da keine Aktivitätsanreicherung in der Blase beobachten werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass nach der Akkumulation des Wirkstoffs in der Leber eine Ausscheidung über die Gallenwege erfolgt.

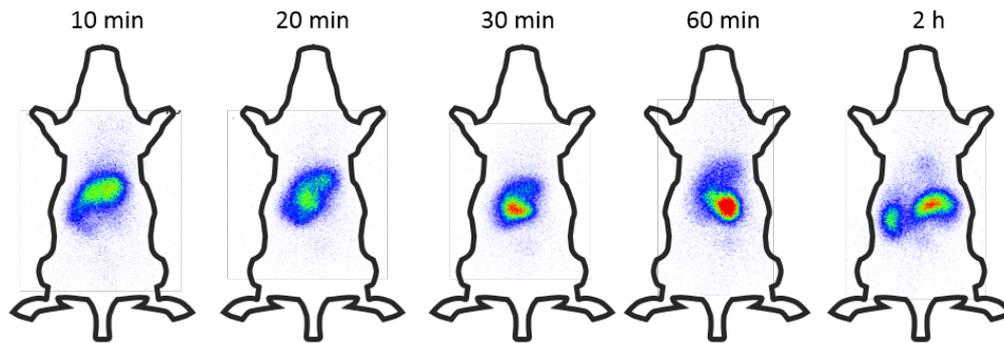


Abbildung 33: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I od-markiertem Silybin nach intravenöser Applikation in eine NMRI-Maus.

3.5.3.3.2 ^{125}I -Silybin-(KKEEE) $_3$ K-NH $_2$ (13)

Nach der Konjugation an den nierenspezifischen Carrier kann eine veränderte Kinetik und Spezifität des Wirkstoffs Silybin beobachtet werden. Neben einer Akkumulation in beiden Nieren wurden gleichzeitig größere Mengen Aktivität im oberen Brustkorb detektiert (**Abbildung 34**). Eine genaue Zuordnung um welches Organ es sich dabei handelt, ist jedoch nur schwer möglich, da im oberen Abdomen mehrere Organe übereinander lagern. Generell ist im Vergleich zu allen anderen Konjugaten eine breitere Distribution der Aktivität im ganzen Körper ersichtlich. Szintigraphische Untersuchungen der einzelnen Organe 2,5 Stunden nach Injektion post mortem zeigten erhöhte Aktivitäten in Niere, Blut und Leber. Interessanterweise ist zusätzlich eine veränderte Exkretion des Wirkstoffs über den Urin zu beobachten. Im Vergleich zu Carvedilol, wo nach Transport in die Nieren anschließend eine für die Wirkstoffeigenschaften entsprechenden Anreicherung im hepatobiliären System erfolgte, konnte hier nach Aufnahme in den proximalen Tubulus eine veränderte Exkretion von Silybin detektiert werden (siehe Vergleich zu **Abbildung 33**).

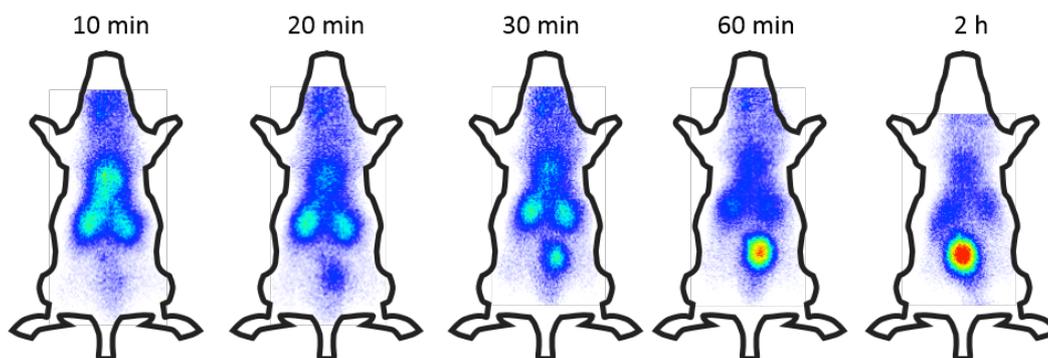


Abbildung 34: Szintigraphische Verteilung von ^{125}I -Silybin-(KKEEE) $_3$ -NH $_2$ -Konjugat (13) nach intravenöser Applikation in eine NMRI-Maus.

3.5.4 Apocynin-Konjugat

Apocynin oder meist auch als Acetovanillon bezeichnet, ist ein Naturstoff, der bereits aus verschiedenen Pflanzen isoliert wurde und auf zahlreiche pharmakologischen Eigenschaften hin untersucht wurde. Studien zu Folge besitzt der Wirkstoff entzündungshemmende Eigenschaften und verhindert durch Inhibierung der NADPH-Oxidase die Bildung freier Radikale [205]. Aufgrund dieser Eigenschaften konnte im Tiermodell eine protektive Wirkung des Wirkstoffs auf cisplatininduzierte Nephro- und Hepatotoxizität erzielt werden [172, 206]. Diese therapeutischen Effekte führten zur Auswahl des Wirkstoffs für die geplanten Cisplatin-Studien (Kapitel 3.6). Detaillierte Informationen zu den pharmakologischen Eigenschaften Apocynins können Kapitel 1.6.2.5 entnommen werden.

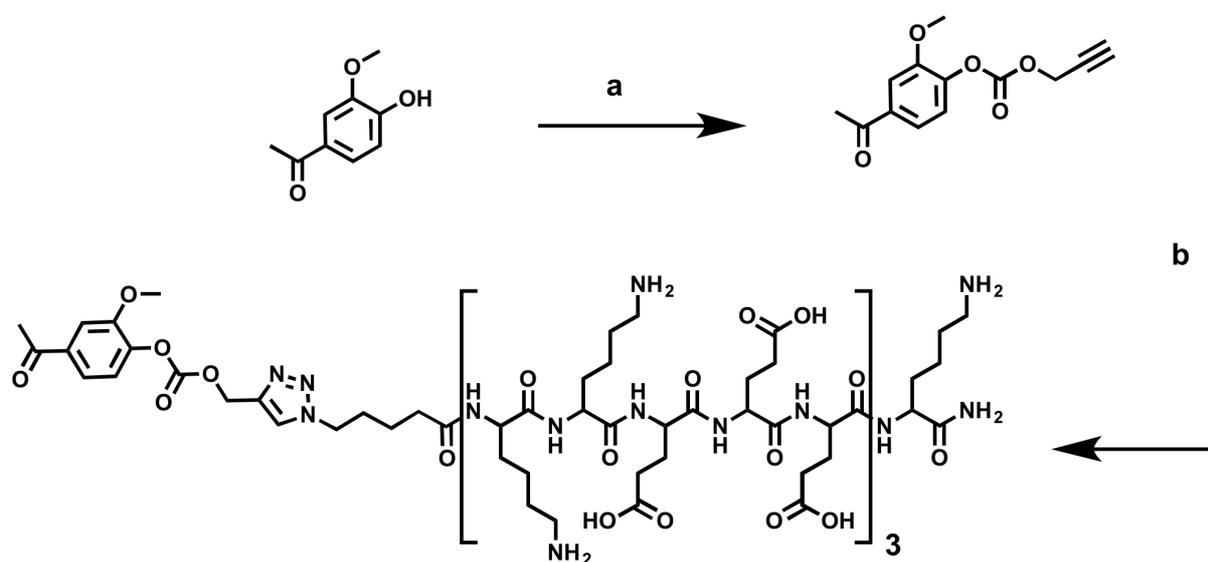
3.5.4.1 Synthese

Mit einer relativ geringen molaren Masse von 116 g/mol und einem logP-Wert von 1,18⁴ weist der Wirkstoff im Vergleich zu den anderen betrachteten Wirkstoffen nach Anbindung eine geringere Tendenz zur Veränderung der Carrier-Eigenschaften auf. Der Wirkstoff ist durch seine Struktur sowohl in polaren Lösungsmitteln wie H $_2$ O und Ethanol löslich, als auch in unpolare Lösungsmitteln wie Chloroform oder Ether. Strukturell zählt der Wirkstoff zu den Verwandten des Vanillins und besitzt wie der Name bereits verrät eine Acetylierung der Aldehyd-Gruppe des Vanillin-Grundkörpers. Neben der phenolischen Hydroxylgruppe weist Apocynin eine Ketogruppe auf, die beide als Verknüp-

⁴ berechnet über eine Software von www.molinspiration.com

3. Ergebnisse

fungsstellen für die Konjugationen mit dem Carrier in Frage kommen. Bei folgender Synthese wurde eine Carbonsäureverbindung als labile Verknüpfung gewählt. Über die Schotten-Baumann-Methode wurde durch die Zugabe des reaktiven Propargylchloroformat-Linkers unter basischen Bedingungen die gewünschte Verknüpfung erhalten (**Schema 7**). Da Carbonsäureester bereits unter schwach basischen und sauren Bedingungen hohe Instabilitäten aufweisen, musste bei der Konjugation zum Carrier eine überwiegend pH-neutrale Reaktion gewählt werden. Aufgrund dessen fiel die Wahl auf einen bifunktionellen Linker, der neben dem Carbonsäurechlorid eine Alkylgruppe besitzt, um eine spezifische Anbindung an ein Azid über die 1,3-Dipolare Cycloaddition nach Huisgen zu erzielen. Die Cycloaddition ist kupferkatalysiert und wird unter leicht sauren Bedingungen durchgeführt.



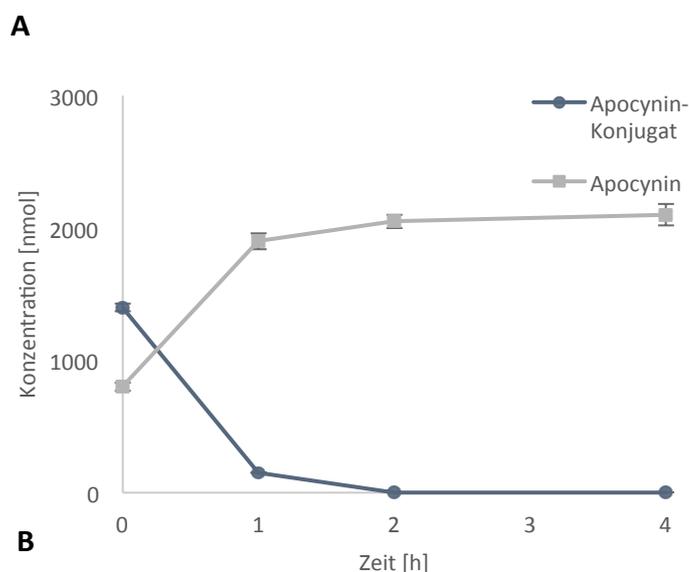
Schema 7: Syntheschema des Apocynin-(KKEE)₃-NH₂-Konjugats (14). (a) Propargylchloroformat, Pyridin, getrocknetes Chloroform, 0 °C für 30 min, dann 2 h bei RT. (b) Kupfer(II)-Sulfat, Ascorbinsäure, N₃-(KKEE)₃K-NH₂ (5) in THF/H₂O (1:1).

Nach der Durchführung dieser sogenannten „Klick“-Reaktion, konnte bereits nach wenigen Minuten eine vollständige Umsetzung zum gewünschten Produkt (**14**) detektiert werden. Es konnten während der Reaktion keine Instabilitäten des Apocynin-Linker-Konjugats (**20**) bezüglich der Reaktionsbedingungen analysiert werden. Mit dem erläuterten Syntheseweg konnten Ausbeuten von größer als 52 % erzielt werden.

3.5.4.2 Plasmastabilität

Das Apocynin-Konjugat (**14**) besitzt zwei Verknüpfungsstellen, die unterschiedliche Stabilitäten aufweisen. Während der Triazol-Ring eine hohe Stabilität aufgrund von mesomeren Grenzstrukturen aufweist, handelt es sich bei dem Carbonsäure-Ester um eine instabile Verknüpfung, die sowohl enzymatisch als auch chemisch hydrolysiert werden kann. Der Wirkstoff selbst zeigte bereits in Stabilitätsstudien eine hohe Stabilität unter sauren pH-Bedingungen zwischen 1,2 und 7,4 [207].

Die Ergebnisse der Plasmastabilitätsuntersuchungen ermittelten in allen verwendeten Plasmen nur eine sehr geringe Stabilität des Konjugats. Es konnte bereits nach der Lösung des Konjugats in der Stammlösung freier Wirkstoff detektiert werden. Das Diagramm (**Abbildung 35**) zeigt den rapiden Abbau des Konjugats und gleichzeitig den Anstieg des freien Wirkstoffs im Rattenplasma.



Berechnete Halbwertszeiten $t_{1/2}$	
Phosphat-Puffer:	1,0 h
Ratte:	n/a
Maus:	n/a
Human:	n/a

Abbildung 35: Plasmastabilitätsuntersuchung von Apocynin-(KKEEE)₃-NH₂-Konjugat (**14**) im Rattenplasma (**A**), pH= 7,4 und voraussichtliche Halbwertszeiten in Maus und Human-Plasma sowie Phosphat-Puffer (**B**), pH= 7,4 (Diagramme nicht abgebildet).

3. Ergebnisse

Bereits nach einer Stunde Inkubationszeit im Plasma konnte kein Konjugat-Peak mehr detektiert werden. Gleiche Eigenschaften des Konjugats konnten sowohl in humanem Plasma als auch im Mausplasma beobachtet werden. Da lediglich an den Zeitpunkten 0 und nach 1 h eine Analyse durchgeführt wurde, konnten keine genauen Angaben der Plasmahalbwertszeiten ermittelt werden. Erstaunliche Instabilitäten zeigte das Konjugat bereits im Phosphat-Puffer, wo bereits nach 1 h die Hälfte der beinhalteten Konjugat-Konzentration hydrolysiert vorlag.

3.6 Proof of concept „NephroGuard“

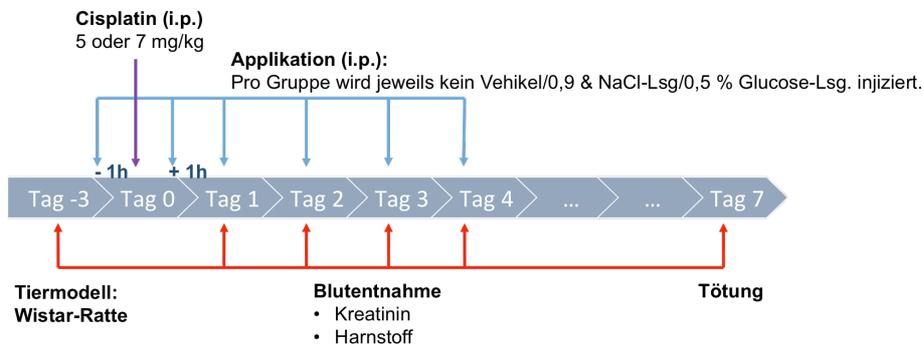
Ziel der Studie „NephroGuard“ war die cisplatininduzierte Nephrotoxizität einzudämmen, um akute und langfristige Nierenschädigungen zu reduzieren. Aktuelle klinische nephroprotektive Maßnahmen während einer Cisplatin-Therapie verlaufen nicht zufriedenstellend, insbesondere in Bezug auf Langzeitfolgen (siehe auch Kapitel 1.6.2). Eine große Anzahl präklinischer Studien mit unterschiedlichen Testsubstanzen konnten bei Ratten und Mäusen bereits protektive Effekte auf die Nierenfunktion bestätigen. Nach ausführlicher Recherche fiel die Auswahl der zu testenden Substanzen auf α -Liponsäure, Silybin und Carvedilol. Durch Konjugation dieser Wirkstoffe an den nierenspezifischen Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**) sollte eine im Vergleich zu den „nackten“ Wirkstoffen verbesserte Dosis-Wirkungs-Beziehung gezeigt werden. Hintergrund dieses *Targeting*-Ansatzes war eine Beeinträchtigung der anti-neoplastischen Wirkung von Cisplatin durch die systemische Verteilung der protektiven Substanzen zu verhindern. Plasma-Kreatinin, Blut-Harnstoffwerte, Glutathion-Bestimmungen sowie Platingehälter von Nieren und Leber dienten als Versuchsparameter. Im 7-Tage-Modell wurden zusätzlich histologische Analysen durchgeführt und analysiert. Das Durchführungsprotokoll, die verwendeten Tiermodelle sowie eingesetzte Dosen wurden aus vorhergehenden Studien der Literatur adaptiert. Alle weiteren Informationen bezüglich der Studien werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

3.6.1 Cisplatin-Dosisfindung

Zunächst wurde eine Cisplatin-Dosisfindung durchgeführt, um eventuelle Einflüsse des Lösungsmittels oder der Dosis im Hinblick auf das ausgewählte Tiermodell (Wistar-Ratten) zu analysieren. Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff dienten als Nierenfunktionsparameter, um den Grad der Nephrotoxizität durch die applizierten Cisplatin-Dosen zu evaluieren. Alle Injektionen und Blutentnahmen sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

3. Ergebnisse

Abbildung 36: Studiendesign Cisplatin-Dosisfindung, 7-Tage-Modell mit allen Applikationen und Probenentnahmen im zeitlichen Verlauf.



Bei den verwendeten Cisplatin-Lösungen handelte es sich jeweils um eine bereits vorgelöste Apothekenlösung in 0,9 % NaCl mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Da die zukünftigen Studien eine nephroprotektive Behandlung der Tiere vorsah, wurden an den geplanten Applikationszeitpunkten jeweils Vehikel-Lösungen injiziert, um eine Vergleichbarkeit der Cisplatin-Gruppe zu den anderen Gruppen zu gewährleisten. Nach ausführlicher Literaturrecherche wurden für die Cisplatin-Dosisfindung folgende Dosen verwendet:

Tabelle 6: Übersicht aller Gruppen zur Cisplatin-Dosisfindung.

Gruppe	Cisplatin-Dosis	Vehikel
1	5 mg/kg	Keine Injektionen
2	7 mg/kg	0,9 %ige NaCl-Lösung
3	7 mg/kg	5 %ige Glucose-Lösung

Bei Betrachtung der Ergebnisse im zeitlichen Verlauf kann in allen Gruppen beobachtet werden, dass ein Anstieg beider Parameter drei Tage nach Cisplatingabe zu verzeichnen ist (**Abbildung 37 und Abbildung 38**). Vier Tage nach Cisplatingabe zeigen die Gruppen untereinander die größten Unterschiede beider Blutparameter. Während die Serum-Kreatininkonzentration vier Tage nach Injektion ihr Plateau erreicht zeigt sich bei der Harnstoffkonzentration in zwei von drei Gruppen ein weiterer Anstieg des Harnstoffs im Blutserum, sieben Tage nach Cisplatingabe. Die Kreatininkonzentration hingegen deutet in zwei von drei Gruppen auf eine Normalisierung der Nierenfunktion hin.

Im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander fallen deutliche Unterschiede auf: Zunächst ist zu erwähnen, dass Gruppe 3, die eine Dosis von 7 mg/kg Cisplatin und 5 % Glucose-Lösung als Vehikel injiziert bekam, signifikant größere Anstiege beider Nierenfunktionsparameter aufweist. Besonders hervorzuheben ist dabei die Kreatininkonzentration vier Tage nach Cisplatingabe. Während sich die Kreatininkonzentration bei Gruppe 3 auf einen Mittelwert von $2,2 \pm 0,2$ mg/dl einpendelt, zeigen im Vergleich Gruppe 1 und 2 Werte von $0,5 \pm 0,1$ mg/dl. Obwohl in Gruppe 3 (7 mg/kg + 0,9 % NaCl) die gleiche Dosis Cisplatin injiziert wurde, zeigt diese Gruppe nur eine geringere Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Selbst eine niedrigere Dosis von 5 mg/kg löst einen stärkeren Anstieg beider Nierenfunktionsparameter aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Gabe von Natriumchlorid als Vehikel eine Reduktion der Cisplatin-Nephrotoxizität bewirkt.

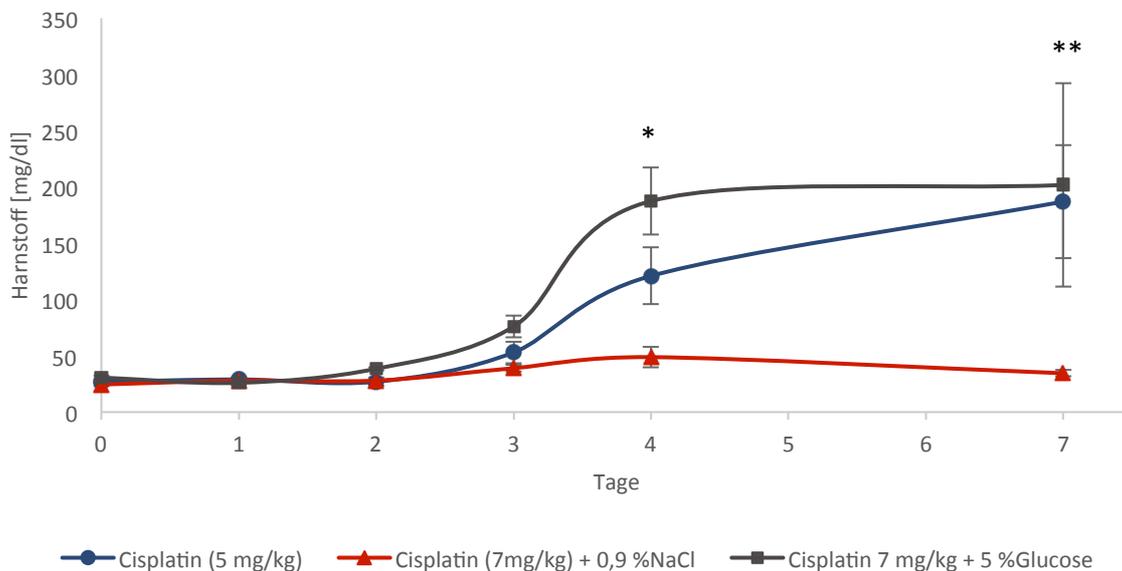


Abbildung 37: Serum-Harnstoffkonzentration nach einmaliger Cisplatingabe (i.p.) mit unterschiedlichen Dosen und Vehikeln im zeitlichen Verlauf. • Blau: 5 mg/kg, ohne Vehikel (n=3); ♦ Rot: 7 mg/kg, mit 0,9 %NaCl 1 h vor- und nach Cisplatingabe sowie an Tag 1, 2, 3 und 4 (n=6); ■ Grau: 7 mg/kg, mit 5 % Glucose 1 h vor- und nach Cisplatingabe sowie an Tag 1, 2, 3 und 4 (n=6). *($p < 0,05$: Cisplatin (7mg/kg + NaCl) vs. Cisplatin (5 mg/kg) und Cisplatin (7 mg/kg + Glucose) an Tag 4. **($p < 0,05$: Cisplatin (7mg/kg + Glucose) vs. Cisplatin (7 mg/kg + NaCl) an Tag 7.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Werte der Gruppen 1 und 3, drei Tage nach Cisplatin-Injektion große Varianzen innerhalb der Gruppen aufweisen. Je höher die Abweichungen vom Normalwert/Kontrollwert (Tag 0), desto höher die Varianzen innerhalb der Gruppen. Bei genauer Betrachtung der Werte innerhalb der Gruppen fällt auf, dass einige Tiere sehr stark auf Cisplatin reagieren, wohingegen einige Tiere nur geringe bis keine Veränderung der Nierenfunktion über die untersuchten Parameter aufweisen. In Gruppe 3 (7 mg/kg + 5 % Glucose-Lsg.) zeigen die Tiere alle ver-

3. Ergebnisse

gleichbare Verschlechterungen der Nierenfunktion bis zu Tag 4 mit Varianzen von Kreatinin ($2,2 \text{ mg/dl} \pm 0,22$, $n=6$) und Harnstoff ($187,5 \text{ mg/dl} \pm 29,91$, $n=6$). Jedoch schwanken die Werte an Tag 7 sehr stark, da bei einigen Tieren eine Senkung der Parameter detektiert werden konnte, wohingegen andere einen weiteren Anstieg ihrer Nierenfunktionsparameter aufweisen. Damit ergeben sich sehr hohe Varianzen von Kreatinin ($1,04 \text{ mg/dl} \pm 0,9$, $n=5$) und bei Harnstoff ($201,75 \text{ mg/dl} \pm 90,24$, $n=5$).

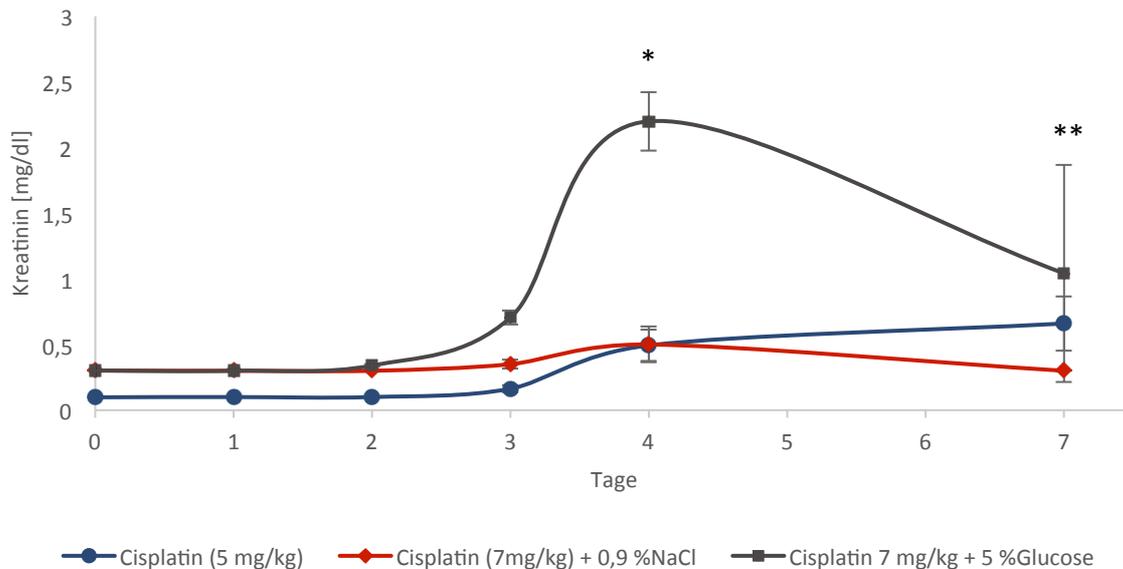


Abbildung 38: Serum-Kreatininkonzentration nach einmaliger Cisplatingabe (i.p.) mit unterschiedlichen Dosen und Vehikeln im zeitlichen Verlauf. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert \pm SE. • Blau: 5 mg/kg, ohne Vehikel ($n=3$); ♦ Rot: 7 mg/kg, mit 0,9 % NaCl 1 h vor- und nach Cisplatingabe sowie an Tag 1, 2, 3 und 4 ($n=6$); ■ Grau: 7 mg/kg, mit 5 % Glucose 1 h vor- und nach Cisplatingabe sowie an Tag 1, 2, 3 und 4 ($n=6$). *($p < 0,05$: Cisplatin (7mg/kg + Glucose) vs. Cisplatin (7 mg/kg + NaCl) an Tag 4, **($p < 0,05$: Cisplatin (7mg/kg + Glucose) vs. Cisplatin (7 mg/kg + NaCl) an Tag 7.

Da bei allen Tieren bei einer Dosis von 7 mg/kg Cisplatin + 5 % Glucose-Lösung als Vehikel eine Schädigung der Nierenfunktion erreicht werden konnte, somit alle Tiere einen Anstieg beider Parameter aufwiesen, wurde für alle weiteren Versuche die genannte Dosis und 5 % Glucose als Lösungsmittel verwendet.

3.6.2 Studiendesign (24-Stunden-Modell)

Der Fokus des 24-Stunden-Modells galt der kurzfristigen Aktivität der Wirkstoffe in Bezug auf Cisplatin-Ausscheidung sowie dessen antioxidative Wirkung in Niere und Leber. Platinbestimmungen sowie

Glutathion-Konzentrationen der Organhomogenisate dienten dabei als Parameter. Männliche Wistar-Ratten (Janvier, Frankreich) im Alter von 5 – 6 Wochen, mit einem mittleren Gewicht von 160 g wurden für die Studie verwendet. Die *In-vivo*-Studie wurde extern über die auf präklinische Studien spezialisierte Firma Heidelberg Pharma GmbH in Ladenburg durchgeführt. Alle verwendeten Substanzen wurden käuflich erworben (siehe Tabelle 7) oder wie in Kapitel 6.1 detailliert beschrieben, eigens synthetisiert.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Substanzen und deren Lösung.

Substanz	Herkunft	Löslichkeit
Cisplatin	Apotheke, Kopfklinik Heidelberg	bereits vorgelöst in NaCl (1mg/ml)
Liponsäure	Merck Millipore, Darmstadt	als Natrium-Salz in 5 %iger Glucose-Lsg.
Silybin	Cayman Chemicals, U.S.A	5 %ige Glucose-Lsg.
Carvedilol	ABCR, Karlsruhe	DMSO/Tween80/5% Glucose (10/10/80; v/v/v)

Das Injektionsvolumen betrug 2 ml/kg. Alle weiteren Informationen bezüglich Dosis und Anzahl der Tiere können folgender Tabelle entnommen werden.

Tabelle 8: Übersicht der Gruppe mit den jeweiligen Wirkstoffen, den applizierten Dosen und Route.

Gruppe	Cisplatin Tag 0 (t= 0h)	Behandlung -1 h und +1 h	Dosis	Route	Anzahl
1	7 mg/kg i.p.	5 %ige Glucose-Lsg.	2 ml/kg	i.p.	4
2	7 mg/kg i.p.	Liponsäure	6,25 mg/kg	i.p.	4
3	7 mg/kg i.p.	Carrier (1)	44 mg/kg	i.p.	4
4	7 mg/kg i.p.	Liponsäure-(KKEEE) ₂ K-NH ₂ (9)	50 mg/kg	i.p.	4
5	7 mg/kg i.p.	Silybin	20 mg/kg	i.p.	4
6	7 mg/kg i.p.	Silybin-(KKEEE) ₃ K-NH ₂ (13)	90 mg/kg	i.p.	4
7	7 mg/kg i.p.	Carvedilol	1 mg/kg	i.p.	4
8	7 mg/kg i.p.	Carvedilol-(KKEEE) ₃ K-NH ₂ (12)	6,5 mg/kg	i.p.	4

Da sowohl die Cisplatin als auch die Behandlungssubstanzen intraperitoneal verabreicht werden sollten, wurden die Applikationen kontralateral durchgeführt, um eine Vermischung beider Substanzen im Bauchraum zu verhindern. 24 Stunden nach Cisplatingabe wurden alle Tiere mittels CO₂-Inhal-

3. Ergebnisse

lation euthanasiert und anschließend beide Nieren und die Leber entnommen. Alle entnommenen Proben wurden schockgefroren und bei $< 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.6.2.1 Platinbestimmungen der Nieren- und Leberhomogenisate

Um eine einheitliche Aussage über die Platinkonzentration der Nieren und der Leber treffen zu können, wurde zunächst das ganze Organ homogenisiert und anschließend ein Teil des Homogenisats über ICP-MS-Analyse untersucht. Detaillierte Angaben zur Methode sind im Kapitel 6.1.10 zu finden.

Die Ergebnisse zeigen, dass 24 Stunden nach Cisplatingabe alle Tiere der einzelnen Gruppen eine erhöhte Platinkonzentration, im Mittelwert von $19\text{ }\mu\text{g/g}$ Niere aufweisen (**Abbildung 39**). Unbehandelte Tiere (Wistar Ratten) hingegen besitzen nur eine sehr geringe Platinkonzentration von unter $0,035\text{ }\mu\text{g/g}$ [208]. Somit kann eine deutliche Akkumulation des Zytostatikums in den Nieren, 24 Stunden nach Cisplatingabe bestätigt werden.

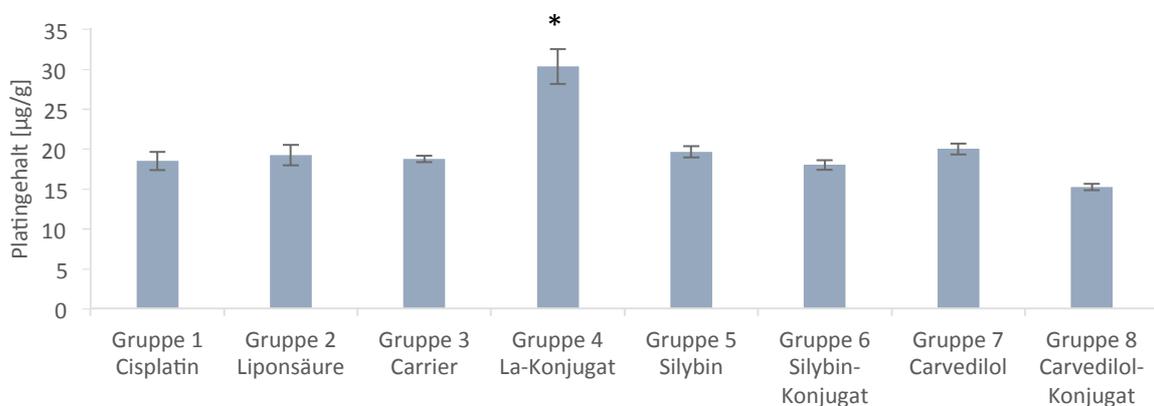


Abbildung 39: Platingehalt der Nierenhomogenisate, 24 h nach Cisplatin-Injektion. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm SE ($n=4$). Alle Gruppen erhielten einmalig Cisplatin (7 mg/kg i.p.) und an den Zeitpunkten -1 h , $+1\text{ h}$ zusätzlich eine weitere *i.p.*-Injektionen mit protektiven Wirkstoffen der jeweiligen Gruppe (Zur Übersicht siehe Kapitel 3.6.2). * ($p < 0,05$: Grp. 4 vs. alle).

Gruppe 4, die als Therapiesubstanz das LA-Konjugat (**9**) injiziert bekamen, weist als einzige Gruppe eine signifikant höhere Cisplatin-Konzentration von $30,3\text{ }\mu\text{g/g} \pm 2,2$ auf im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Keine signifikanten Unterschiede konnten in allen weiteren Gruppen untereinander festgestellt werden.

Bei der Betrachtung der Platinkonzentrationen in den Leberhomogenisaten fällt dagegen auf, dass viel geringere Werte im Vergleich zur Niere erreicht wurden ($M_w = 4,3 \mu\text{g/g}$ Leber). Die Leber als Entgiftungsorgan scheint bei der Cisplatin-Metabolisierung eine weniger große Rolle zu spielen. Trotzdem ist auch hier eine Erhöhung im Vergleich zum Kontrollwert ($<0,01 \mu\text{g/g}$ Leber, [208]) ersichtlich. Bei einem alpha-Fehler von 0,05 konnten keine signifikanten Unterschiede unter den Gruppen ermittelt werden.

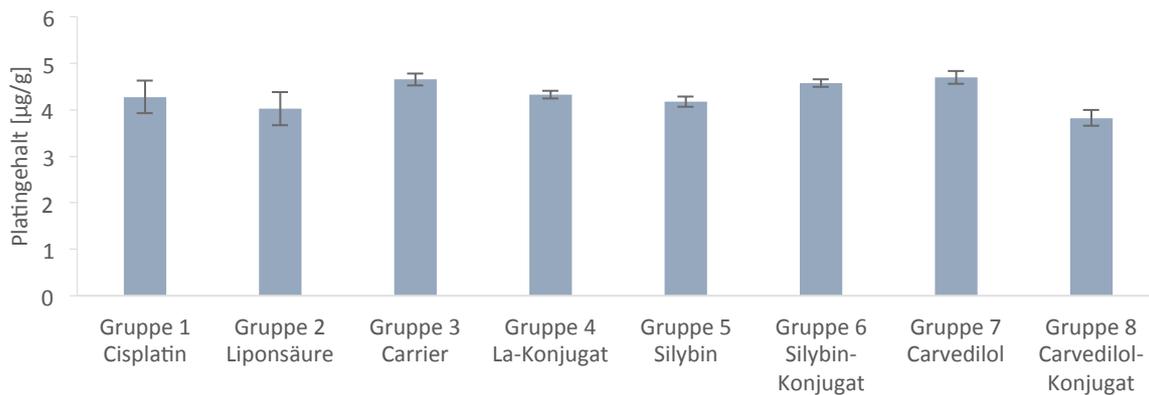


Abbildung 40: Platingehalt der Leberhomogenisate, 24 h nach Cisplatin-Injektion. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm SE ($n=4$). Alle Gruppen erhielten einmalig Cisplatin (7 mg/kg i.p.) und an den Zeitpunkten -1 h , $+1 \text{ h}$ zusätzlich eine weitere *i.p.*-Injektionen mit protektiven Wirkstoffen der jeweiligen Gruppe (Zur Übersicht siehe Kapitel 3.6.2). ($p > 0,05$, keine Signifikanz.)

3.6.2.2 GSH-Bestimmungen der Nierenhomogenisate

Bei Glutathion (GSH) handelt es sich um ein Tripeptid, welches eine zentrale Rolle als Antioxidans und Radikalfänger innerhalb der Zellen einnimmt. Hohe GSH-Konzentration des thiolhaltigen Peptids mit bis zu 15 mM können in unterschiedlichsten Zellen ermittelt werden. Cisplatin löst durch unterschiedliche Kaskaden oxidativen Stress aus, der unter anderem als einer der Hauptgründe für die starke Nephrotoxizität Cisplatins gilt [113]. Die Bestimmung der GSH-Konzentration liefert somit Erkenntnisse darüber, in wieweit die untersuchten Organe/Zellen oxidativen Stress ausgesetzt waren. Im Rahmen dieser Studie wurden die GSH-Konzentration der Nieren- und Leberhomogenisate spektralphotometrisch bestimmt. Detaillierte Beschreibungen der Methode sind in Kapitel 6.1.9 zu finden.

3. Ergebnisse

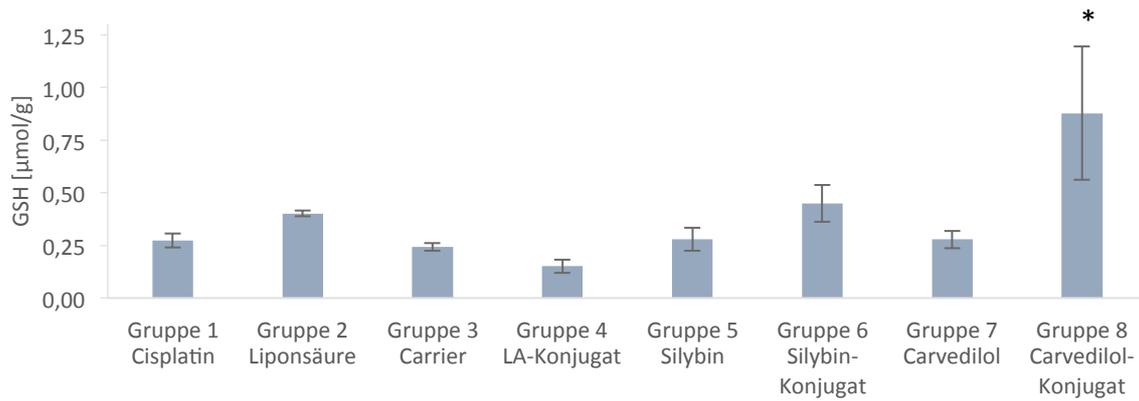


Abbildung 41: Glutathion-Konzentration der Nierenhomogenisate, 24 h nach Cisplatin-Injektion. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm SE (n=4). Alle Gruppen erhielten einmalig Cisplatin (7 mg/kg i.p.) und an den Zeitpunkten -1 h, + 1 h zusätzlich eine weitere i.p.-Injektionen mit protektiven Wirkstoffen der jeweiligen Gruppe (Zur Übersicht siehe Kapitel 3.6.2). * ($p < 0,05$: Grp.8 vs. Grp. 1, 3, 4, 5 und 7).

Zunächst ist zu erwähnen, dass kein Vergleich zu einem Nullwert möglich ist, da das Studiendesign keine Kontrollgruppe beinhaltete. Zudem kann kein *Bridging* zu Werten aus der Literatur stattfinden, da sehr große Abweichungen der Werte bereits innerhalb einzelner Literaturquellen aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Methoden zur GSH-Bestimmung vorliegen. Somit ist lediglich ein Vergleich der Gruppen untereinander möglich.

Abbildung 41 zeigt eine Übersicht der GSH-Konzentration der Nierenhomogenisate, 24 Stunden nach Cisplatin-Injektion. Bei Gruppe 8, die das Carvedilol-Konjugat als Therapiesubstanz verabreicht bekam, konnte eine signifikante höhere GSH-Konzentration im Vergleich zu Gruppe 1, 3, 4, 5 und 7 ermittelt werden. Die vergleichsweise höheren GSH-Werte deuten auf einen geringeren oxidativen Stress in den Zellen hin (24 Stunden nach Cisplatin-Injektion). Besonders hervorzuheben ist dabei der signifikante Unterschied des Carvedilol-Konjugats $0,98 \mu\text{mol/g} \pm 0,32$ zum freien Wirkstoff $0,28 \mu\text{mol/g} \pm 0,04$ (Gruppe 7), was auf einen *Targeting*-Effekt deutet. Alle weiteren getesteten Wirkstoffe (Liponsäure und Silybin) jedoch konnten diesen *Targeting*-Effekt nicht bestätigen. Allerdings zeigt der Vergleich von Gruppe 5 (freier Wirkstoff Silybin) und Gruppe 6 (entsprechendes Konjugat) die gleiche Tendenz, wobei hier jedoch rechnerisch keine Signifikanz ermittelt werden konnte. Gruppe 2 (freie Liponsäure) zeigt im Vergleich zu der konjugierten Liponsäure sogar ein kontroverses Bild, auch hier ohne signifikanten Unterschied. Da die Varianz innerhalb der Gruppe 8 relativ hoch ist und die Anzahl an Tieren gleichzeitig mit $n=4$ sehr klein ist, sind die Ergebnisse nur gering aussagekräftig.

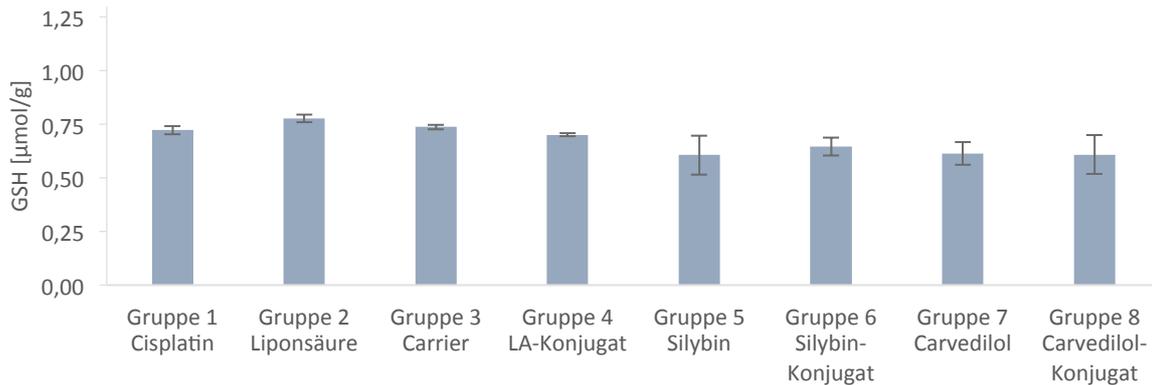


Abbildung 42: Glutathion-Konzentration der Leberhomogenisate, 24 h nach Cisplatin-Injektion. Die Werte entsprechen den Mittelwerten \pm SE ($n=4$). Alle Gruppen erhielten einmalig Cisplatin (7 mg/kg i.p.) und an den Zeitpunkten -1 h, + 1 h zusätzlich eine weitere i.p.-Injektionen mit protektiven Wirkstoffen der jeweiligen Gruppe (Zur Übersicht siehe Kapitel 3.6.2). ($p > 0,05$, keine Signifikanz).

Die GSH-Konzentrationen der Leberhomogenisate zeigen hingegen ein sehr konsistentes Bild (**Abbildung 42**). Im Vergleich zur Niere werden im Schnitt höhere GSH-Werte erreicht. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander ermittelt werden. Gleichzeitig sind die Varianzen innerhalb der Gruppen durchgängig klein, sodass die Ergebnisse insgesamt aussagekräftiger sind.

3.6.3 Studiendesign (7-Tage-Modell)

Das 7-Tage-Modell baut auf dem 24-Stunden-Modell (siehe Kapitel 3.6.2) auf. In dieser Studie gilt der Fokus jedoch auf eine längerfristige Wirkung der verwendeten Wirkstoffe (**Tabelle 9**). Neben den zwei Applikationen direkt vor und nach Cisplatingabe wurde anschließend in 4 aufeinanderfolgenden Tagen täglich eine weitere Applikation der jeweiligen Wirkstoffe durchgeführt. Eine Übersicht über alle Injektionen und untersuchten Parametern gibt folgende Abbildung.

3. Ergebnisse

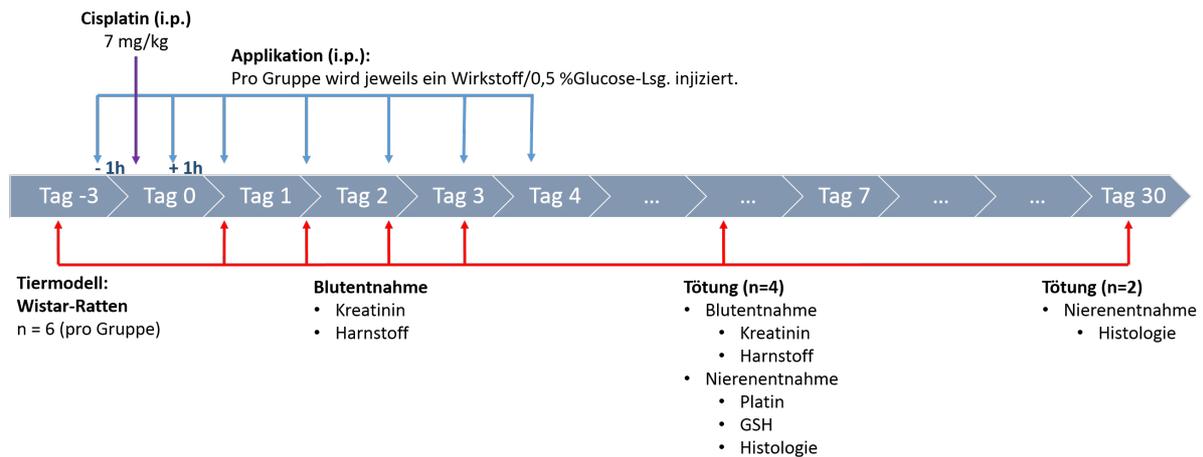


Abbildung 43: Studiendesign Proof of concept „NephroGuard“, 7-Tage-Modell mit allen Applikationen und Probenentnahmen im zeitlichen Verlauf.

Des Weiteren wurde neben der Liponsäure, ein Fokus auf den Wirkstoff Carvedilol gelegt, sodass in dieser Studie zusätzlich neben der Hochdosis (vergleichbar zur Literatur und 24-h-Modell) eine Niedrigdosis des reinen Wirkstoffs und des zugehörigen Konjugats untersucht wurden. Eine Übersicht zu allen Gruppen, den angewandten Dosen, Tieranzahl gibt folgende Tabelle. Zusätzlich wurden histologische Untersuchungen durchgeführt nach sieben sowie nach 30 Tagen, um Aufschluss über kurzfristige und langfristige gewebespezifische Veränderungen zu gewinnen.

Tabelle 9: Übersicht der Gruppe mit den jeweiligen Wirkstoffen, den applizierten Dosen und Routen des 7-Tage-Modells.

Gruppe	Cisplatin Tag 0 (t= 0h)	Behandlung -1 h und +1 h	Dosis	Route	Anzahl
1	7 mg/kg i.p.	5 %ige Glucose-Lsg.	2 ml/kg	i.p.	5*
2	7 mg/kg i.p.	Liponsäure	6,25 mg/kg	i.p.	6
3	7 mg/kg i.p.	Liponsäure-(KKEEE) ₂ K-NH ₂ (9)	50 mg/kg	i.p.	6
4	7 mg/kg i.p.	Carrier (1)	44 mg/kg	i.p.	5*
5	7 mg/kg i.p.	Carvedilol	1 mg/kg	i.p.	6
6	7 mg/kg i.p.	Carvedilol-(KKEEE) ₃ K-NH ₂ (12)	6,5 mg/kg	i.p.	6
7	7 mg/kg i.p.	Carvedilol	0,2 mg/kg	i.p.	6
8	7 mg/kg i.p.	Carvedilol-(KKEEE) ₃ K-NH ₂ (12)	1,4 mg/kg	i.p.	6

* Tier an Tag 4 wegen starken Gewichtsverlust euthanasiert.

3.6.3.1 Kreatinin- und Harnstoff-Bestimmungen

Um einen protektiven Effekt der verwendeten Wirkstoffe zu ermitteln, wurden die Serum-Kreatinin- und Harnstoffkonzentration als Parameter der Nierenfunktion verwendet. Beide Parameter zeigen in allen Gruppen im zeitlichen Verlauf eine Zunahme der Werte drei Tage nach Cisplatingabe (**Abbildung 44** und **Abbildung 45**). Sowohl innerhalb der Gruppen als auch im Vergleich sind jedoch nur geringe Unterschiede zu erkennen. Die Werte an Tag 4 zeigen hingegen eine größere Streuung der Gruppen untereinander, wobei gleichzeitig die Werte innerhalb der Gruppe stärker variieren, sodass keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten. Sieben Tage nach Cisplatingabe sind die größten Streuungen beider Nierenfunktionsparameter im Vergleich der Gruppen untereinander ersichtlich. Während Gruppe 1 (Cisplatin + Vehikel) und Gruppe 3 (Liponsäure-Konjugat) weiterhin ansteigen, zeigen die restlichen Gruppen eine Regenerierung der Nierenfunktion durch eine dezente (Harnstoffkonzentration) bis starke Abnahme (Serum-Kreatinin) beider Parameter. Wie bereits bei der Cisplatin-Dosisfindung ersichtlich (Kapitel 3.6.1) steigen die Varianzen innerhalb der Gruppen bei Zunahme des Mittelwerts stark an. Gruppe 1 und 3 zeigen dabei jeweils die höchsten ermittelten Konzentrationen beider Parameter, jedoch gleichzeitig die größten Varianzen $1,9 \pm 0,9$ $\mu\text{g/g}$ Kreatinin bei Cisplatin und $2,7 \pm 0,8$ $\mu\text{g/g}$ Kreatinin innerhalb der LA-Konjugat Gruppe.

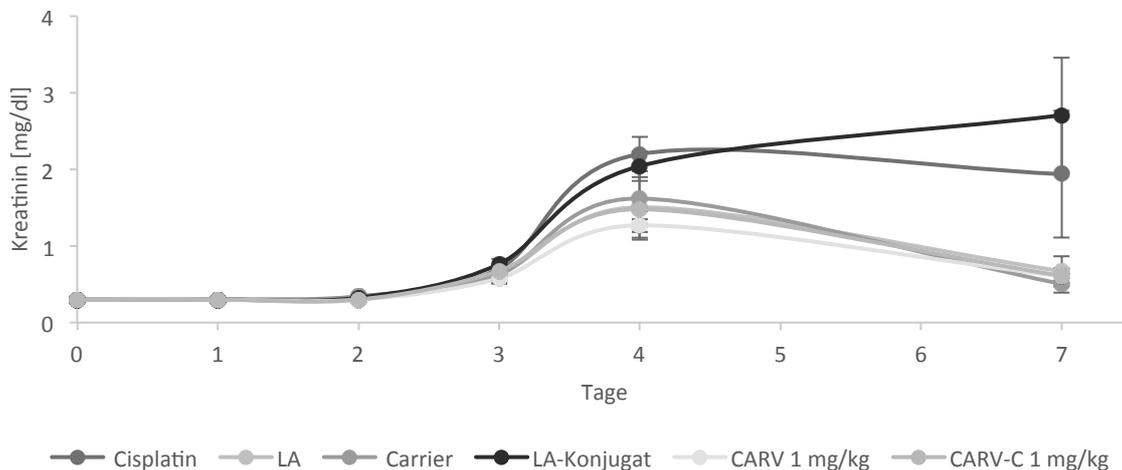


Abbildung 44: Serum-Kreatininkonzentration der jeweiligen Gruppen im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Injektion an Tag 1 (7 mg/kg, i.p.). Die Daten werden als Mittelwert \pm SE angegeben. Alle weiteren Parameter zu den Gruppen können Tabelle 9 entnommen werden.

3. Ergebnisse

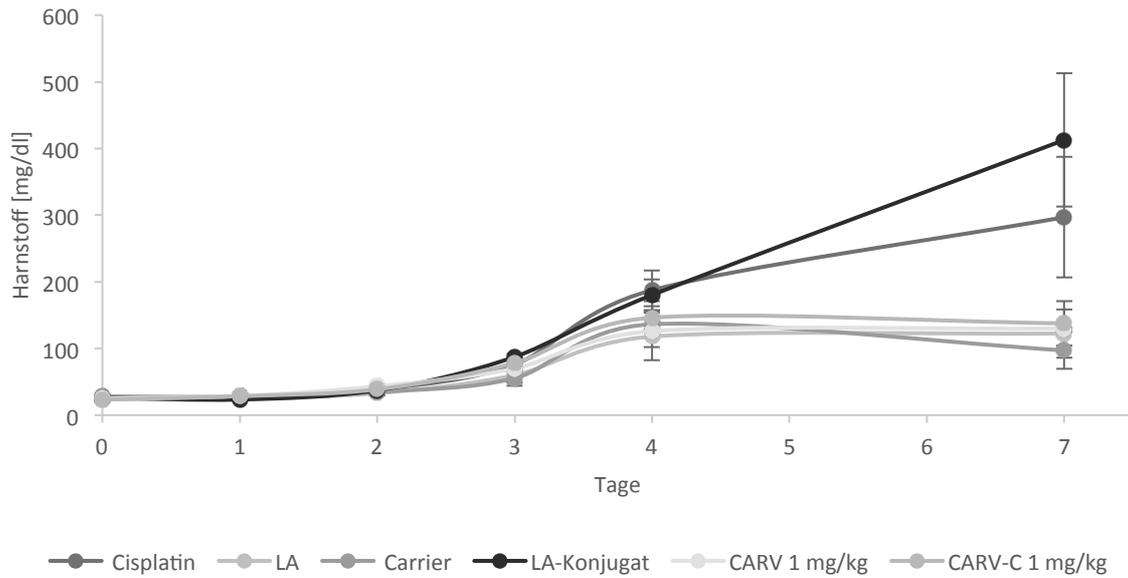


Abbildung 45: Serum-Harnstoffkonzentration der jeweiligen Gruppen im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Injektion an Tag 1 (7 mg/kg, i.p.). Die Daten werden als Mittelwert \pm SE angegeben. Alle weiteren Parameter zu den Gruppen können Tabelle 9 entnommen werden.

Zur besseren Übersicht wurde Tag 7 zusätzlich als Balkendiagramm dargestellt (**Abbildung 46** **Abbildung 47**). Da die Daten innerhalb der Gruppe stark variieren, sind nur geringe signifikante Unterschiede im Vergleich ermittelbar. Jedoch können trotzdem einige Tendenzen aus den ermittelten Daten gewonnen werden.

Zunächst ist zu erwähnen, dass durch die Gabe von Cisplatin im Vergleich zu den Kontrollwerten ein starker Anstieg bei Kreatinin von $0,3 \pm 0,01$ auf $1,9 \pm 0,9$ mg/dl und bei Harnstoff von $25 \pm 0,6$ auf $297 \pm 90,3$ mg/dl ermittelt werden kann. Im Vergleich zu Gruppe 1 (Cisplatin + Vehikel) zeigen alle behandelten Tiere bis auf Gruppe 3 wesentlich geringe Werte in beiden Parametern, sodass eine protektive Wirkung aller getesteten Substanzen in Bezug auf Kreatinin und Harnstoff gezeigt werden kann. Dennoch konnten bei einem α -Fehler von 0,05 keine signifikanten Unterschiede zu Gruppe 1 ermittelt werden, aufgrund der großen Varianzen innerhalb der Gruppen. Im Vergleich zur Literatur jedoch kann nach sieben Tage im Mittelwert in keiner Gruppe Normalwerte erreicht werden (siehe Vergleich zu Kontrolle).

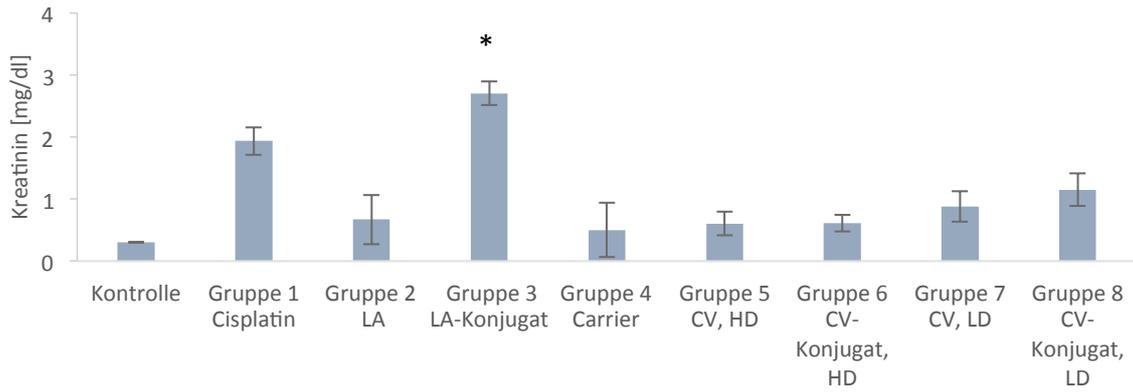


Abbildung 46: Serum-Kreatininkonzentration der jeweiligen Gruppen, 7 Tage nach Cisplatin-Injektion (7 mg/kg, i.p.). Die Daten werden als Mittelwert ± SE angegeben. Alle weiteren Parameter zu den Gruppen können Tabelle 9 entnommen werden. * ($p < 0,05$: Grp.3 vs. Kontrolle, Grp. 2, 4, 5 und 6).

Des Weiteren fällt auf, dass zwischen der Hochdosis Carvedilol und der Niedrigdosis keine signifikanten Unterschiede in beiden betrachteten Parametern bestehen. Auch die Konjugationen an den nie-renspezifischen Carrier zeigen in beiden angewandten Dosen keine signifikanten Unterschiede. Unerwartete protektive Wirkung zeigte der „nackte“ Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**), der vergleichbare Mittelwerte zu allen anderen Therapiegruppen erreicht.

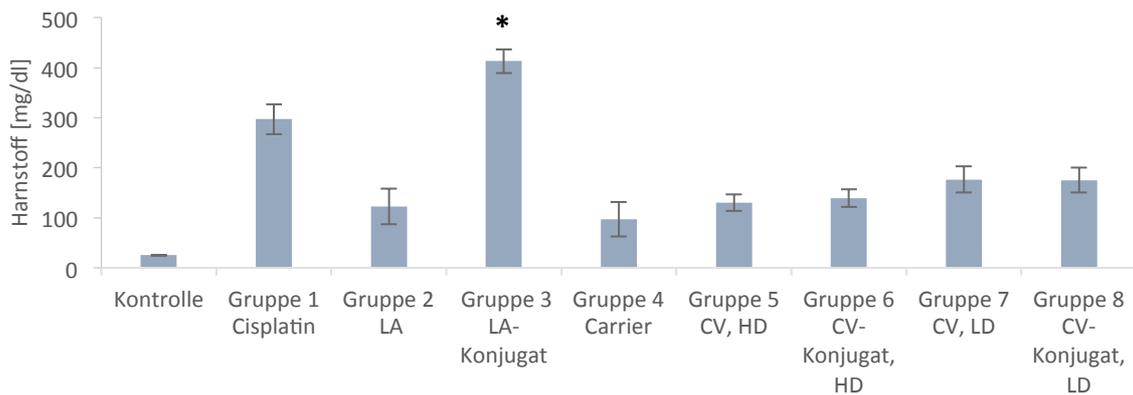


Abbildung 47: Serum-Harnstoffkonzentration der jeweiligen Gruppen, 7 Tage nach Cisplatin-Injektion (7 mg/kg, i.p.). Die Daten werden als Mittelwert ± SE angegeben. Alle weiteren Parameter zu den Gruppen können Tabelle 9 entnommen werden. * ($p < 0,05$: Grp.3 vs. Kontrolle, Grp. 1, 2, und 4).

Trotz hoher Varianzen innerhalb der Gruppe, zeigt die LA-Konjugat-Gruppe als einzige Gruppe signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrollwerten. Im Serum-Harnstoff können sogar signifi-

3. Ergebnisse

kant höhere Werte über 38 % im Vergleich zu Gruppe 1 (Cisplatin + Vehikel) erreicht werden, woraus geschlossen werden kann, dass durch die Gabe des Liponsäure-Konjugats eine zusätzliche Verschlechterung der Nierenfunktion entwickelt wurde (Gruppe 1: $297 \pm 90,25$ mg/dl im Vergleich Gruppe 3: $412,83 \pm 99,83$ mg/dl). Interessant dabei ist, dass lediglich die konjugierte Liponsäure zu erhöhten Nierenschädigungen führt. Der freie Wirkstoff α -Liponsäure (Gruppe 2) zeigt signifikant niedrigere Werte in beiden Parametern im Vergleich zur konjugierten Form (Gruppe 3).

3.6.3.2 Platinbestimmungen der Nierenhomogenisate

Zunächst ist zu erwähnen, dass die untersuchten Tiere sieben Tage nach Cisplatingabe wesentlich niedrigere Platinkonzentrationen aufweisen im Vergleich zu denen 24 Stunden nach Cisplatingabe (siehe Kapitel 3.6.2.1). Im Schnitt konnte eine Reduktion des Platingehalts der Nieren von ca. 78 % innerhalb von sechs Tagen ermittelt werden. Dennoch sind weiterhin erhöhte Platinkonzentrationen in den Nieren nachweisbar im Vergleich zum Kontrollwert von $0,035 \mu\text{g/g}$ (**Abbildung 48**) [208].

Bei der Betrachtung der Gruppen untereinander fällt zunächst auf, dass die Werte die Ergebnisse der Kreatinin- und Harnstoffbestimmungen widerspiegeln. Alle behandelten Gruppen bis auf Gruppe 3 weisen tendenziell im Vergleich zur Cisplatin-Gruppe (Gruppe 1) niedrigere Konzentrationen auf. Jedoch konnten auch hier keine Signifikanzen ermittelt werden, aufgrund von zu kleinen Tieranzahlen pro Gruppe (Gruppe 1, $n = 3$) und den dadurch erhöhten Varianzen. Gruppe 4 (Carrier) zeigt mit einem Mittelwert von $3,8 \pm 3,12 \mu\text{g/g}$ die geringste Platinkonzentration, weist gleichzeitig jedoch eine hohe Streuung der Werte auf. Dennoch muss diskutiert werden, ob das Peptid Ausscheidungsprozesse Cisplatins innerhalb der Zellen beeinflusst oder eine Aufnahme des Zytostatikums in die Zelle verhindert.

Vergleichbar mit den Nierenfunktionsparametern zeigen auch die Carvedilol-Gruppen (Gruppe 5-8) im Vergleich keine Unterschiede bezüglich des Platingehalts. Sowohl bei der Hoch- und Niedrigdosis, als auch bei den freien Wirkstoffen und den zugehörigen Konjugaten sind im Vergleich keine Unterschiede ersichtlich.

Gruppe 3 (LA-Konjugat) besitzt erneut als einzige Gruppe signifikant höhere Werte, Platinkonzentrationen im Mittel von $10,55 \pm 1,9 \mu\text{g/g}$ konnten in den Nierenhomogenisaten ermittelt werden. Im Vergleich dazu wurden um 43 % geringere Werte in den Nieren der Cisplatin-Gruppe ($5,97 \pm 0,63 \mu\text{g/g}$) detektiert. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die Gabe des LA-Konjugats zu einer Steigerung der Cisplatin-Konzentration in den Nieren führt. Auch hier kann diese Beobachtung ledig-

lich in der konjugierten Form verzeichnet werden. Der freie Wirkstoff (Gruppe 2) zeigt signifikant niedrigere Platinkonzentrationen im Mittelwert $3,7 \pm 0,98 \mu\text{g/g}$.

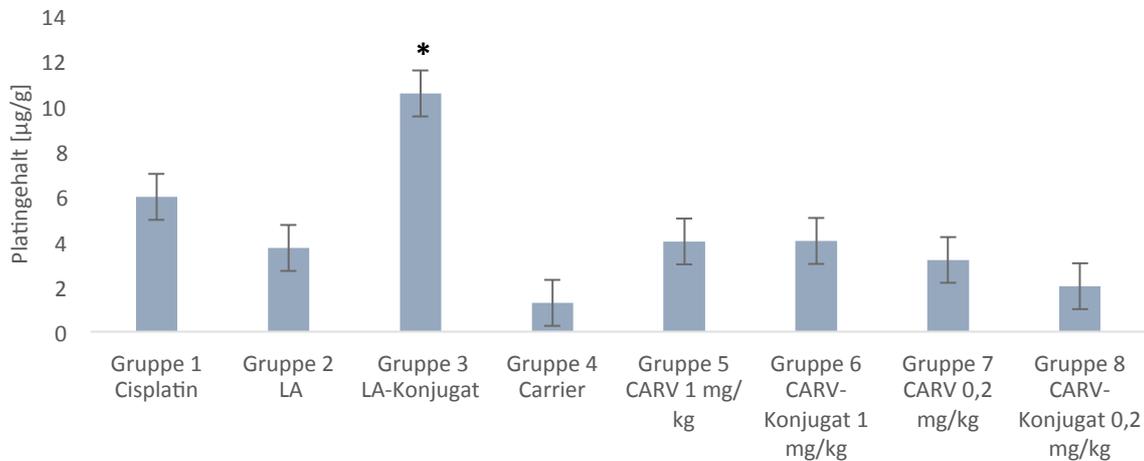


Abbildung 48: Platinwerte der Nierenhomogenisate der jeweiligen Gruppen, 7 Tage nach Cisplatin-Injektion (7 mg/kg, i.p.). Die Daten werden als Mittelwert \pm SE angegeben. Alle weiteren Parameter zu den Gruppen können Tabelle 9 entnommen werden. * ($p < 0,05$: Grp.3 vs. Grp. 2, 4, 5 und 6).

3.6.3.3 Histochemische Untersuchungen

Um renale Alterationen histochemisch sichtbar zu machen, wurden die Organschnitte über die Massons-Trichrom-Methode gefärbt, die neben den zellspezifischen Strukturen, Kollagenstruktur durch eine blaue Färbung hervorhebt. Details zur Färbungsmethode sind in Kapitel 6.1.12.2 zu finden.

Laut Literatur löst eine einmalige Gabe von Cisplatin proximale und distale Tubulusnekrosen aus, insbesondere im S3-Segment des proximalen Tubulus. Cisplatin wird zu 50 % renal ausgeschieden, wo es entgegen seines Konzentrationsgradienten gespeichert wird. Die Cisplatinkonzentration ist im Epithel der proximalen Tubuli fünfmal so hoch wie im Plasma [96, 97]. Unterschiedliche Schädigungsmechanismen Cisplatins führen zu Zellschädigungen und tubulären Dilatationen durch Kollagenablagerungen. Die mikroskopischen Aufnahmen der NephroGuard-Studie, sieben Tage nach Cisplatinapplikation zeigen die erwartete tubulotoxische Wirkung Cisplatins (**Abbildung 49**). Gruppe 1 (Cisplatin + Glucose-Lösung) weist im Nierencortex einen Verlust der tubulären Organisation auf, die Epithelwände der proximalen Tubuli sind stark erweitert, liegen teilweise losgelöst aus ihrer Struktur vor. Des Weiteren sind im Vergleich zum Kontrolltier bereits größere Kollagenablagerungen ersichtlich, die auf tubulointerstitielle Fibrose deuten. Zusätzlich werden durch die Färbung Ablagerungen, sogenannte „casts“ im distalen Tubuluslumen sichtbar, die stark auf eine Proteinurie hindeuten [209]. Bei diesen Ablagerungen handelt es sich um ausgefallene Proteine, wie Albumin oder Mucine,

3. Ergebnisse

die unter bestimmten Bedingungen (niedrigem Fluss, hohen Salzkonzentrationen, niedrigem pH-Wert, etc.) denaturieren und ausfallen. Im Glomerulum können hingegen keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden, sodass eine Schädigung des Glomerulum ausgeschlossen werden kann.

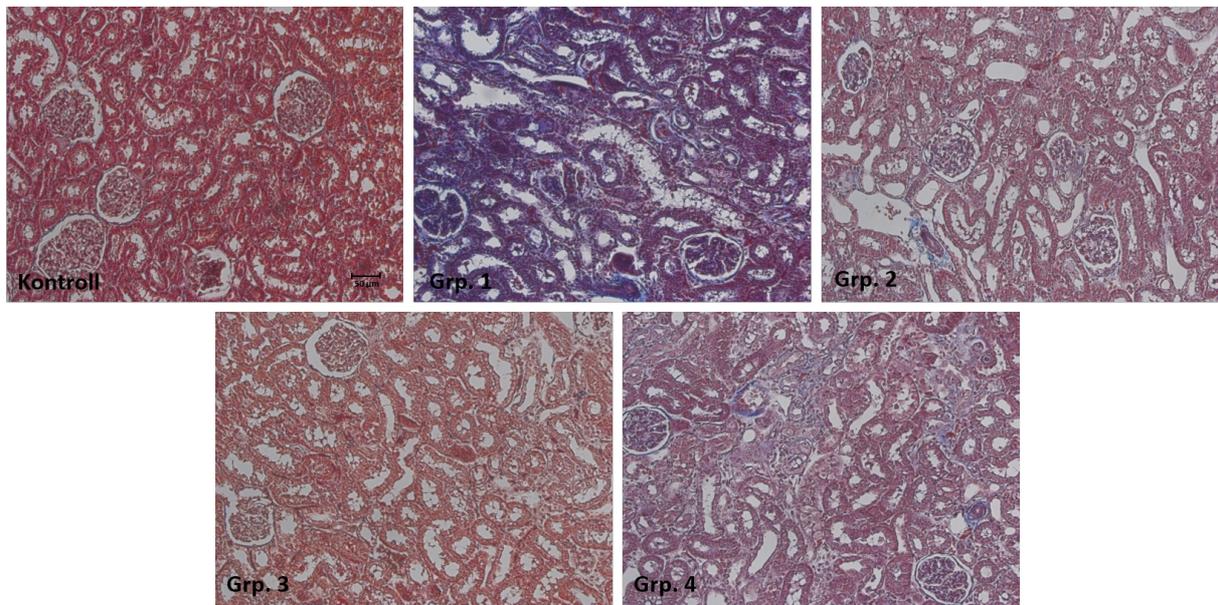


Abbildung 49: Mikroskopische Aufnahmen des Nierencortex (400-fach) eines Tiers aus den jeweiligen Gruppen, sieben Tage nach Cisplatingabe. Um fibrotische Strukturen (blau) sichtbar zu machen, wurde eine Massons-Trichrom-Färbung durchgeführt. Grp. 1 = Cisplatin + Glucose-Lsg.; Grp. 2 = Cisplatin + LA; Grp. 3 = Cisplatin + LA-Konjugat; Grp. 4 = Cisplatin + Carrier.

Im Vergleich dazu zeigt Gruppe 2 (Cisplatin + Liponsäure) eine geringfügigere Schädigung. Zwar können auch hier tubuläre Dilatationen ermittelt werden, jedoch liegen nur minimale Veränderungen der gewebsspezifischen Strukturen vor. Eine geringere Schädigung des Gewebes im Vergleich zu Gruppe 2 zeigt Gruppe 3 (Cisplatin + Carrier). Nur geringe Vergrößerungen des Tubuluslumen können im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden, keine Kollagenablagerungen sind ersichtlich. Gruppe 4 (Cisplatin + LA-Konjugat) hingegen zeigt verstärkte Kollagenablagerungen im interstitiellen Raum und teilweise deuten die losgelösten tubulären Strukturen auf eine akute Nekrose hin. Dennoch können im Vergleich zu Gruppe 1 geringfügigere Schädigungen der Cisplatingabe identifiziert werden. Zusammengefasst weisen alle behandelten Gruppen histologisch eine Verbesserung der nephrotoxischen Wirkung Cisplatin auf.

Zur besseren Übersicht wurden alle mit Carvedilol behandelten Tiere in folgender Abbildung zusammengefasst (**Abbildung 50**). Bei Gruppe 5 und 6 handelt es sich jeweils um die Hochdosis von 1 mg/kg, einmal frei und einmal konjugiert. Gruppe 5 (freier Wirkstoff, Hochdosis) zeigt massive Kollageneinlagerungen und starke renale Alterationen im Nierencortex. Der konjugierte Wirkstoff hingegen zeigt nur geringe Kollagenablagerung, jedoch auch tubuläre Dilatationen und Anzeichen tubulärer Nekrosen. Vom Grad der zellspezifischen Alterationen unterscheidet sich Gruppe 6 nur sehr geringfügig von Gruppe 5. Gruppe 7 (Carvedilol, Niedrigdosis) und Gruppe 8 (Carvedilol-Konjugat, Niedrigdosis) zeigen ähnliche Schädigungen wie die Hochdosis-Gruppen (Gruppe 5 + 6). Im Vergleich sind keine signifikanten Unterschiede zwischen freier Wirkstoff und dem Konjugat ersichtlich, noch zeigen Niedrig- und Hochdosis erhebliche Varianzen. Dennoch konnte im Vergleich zu Gruppe 1 (Cisplatin + Glucose) eine verbesserte Konstitution der tubulären Strukturen ermittelt werden, sodass die Gabe von Carvedilol in allen angewandten Dosen eine protektive Wirkung auf die Nephrotoxizität Cisplatin aufweist.

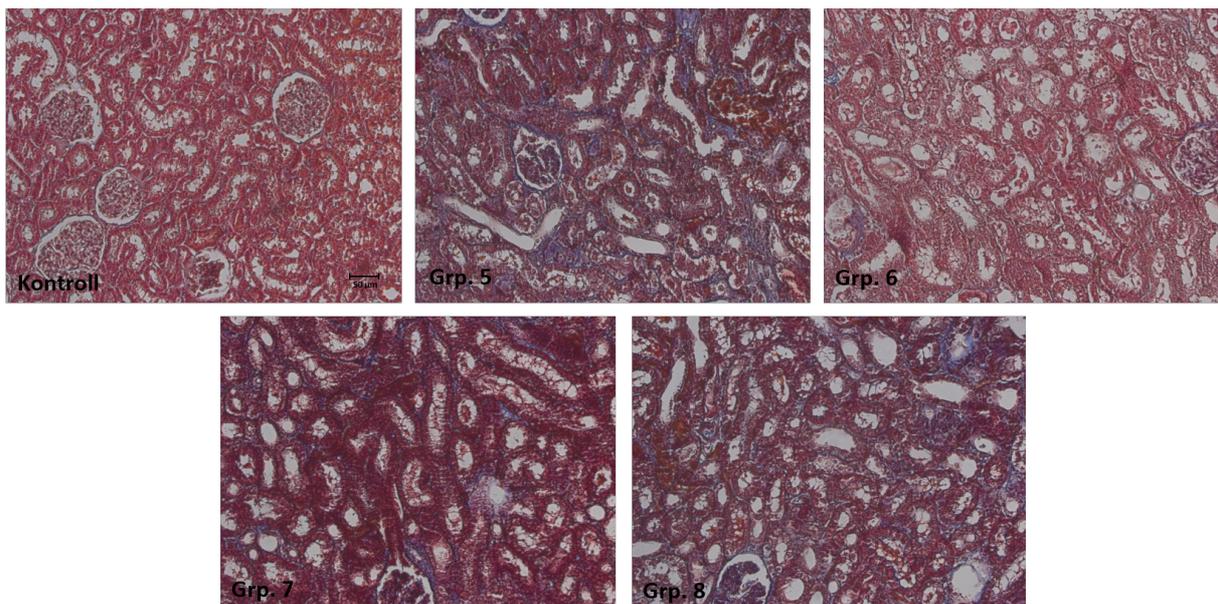


Abbildung 50: Mikroskopische Aufnahmen des Nierencortex (400-fach) eines Tiers aus den mit Carvedilol behandelten Tieren, sieben Tage nach Cisplatingabe. Um fibrotische Strukturen (blau) sichtbar zu machen, wurde eine Massons-Trichrom-Färbung durchgeführt. Grp. 5 = Cisplatin + 1 mg/kg Carvedilol.; Grp. 6 = Cisplatin + 1 mg/kg Carvedilol-Konjugat; Grp. 7 = 0,2 mg/kg Carvedilol; Grp. 8 = Cisplatin + 0,2 mg/kg Carvedilol-Konjugat.

Um die Beobachtungen quantifizieren zu können, wurde der Grad der Kollageneinlagerungen (blau) über eine Bildbearbeitungssoftware (ImageJ) in Pixel pro Sichtfeld ermittelt. Da die Ursache von Kollageneinlagerungen Entzündungsprozesse sind, dient der Grad an fibrotischen Gewebe im Vergleich zum Kontrolltier als Marker der Konstitution der Zelle. Je höher die nephrotoxische Wirkung Cisplatin

3. Ergebnisse

tins, desto höher der Anteil an fibrotischen Gewebe. Die Ergebnisse bilden dabei den Mittelwert aus 10 unterschiedlichen Aufnahmen einer Niere pro Gruppe. Des Weiteren wurden neben dem Nierencortex weitere Organsegmente (äußere Medulla, innere Medulla) untersucht, um ein umfangreiches Bild des ganzen Organs zu erhalten.

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung des Nierencortex stimmen mit den einzelnen Beobachtungen der Organschnitte überein (**Abbildung 51**). Gruppe 1, die lediglich eine Glucose-Lösung als Vehikel erhalten hatte, zeigt die signifikant größten Kollagenablagerungen im Vergleich zu allen weiteren Gruppen. Gruppe 4, die mit LA-Konjugat als Protektivum behandelt wurde, zeigt im Schnitt 25 % weniger fibrotisches Gewebe im Vergleich zu Gruppe 1. Dennoch konnte eine signifikant höhere Schädigung im Vergleich zu allen weiteren Gruppen ermittelt werden, teilweise bis zu 75 % im Vergleich zu Gruppe 3. Die über Liponsäure behandelte Gruppe hingegen zeigt genauso wie Gruppe 3 (Carrier), Gruppe 5 (Carvedilol, Hochdosis) und 7 (Carvedilol, Niedrigdosis) keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe, sodass hier eine potente protektive Wirkung der Wirkstoffe ersichtlich wird. Die Carvedilol-Behandlungen mit unterschiedlichen Dosen sowie in konjugierter Form zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede. Die konjugierten Formen erreichen jedoch höhere Mittelwerte, sodass im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied besteht.

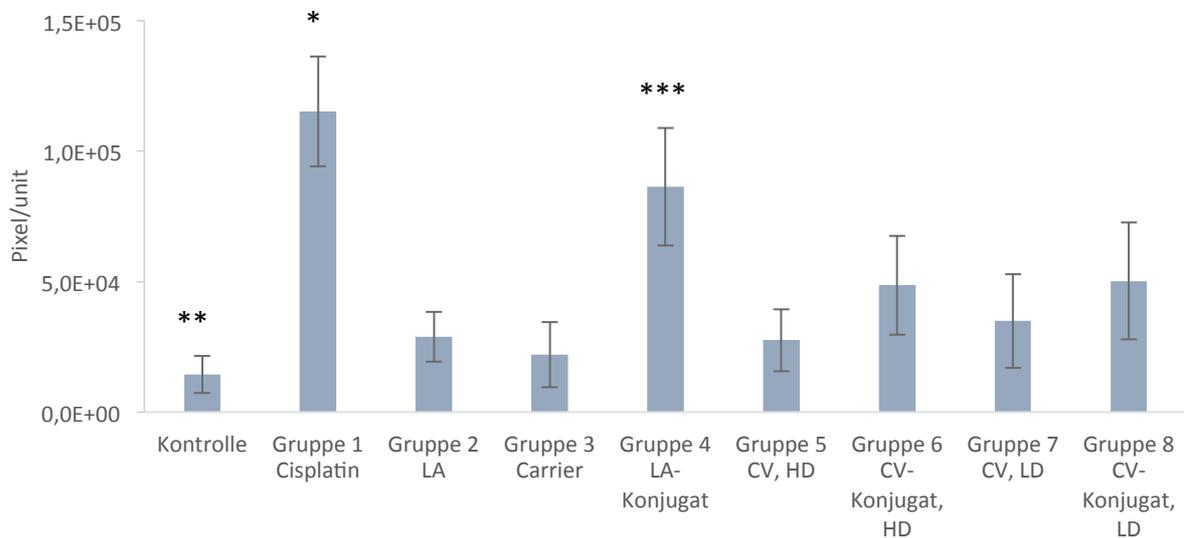


Abbildung 51: Quantitative Auswertung des fibrotischen Anteils im Nierencortex in den jeweiligen Gruppen. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SD aus 10 gefertigten Mikroskop-Aufnahmen des Nierencortex jeweils einer Niere pro Gruppe. * ($p < 0,05$ Grp.1 vs. alle) ** ($p < 0,05$: Kontrolle vs. Grp. 1, 4, 6 und 8) ***($p < 0,05$: Gr.4 vs. alle)

Im intermediären Bereich zwischen Cortex und Medulla (äußere Medulla) konnten insgesamt höhere Kollageneinlagerungen quantitativ vermessen werden (**Abbildung 52**). Da jedoch die Kontrollgruppe im Vergleich zum Cortex einen um 55 % höheren Kollagengehalt aufweist, relativieren sich die ermittelten Werte im Vergleich zu den Ergebnissen des Nierencortexes. So zeigt Gruppe 1 eine ähnlich starke Schädigung in der äußeren Medulla wie im Cortex. Dabei wurden massiv höhere Anteile fibrotischen Gewebes im Vergleich zu allen Behandlungsgruppen ermittelt. Alle weiteren Gruppen zeigen gleiche Gehälter an Kollagengewebe im Bereich der äußeren Medulla wie die Kontrollgruppe, sodass keine signifikanten Unterschiede bei einem α -Fehler von 0,05 bestimmt werden konnten.

Die innere Medulla zeigt in der Kontrollgruppe einen ähnlichen hohen Anteil kollagenhaltiger Strukturen wie in der äußeren Medulla. Die Gabe von Cisplatin (Gruppe 1) löst auch im inneren Bereich der Medulla starke Alterationen aus, die durch ausgeprägte Kollagenablagerungen ersichtlich werden. (**Abbildung 53**). Erneut konnten in Gruppe 1 signifikant höhere Anteile an Narbengewebe im Vergleich zu allen anderen Gruppen ermittelt werden. Gruppe 2 (Cisplatin + Liponsäure) und Gruppe 4 (Cisplatin + LA-Konjugat) zeigen signifikant höhere Schädigungen im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei deutlich geringere Anteile im Vergleich zu Gruppe 1 vorliegen.

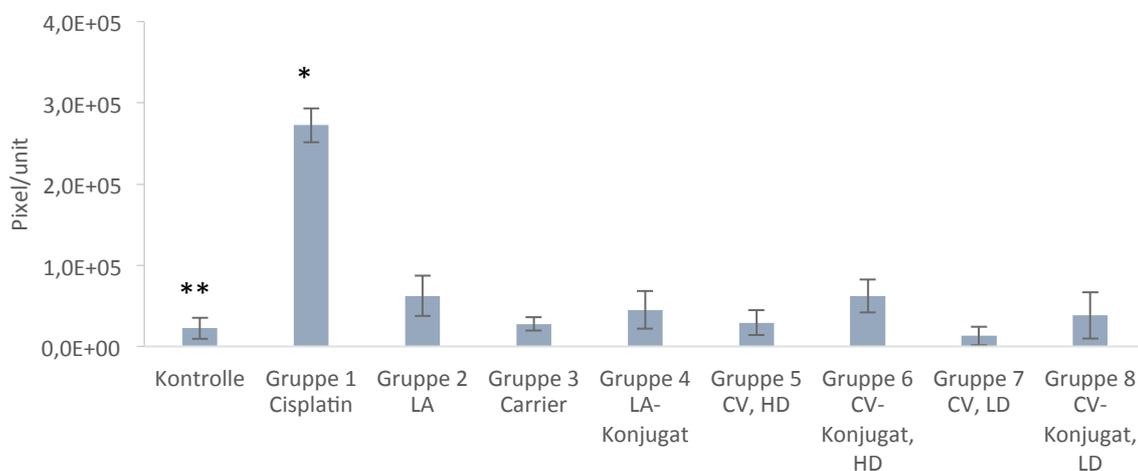


Abbildung 52: Quantitative Auswertung des fibrotischen Anteils im intermediären Bereich zwischen Cortex und Medulla in den jeweiligen Gruppen. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SD aus 10 gefertigten Mikroskop-Aufnahmen des Nierencortex jeweils einer Niere pro Gruppe. * ($p < 0,05$ Grp.1 vs. alle) ** ($p < 0,05$: Kontrolle vs. Grp. 1).

3. Ergebnisse

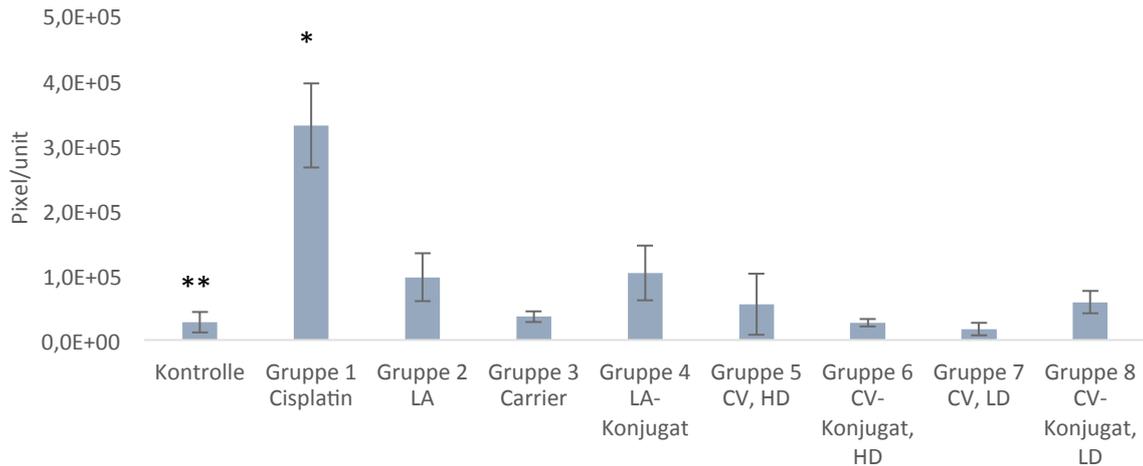


Abbildung 53: Quantitative Auswertung des fibrotischen Anteils der Medulla in den jeweiligen Gruppen. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SD aus 10 gefertigten Mikroskop-Aufnahmen der Medulla jeweils einer Niere pro Gruppe. * ($p < 0,05$ Grp.1 vs. alle) ** ($p < 0,05$: Kontrolle vs. Grp. 1, 2 und 4).

Um die langfristigen tubulotoxischen Effekte Cisplatins histologisch zu untersuchen, wurden jeweils Organschnitte, 30 Tage nach einer einmaligen Cisplatingabe durchgeführt und analysiert. Nach einer Färbung der Schnitte (detaillierte Informationen in Kapitel 6.1.12) konnte teilweise eine Erhöhung der Schädigung der tubulären Strukturen im Vergleich zu den ermittelten Daten, 7 Tage nach Cisplatingabe, beobachtet werden (**Abbildung 55**). Insbesondere Gruppe 4 (Cisplatin + LA-Konjugat) zeigt eine massive Erhöhung, um ca. 440 % des fibrotischen Gewebes im Nierencortex 30 Tage nach Cisplatingabe. Bei der Betrachtung der mikroskopischen Aufnahmen von Gruppe 4 im Vergleich fallen neben den enormen Kollageneinlagerungen erhöhte Dilatationen der Tubuli sowie verstärkte Desquamationen des tubulären Epithels auf (**Abbildung 54**). Zusätzlich sind 30 Tage nach Cisplatinapplikation atrophische Glomeruli zu beobachten, dessen spezifische Strukturen Alterationen aufweisen. Ähnliche Progressionen in Bezug auf Kollageneinlagerungen konnten im Mittelwert bei Gruppe 2 und Gruppe 3 ermittelt werden, jedoch in weitaus geringerem Maße im Vergleich zu Gruppe 4 (**Abbildung 55**). Interessanterweise konnte keine weitere Zunahme an fibrotischen Gewebe bei der Cisplatin-Gruppe (Gruppe 1) festgestellt werden.

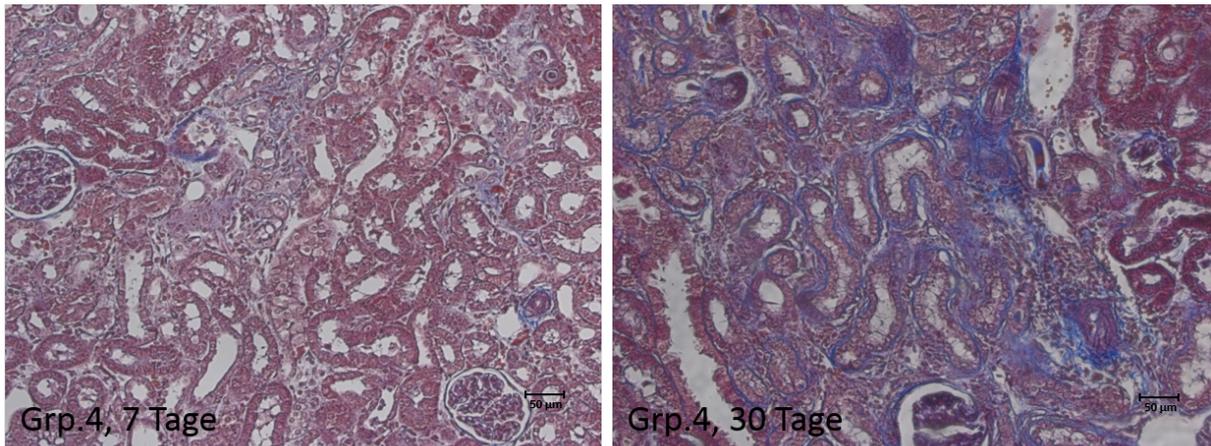


Abbildung 54: Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen des Nierencortex (400-fach) eines Tiers aus der mit LA-Konjugat behandelten Gruppe, 7 Tage und 30 Tage nach Cisplatin-Injektion.

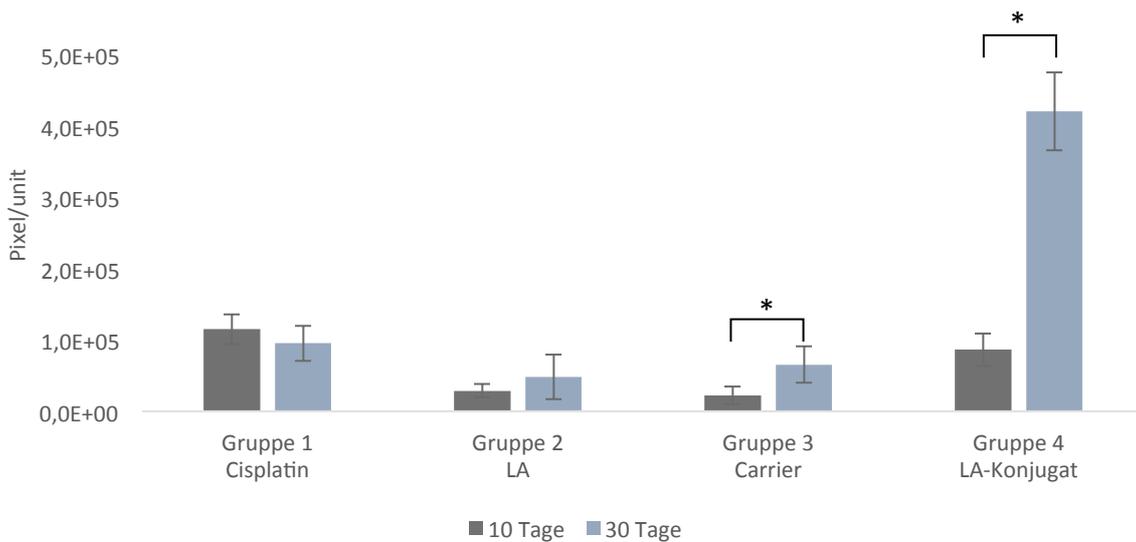


Abbildung 55: Vergleich des fibrotischen Anteils im Nierencortex in den jeweiligen Gruppen, 7 Tage und 30 Tage nach Cisplatingabe. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SD aus 10 gefertigten Mikroskop-Aufnahmen des Nierencortex jeweils einer Niere pro Gruppe. * $p < 0,05$

3.6.4 *In-vitro*-Studie über Cisplatin-Wirkstoff-Metabolisierung

Um eine Beeinträchtigung der Antitumor-Wirkung Cisplatin auszuschließen, wurde *in vitro* getestet, ob es bei der Vermischung der Substanzen unter physiologischen Bedingungen zu einer spontanen Anbindung Cisplatin an den Wirkstoff kommen kann. Dazu wurden äquimolare Mengen aller im

3. Ergebnisse

Rahmen dieser Studie verwendeten Wirkstoffe, frei und konjugiert 1:1 mit Cisplatin vermengt und bei 37 °C in HEPES-Puffer, pH = 7,2 für 30 Minuten inkubiert. Eine detaillierte Durchführungsbeschreibung ist in Kapitel 6.1.8 zu finden. Anschließend wurden die Lösungen über HPLC-MS analysiert.

Bei dem unbeladenen Carrier (KKEE)₃K-NH₂ (**1**), Silybin und dem Silybin-Konjugat (**13**) als auch Carvedilol und dessen Konjugat (**12**) konnten keinerlei Veränderung des spezifischen UV-Spektrums detektiert werden, als auch massenspektrometrisch (Daten nicht gezeigt).

Anders hingegen verhält sich die Inkubation mit der Liponsäure und dem Liponsäure-Konjugat (**9**). Bei der Inkubation mit dem LA-Konjugat konnte über die UV-Absorption ein zusätzlicher Peak (**A**) detektiert werden, der um ca. eine Minute vor dem LA-Konjugat (**B**) eluiert (**Abbildung 56**).

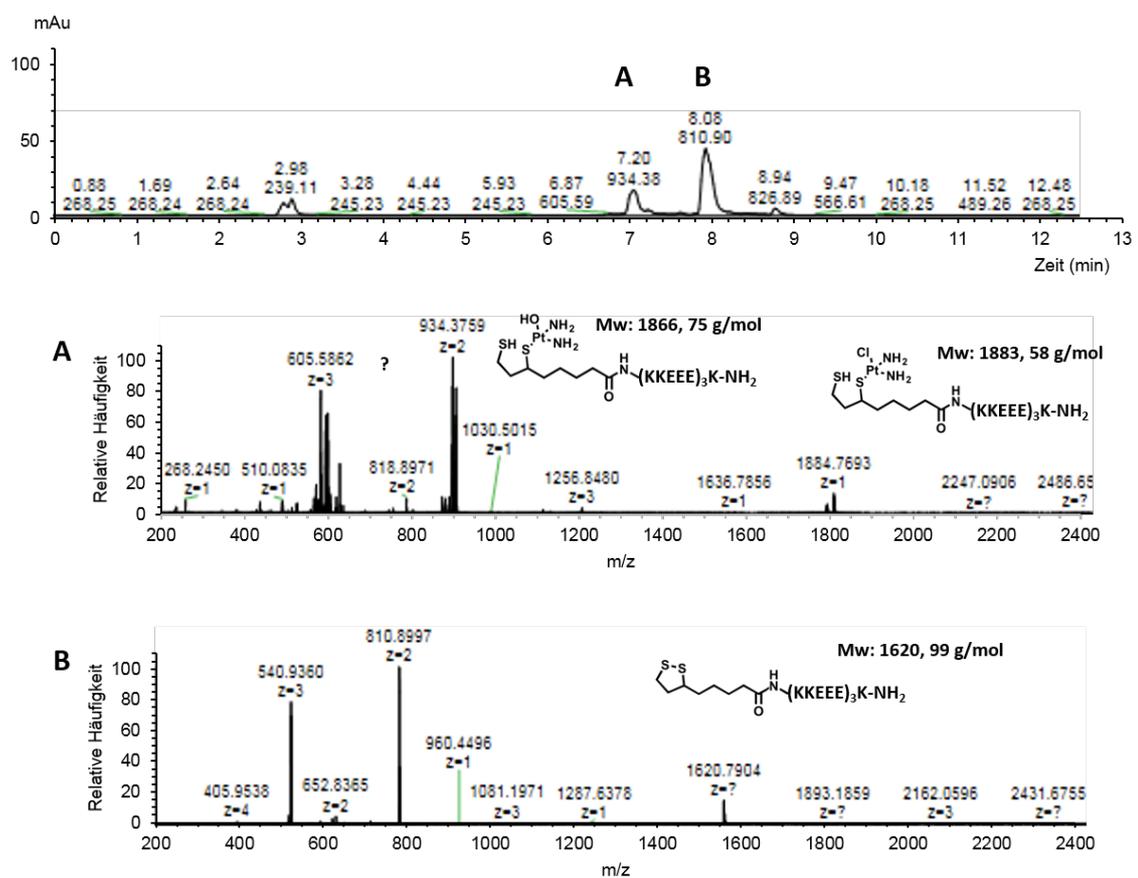


Abbildung 56: HPLC-MS-Analytik nach *In-vitro*-Inkubation von Cisplatin und Liponsäure-Carrier-Konjugat (**9**). **A:** Massenspektrum von Peak A, Rt = 7,2 min, Cisplatin-LA-Konjugat-Formationen. **B:** Massenspektrum von Peak B, Rt = 8,08 min., LA-Konjugat (**9**).

Das Massenspektrum **A** zeigt die identifizierten unterschiedlichen Cisplatin-LA-Konjugat-Formationen mit den theoretisch berechneten Massen, die mit den angezeigten Massenfragmenten übereinstimmen. Es ist bereits literaturbekannt, dass es unter der Abspaltung eines Chloridions des Cisplatin-Moleküls zu einer Platin-Thiol-Anbindung kommen kann. Studien mit thiolhaltigen Substanzen, wie GSH oder *N*-Acetylcystein konnten diese Substitution des Cisplatin-Moleküls bereits feststellen [210]. Gleichzeitig entsteht aus dem Prodrug Cisplatin im wässrigen Medium unter Austausch der Chloridionen mit Wasser ein wesentlich reaktivere Form des Zytostatika $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ oder $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$, wobei das Platinatom eine höhere Elektrophilie entwickelt. In Folge dessen entstehen bei Vorhandensein von Nucleophilen wie freien Thiolen oder Aminen bereits unter physiologischen Bedingungen Platin-Nucleophil-Verknüpfungen. Genau dieser Mechanismus liegt auch der Genotoxizität des Zytostatikums zu Grunde, der in Kapitel 1.6 näher erläutert wird. Da durch den Chloridaustausch eine höhere Reaktivität entsteht, ist die relative Häufigkeit der Fragmente $m/z = 934,37 [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, die einen Austausch des Chloridions aufweisen im Massenspektrum wesentlich höher als das Fragment $m/z = 1884,76 [\text{M}+1\text{H}]^+$, die kein ausgetauschtes Chloridion aufweisen.

Die Liponsäure wies ebenso nach Inkubation ein zusätzlichen polareren Peak im UV-Spektrum auf (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnten über die Massenspektren keine logischen Schlussfolgerungen über mögliche Formationen Cisplatins und der Liponsäure gezogen werden. Es handelt sich nicht um die gleichen Anbindungen wie bei dem bereits erläuterten LA-Konjugat (**Abbildung 56**).

4 Diskussion

4.1 Aufnahmemechanismus von $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**)

Ziel dieser Versuche war es, hinreichende Informationen über den Aufnahmemechanismus des Carriers $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) in die Nieren zu gewinnen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass sich das Peptid innerhalb einer Stunde nach intravenöser Applikation spezifisch im Nierencortex anreichert. Unter vergrößerter Ansicht konnte eine spezifische Akkumulation des Carriers auf der apikalen Membranseite und innerhalb der proximalen Tubuluszellen ausfindig gemacht werden. Alle weiteren Nephronbestandteile (Glomerulus, distaler Tubulus, Henle-Schleife) zeigten keine Anreicherungen des Peptids. Des Weiteren konnte in Megalin-defizienten Mäusen immunhistologisch eine verminderte Aufnahme des Carriers gezeigt werden [33]. Mytoyoshi *et al.* berichteten in ihren Arbeiten mit Megalin-defizienten Mäusen, dass 35 – 50 % aller proximalen Tubuluszellen den Megalin-Rezeptor weiterhin exprimieren [211]. Da kein vollständiger Gen-*Knockout* stattfindet und der Rezeptor weiterhin in den Zellen exprimiert wird [211-213], ist eine quantitative Analyse der Aufnahme oder eine Beurteilung über die Spezifität der Aufnahme des Carriers über den Megalin-Rezeptor nur bedingt möglich.

Versuche die renale Aufnahme des Peptids Octreotid, das literaturbekannt über Megalin internalisiert und in die proximale Tubuluszellen aufgenommen wird [177, 213], durch simultane Zugabe von $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) zu reduzieren, zeigten eine deutliche Abnahme der renalen Resorption [35]. Die Ergebnisse deuten auf eine kompetitive Anbindung der Peptide an den Megalin-Rezeptor hin. Aus den Daten kann geschlussfolgert werden, dass der Carrier $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) zu einem Großteil über den Rezeptor Megalin mittels Endozytose in die proximalen Tubuluszellen rückresorbiert wird. Zu welchen Anteilen genau kann jedoch aufgrund des unvollständigen Gen-*Knockouts* nicht angegeben werden. Des Weiteren bleibt noch zu klären ob ggfs. weitere Aufnahmemechanismen, wie zum Beispiel Flüssig-Phasen-Endozytose [214] oder weitere Rezeptoren, wie PEPT 1 und PEPT 2 [215, 216] für die Aufnahme des Carriers von Bedeutung sind.

Da die histologischen Untersuchungen des FITC-Konjugats eine Anreicherung auf der apikalen Seite und innerhalb der proximalen Tubuluszellen zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass das Peptid aufgrund seiner molaren Masse von ca. 2 kDa größtenteils glomerulär gefiltert wird und über die apikale Seite nach Anbindung an den Megalin-Rezeptor in die proximalen Tubuluszellen endozytisch aufgenommen wird. Dennoch kann eine Aufnahme über die basolaterale Route nicht ausgeschlossen werden.

4.2 Erhöhung der metabolischen Stabilität von (KKEEE)₃K-NH₂ (1) durch Pegylierung und Synthese eines peptoidischen Mimetikums

Um eine Erhöhung der proteolytischen Resistenz des Peptids zu erzielen und somit gleichzeitig die Transporteigenschaften des Carriers zu optimieren, wurden unterschiedliche Modifikationen durchgeführt und deren Einfluss auf die Pharmakokinetik des Carriers untersucht.

Zunächst wurde eine Pegylierung des Carriers durchgeführt, was laut Literatur einen Abbau von Proteinen und Peptiden durch körpereigene Enzyme verhindern soll [178, 179]. Durch die Pegylierung des Carriers über eine 5 kDa-PEG-Kette konnte trotz erheblicher Veränderung der molaren Masse keine signifikante Veränderung der Spezifität oder der Pharmakokinetik beobachtet werden. Die Szintigramme zeigten weiterhin eine schnelle und sehr spezifische Akkumulation des pegylierten Carriers in den Nieren, was daraufhin deutet, dass eine Rezeptoranbindung trotz Pegylierung ohne Einschränkung erfolgen kann. Gegebenenfalls findet eine Anbindung des Rezeptors über den freien *N*-Terminus des Peptids statt, was jedoch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden müsste.

Laut Literatur bewirken Pegylierungen eine längere Zirkulation von Wirkstoffen im Organismus und deutlich verlangsamte renale Ausscheidungen, sodass eine verbesserte pharmakologische Effizienz (Dosis-Wirkungs-Beziehung) erzielt werden kann [179]. Dieser Einfluss konnte mit den hier gezeigten Daten nicht bestätigt werden, da keine verlängerte Zirkulation szintigraphisch ersichtlich ist. Vermutlich beeinflusst die Konjugation der PEG-Kette die Eigenschaften des Carriers nur in geringem Maße, da hohe Affinitäten bezüglich der Polarität vorliegen.

Die deutlich verlangsamte Exkretion des pegylierten Carriers im Vergleich zum unveränderten Peptid deutet auf eine Inhibierung des proteolytischen Abbaus innerhalb der proximalen Tubuluszellen hin. Dies könnte unter Umständen gleichzeitig zu einer verlangsamten Freisetzung der transportierten Wirkstoffe im Zielgewebe führen und sich negativ auf die Effektivität des transportierten Wirkstoffs auswirken. Andererseits könnten durch hohe Verweilzeiten in den Zellen Rezeptor-*Recycling*-Mecha-

3. Ergebnisse

nismen inhibiert werden und somit die Resorption weiterer Konjugate oder anderer wichtiger Substanzen verhindern werden. Da die pharmakologischen Eigenschaften des Carriers durch die Pegylierung nicht weiter verbessert werden konnten und durch die Inhibierung der intrazellulären Metabolisierungs- und Exkretionsmechanismen zusätzlich risikobehaftete Fragestellungen entwickelten, wurden Modifikationen des Carriers in Form von Pegylierungen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

Bei Peptoiden handelt es sich um eine Klasse von Peptidmimetika, die strukturelle Eigenschaften von Peptiden nachahmen können und gleichzeitig eine erhöhte Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau zeigen und somit eine verbesserte Bioverfügbarkeit im Vergleich zu Peptiden aufweisen [180, 182]. Aufgrund dieser Vorteile gegenüber Peptiden, wurde ein peptoidisches Analogon des Carriers $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) synthetisiert und pharmakokinetisch auf dessen Eigenschaften untersucht.

Das Mimetikum $^{125}I-N\text{Tyr}(N\text{Lys}-N\text{Lys}-N\text{Glu}-N\text{Glu}-N\text{Glu})_2N\text{Lys}-NH_2$ (**23**) zeigte vergleichbare Eigenschaften wie der Carrier $^{125}I-\gamma(KKEEE)_3K-NH_2$ (**3**): Eine rasche Akkumulation in den Nieren mit hoher Spezifität nach intravenöser Applikation. Durch den gezielten Aufbau der Seitenkettengruppen besitzt das Peptoid ähnliche Ladungsverhältnisse und strukturelle Eigenschaften wie das Peptid. Beides ist für eine Rezeptorinternalisierung von großer Bedeutung sind. Daraus kann geschlossen werden, dass das Peptoid über einen vergleichbaren Aufnahmemechanismus wie $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) in proximalen Tubuluszellen rückresorbiert wurde. Weitere Untersuchungen sind allerdings noch notwendig, um fundierte Aussagen über den genauen Aufnahmemechanismus, die Rezeptorspezifität und die genaue Lokalität der Anreicherung treffen zu können.

Trotz aller Analogie zeigt das Peptoid im Vergleich zum Carrier unterschiedliche Exkretionskinetiken. Bereits 30 Minuten nach der Injektion konnten szintigraphisch größere Mengen an Radioaktivität in der Blase detektiert werden. Gleichzeitig zeigt sich die erwartete hohe Stabilität des Peptoids gegenüber proteolytischem Abbau, da nach 96 Stunden immer noch Aktivität in den Nieren nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass aufgrund der proteolytischen Resistenz des Peptoids kein Abbau in den Zellen erfolgen konnte, was ggfs. eine Inhibierung von Rezeptor-*Recycling*-Prozessen zur Folge hatte. Daraufhin kam es möglicherweise zu einer Rezeptorabsättigung, sodass restliche/überschüssige Mengen des Peptoids nicht weiter rückresorbiert werden konnten und über den Primärhahn in die Blase transportiert wurden. Dieser beobachtete Effekt könnte sich negativ auf die Dosis-Wirkungs-Bilanz auswirken, da nur vergleichsweise geringe Mengen rückresorbiert werden können.

Des Weiteren konnte ein nierenspezifischer Transport des markierten Wirkstoffs α -Liponsäure über den peptoidischen Carrier $N\text{Tyr}(N\text{Lys}-N\text{Lys}-N\text{Glu}-N\text{Glu}-N\text{Glu})_2N\text{Lys}-NH_2$ (**23**) bestätigt werden. Der

Wirkstoff zeigte nach Konjugation an das Peptoid völlig veränderte Eigenschaften. Die Eigenschaften des Peptoids überwiegen die des konjugierten Wirkstoffs, sodass generell ein Einsatz des Peptoids als Wirkstoff-Carrier möglich scheint.

Allerdings konnte keine Freisetzung des Wirkstoffs beobachtet werden, was vermutlich durch die stabile Wirkstoff-Carrier-Verknüpfung bedingt war. Für nachfolgende Versuche sollten labile Wirkstoff-Peptoid-Verknüpfungen gewählt werden, die unabhängig von proteolytischen Enzymen eine Freisetzung des Wirkstoffs ermöglichen.

Trotz erhöhter Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau, ähnlich hoher Nierenspezifität und einem erfolgreichen Wirkstofftransport, wurde die Verwendung des peptoidischen Carriers (**23**) im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. Hauptgrund hierfür waren die durch die proteolytische Resistenz gegebenen toxikologischen Risiken. Des Weiteren erwies sich die Synthese der Peptoide als problematisch in Bezug auf Ausbeuten, Aufreinigung und Wirtschaftlichkeit.

4.3 Einfluss unterschiedlicher parenteraler Applikationsrouten auf Pharmakokinetik von $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**)

Peptide besitzen aufgrund ihrer Größe und Eigenschaften eine schlechte orale Bioverfügbarkeit [217, 218], sodass aktuell lediglich parenterale Applikation für die Gabe peptidischer Arzneimittel in Frage kommen. Ziel dieser Untersuchungen war es den Einfluss unterschiedlicher parenteraler Applikationsrouten auf die Pharmakokinetik des Carriers zu ermitteln. Bei mehrfacher Verabreichung werden für Tierversuche subkutane Injektionen beispielsweise gegenüber i.v.-Gaben bevorzugt. Zum einen ist eine einfachere Handhabung gewährleistet und es ist zum anderen mit einem geringeren Schmerz- und Stressempfinden beim Versuchstier verbunden [219].

Die Ergebnisse zeigten, dass intravenöse Applikationen in Bezug auf nierenspezifische Anreicherung im Vergleich zu subkutanen und intraperitonealen Injektionen die effektivste Form der Darreichung sind. Bei subkutaner und intraperitonealer Verabreichung konnte eine um ca. eine Stunde verzögerte Anreicherung von $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) in den Nieren ermittelt werden. Intraperitoneale Gaben zeigen im Vergleich zu subkutanen eine breitere Verteilung der injizierten Lösung im Bauchraum. Bei der simultanen Gabe zweier unterschiedlicher Injektionen über die intraperitoneale Route sollte darauf geachtet werden, dass eine Vermischung der Lösungen im intraperitonealen Raum möglich ist und es ggfs. zu Beeinträchtigungen der Wirkung kommen kann.

3. Ergebnisse

Da eine Plasmastabilität des Carriers von über 24 Stunden in humanem Plasma nachgewiesen werden konnte [33], liegen keine weiteren Bedenken bezüglich Instabilität aufgrund von einer längeren Verweildauer im Plasma oder Intraperitonealraum vor. Somit können für zukünftige Versuche beide Applikationsrouten in Betracht gezogen werden.

4.4 Plasmastabilität der untersuchten Wirkstoff-Konjugate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Wirkstoffe an den nierenspezifischen Carrier $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) konjugiert, um einen gezielten Transport der Wirkstoffe in die proximalen Tubuluszellen der Nieren zu erzielen. Für die Effektivität eines *Drug Targetings* ist die Freisetzung des Wirkstoffs nach Erreichen des Zielgewebes von großer Bedeutung, was eine Labilität der Wirkstoff-Linker-Verknüpfung erfordert. Gleichzeitig benötigt das Konjugat eine gewisse Stabilität um einen erfolgreichen Transport zu gewährleisten. Dies ist jeweils abhängig von seiner Pharmakokinetik und der angewandten Applikationsroute. Das Linker-Design spielt somit für die Effektivität eines Konjugats eine große Rolle [19, 23, 25, 42]. Untersuchungen in Rattenplasma wurden durchgeführt, um Informationen über die Stabilität der gewählten Verknüpfungen zu erhalten. Unterschiedliche Verknüpfungen wurden für die Wirkstoffkonjugationen angewandt. **Tabelle 10** zeigt eine Übersicht der verwendeten Verknüpfungen, aufgeteilt in Wirkstoff-Linker-Verknüpfung und Linker-Carrier-Verknüpfung und die ermittelte Plasmastabilität der jeweiligen Konjugate.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Verknüpfungsstrategien der Wirkstoff-Carrier-Konjugate und deren Stabilität im Rattenplasma.

Wirkstoff	Wirkstoff-Linker-Verknüpfung	Linker-Carrier-Verknüpfung	Plasmastabilität in Rattenplasma ($t_{1/2}$)
Liponsäure	Amid	Amid	n/a
Carvedilol	Carbamat	Thioester	1,4 h
Silybin	Ester	Amid	2,5 h
Apocynin	Carbonat	Triazol	n/a

Die α -Liponsäure wurde direkt über eine feste Amidbindung mit dem Carrier verknüpft. Da literaturbekannt ist, dass α -Liponsäure intrazellulär amidisch proteingebunden vorliegt, kann eine Beeinflussung der pharmakologischen Effektivität des Wirkstoffs durch die gewählte Form der Verknüpfung ausgeschlossen werden [185]. Des Weiteren sind die beiden Schwefelatome der Liponsäure für deren Wirksamkeit zum Großteil verantwortlich [126, 127]. Bei den Plasmastabilitätsuntersuchungen des Konjugats traten unerwartete Matrixeffekte auf, sodass eine Quantifizierung der Substanz nach Proteinfällung nicht möglich war. Vermutlich kam es zu Wechselwirkungen des Konjugats mit Plasmaproteinen, die vor der Analyse ausgefällt werden. Um diese These bestätigen zu können, sollten Analysen der Plasmaproteine durchgeführt werden. Interessanterweise zeigte der freie Wirkstoff

3. Ergebnisse

keine analogen Matrixeffekte, woraus geschlossen werden kann, dass die Reaktivität der Thiole der Liponsäure durch die Konjugation an den Carrier beeinflusst wird und ggfs. verstärkt wird. Lutolf *et al.* berichteten, dass der pKa eines Thiols und damit dessen Reaktivität durch benachbarte Ladungen beeinflusst werden kann [84].

Trotz der fehlenden Ergebnisse der Plasmastabilitätsuntersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass die gewählte Amid-Verknüpfung eine ausreichende Stabilität für den Transport der α -Liponsäure in die proximalen Tubuli aufweist. Eine Reihe von Studien zeigte eine hohe Stabilität der Amidbindung im Plasma und bei unterschiedlichen pH-Bedingungen [42, 220, 221]. Radiomarkierungen des Wirkstoffs zeigten zudem einen spezifischen Transport der Liponsäure in die Nieren nach Konjugation an den Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**). Selbst nach einer intraperitonealen Verabreichung des Konjugats konnte eine spezifische Anreicherung des Wirkstoffs in den Nieren detektiert werden, was die Verwendung der intraperitonealen Injektionsmethode des Liponsäure-Konjugats für alle Folgestudien ermöglichte.

Das Carvedilol-Konjugat beinhaltet zwei Verknüpfungen unterschiedlicher Stabilität. Während Thioether-Verknüpfungen eine hohe Stabilität aufweisen, zeigen Carbamate eine erhöhte Labilität gegenüber hydrolytischem Abbau [57, 194, 220]. Im Plasma konnte im Mittelwert eine Halbwertszeit des Carvedilol-Konjugats von 1,4 Stunden ermittelt werden. Während die Plasmakonzentration des Konjugats immer weiter abnahm, konnte jedoch keine Zunahme des freien Wirkstoffs detektiert werden. In einer Studie über die Pharmakokinetik und -dynamik des Carvedilols wurde gezeigt, dass 98 % des Wirkstoffs im Plasma überwiegend an Albumin proteingebunden vorliegen [195]. Vermutlich konnte deswegen kein freier Wirkstoff ermittelt werden, da das freigesetzte Carvedilol sofort an Plasma-proteine anbindet und diese vor der Analyse des Aliquots ausgefällt werden. Zur Bestätigung dieser Annahme sind jedoch weitere Analysen der Plasmaproteine notwendig.

Bei einer Plasmahalbwertszeit von 1,1 Stunden im Rattenplasma kann unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik des Konjugats (**Abbildung 31**) von einer ausreichenden Stabilität für einen nieren-spezifischen Wirkstofftransport ausgegangen werden.

Laut Literatur zeigen Ester-Verknüpfungen im Vergleich zu Carbamat- und Carbonat-Verbindungen geringere hydrolytische Stabilitäten [60, 222-224]. Jedoch wurde beim Silybin-Konjugat (**13**), das über eine Ester-Verknüpfung an den Carrier konjugiert wurde, eine Halbwertszeit von 2,5 Stunden im Rattenplasma ermittelt. Die ist ein mehr als doppelt so hoher Wert im Vergleich zur Carbamat-Verknüpfung des Carvedilol-Konjugats (**12**). Das Linker-Design des synthetisierten Silybin-Konjugats (Ester- und Amidbindung) weist damit für die geplanten Vorhaben eine ausreichende Stabilität auf. Auch intraperitoneale oder intravenöse Applikationen könnten für die Gabe des Konjugats verwen-

det werden. Gleichzeitig zeigt das Diagramm (**Abbildung 32**) bei abnehmender Konjugat-Konzentration eine Freisetzung des Wirkstoffs Silybin, was auf eine Labilität der Ester-Verknüpfung deutet. Eine Abspaltung des Wirkstoffs in seine aktive Form kann somit über die verwendete Wirkstoff-Linker-Verknüpfung gewährleistet werden.

Der Wirkstoff Apocynin wurde mittels Carbonat-Verknüpfung an den Carrier $(KKEEE)_3K-NH_2$ (**1**) konjugiert. Die Wirkstoff-Linker-Vorstufe wurde anschließend über eine stabile Triazol-Verknüpfung mittels kupferkatalysierter Klick-Reaktion (CuAAC) spezifisch an den Carrier gebunden. Laut Literatur weisen Carbonate unter physiologischen Bedingungen höhere Stabilitäten als Ester-Verknüpfungen auf [60, 222]. Die Ergebnisse der Plasmastabilität des Apocynin-Konjugats (**14**) zeigten jedoch eine hohe Labilität der Carbonat-Verknüpfung (**Abbildung 34**). Da nach einer Stunde (erster Messpunkt) nur noch sehr geringe Mengen des Konjugats detektiert werden konnten, war eine Berechnung der Halbwertszeit des Moleküls nicht möglich. Bereits nach der Lösung des Konjugats in Phosphatpuffer pH 7,4 konnte der freie Wirkstoff in der Lösung identifiziert werden. Da das Konjugat parenteral appliziert werden muss und somit eine Lösung des Konjugats erforderlich ist, kann aufgrund der Instabilitäten keine definierte Injektionslösung garantiert werden. Dadurch können keine eindeutigen Wirkungsbeziehungen ermittelt werden, sodass das Konjugat mit dem entwickelten Linker-Design (**14**) für die weiteren Versuche nicht weiter berücksichtigt wurde.

Generell ist festzuhalten, dass eine Wirkstofffreisetzung unter physiologischen Bedingungen über eine chemische oder enzymatische Spaltung erfolgen kann. Die Stabilität der jeweiligen Verknüpfungen ist nicht nur abhängig vom gewählten Bindungstyp (Ester, Carbamat, Carbonat, Hydrazin, etc.), sondern auch von den Eigenschaften der jeweiligen Bindungspartner. So zeigten Paclitaxel-Prodrugs mit Carbamat-Verknüpfung aufgrund von unterschiedlicher Substituenten signifikante Differenzen in den Plasmahalbwertszeiten [225]. Eine Erhöhung der Stabilität kann beispielsweise durch eine stärkere sterische Hinderung der Verbindung durch die Einführung bestimmter Gruppen, wie zum Beispiel Phenolen, erzielt werden [226]. Die verwendeten *Spacer* spielen deshalb bei der Entwicklung eines Wirkstoff-Carrier-Konjugats, gerade in Bezug auf den elementaren Aspekt der Freisetzung des Wirkstoffs, ebenso eine bedeutende Rolle. Grundsätzlich ist es deswegen schwierig Verbindungen nach ihrer Stabilität zu ordnen, was dennoch in der Literatur verbreitet vorliegt [42, 226]. Auch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Stabilitäten der Verknüpfungen widersprachen der erwarteten Stabilitätsrangfolge der Verbindungen aus der Literatur (Ester<Carbonat<Carbamat<Thioether). In diesem Kontext empfiehlt sich eine individuelle Untersuchung der einzelnen Konjugate oder Prodrugs.

3. Ergebnisse

Abschließend ist zu erwähnen, dass die angewandte Methode der Plasmastabilitätsuntersuchung einige Limitierungen aufweist und so nur ein Indiz für die erwarteten Stabilitäten der Konjugate liefert. So konnte zum Beispiel aufgrund von Matrix-Wechselwirkungen bei dem Liponsäure- und Carvedilol-Konjugat keine Freisetzung des Wirkstoffs ermittelt werden. Da der Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**) jedoch innerhalb weniger Minuten nach i.v.-Applikation in den Nieren akkumuliert, können die Stabilitäten des Liponsäure-, Carvedilol- und Silybin-Konjugats für den nierenspezifischen Transport als ausreichend erachtet werden.

Bei einer intraperitonealen Gabe gilt es zu beachten, dass die injizierten Konjugate zunächst im Intra-peritonealraum vorliegen, wo es durch unterschiedliche hydrolytische Enzyme der peritonealen Flüssigkeit bereits zur Abspaltung des Wirkstoffs kommen kann [227, 228]. Die Aktivität der Enzyme der peritonealen Flüssigkeit ist im Vergleich zum Blutplasma aufgrund der geringeren Konzentration hydrolytischer Enzyme sehr viel niedriger. Die ermittelten Stabilitäten des Liponsäure-, Carvedilol- und Silybin-Konjugats sind somit auch für die intraperitoneale Gabe als ausreichend einzustufen. Pharmakokinetik der untersuchten Wirkstoff-Konjugate

Um einen nierenspezifischen Transport der Wirkstoffe nach Konjugation an den Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**) bestätigen zu können, wurden *in vivo* szintigraphische Studien durchgeführt. Dafür wurden jeweils die Wirkstoffe der Konjugate über unterschiedliche Strategien mittels ¹²⁵Iod oder ^{99m}Technetium radiomarkiert, um eine Verfolgung des Wirkstoffs zu ermöglichen. Zum Vergleich der pharmakokinetischen Eigenschaften wurden auch jeweils die „nackten“ Wirkstoffe radiomarkiert und szintigraphisch untersucht.

Die über ^{99m}Technetium markierte α -Liponsäure zeigte nach intravenöser Applikation eine rasche und spezifische Akkumulation in der Leber, was im Einklang mit pharmakokinetischen Untersuchungen der Literatur ist [187]. Das Liponsäure-Konjugat zeigte hingegen *in vivo* nach intravenöser Injektion eine schnelle Anreicherung in den Nieren sowie veränderte Exkretionskinetiken. Eine Aussage über einen erfolgreichen Transport des Wirkstoffs kann jedoch nur bedingt getroffen werden, da nicht der Wirkstoff selbst markiert wurde, sondern lediglich eine Iodmarkierung eines zusätzlich eingebauten Tyrosins am Carrier durchgeführt wurde. Da der Wirkstoff über eine stabile Amidbindung an den Carrier konjugiert wurde, ist jedoch davon auszugehen, dass keine Abspaltung während der Distribution stattfindet und es sich bei der detektierten Aktivität im Szintigramm um das unveränderte Liponsäure-Konjugat handelt.

Für alle weiteren Untersuchungen wurden direkte Markierungen des Wirkstoffs über ^{99m}Tc durchgeführt. Da es sich bei der Thiol-Technetium-Verbindung um eine stabile 1,3-Dimercapto-Komplexierung handelt [229], kann hier eine fundierte Aussage über einen erfolgreichen nierenspezi-

fischen Wirkstofftransport getroffen werden. Die Szintigramme des doppelt-beladenen Carriers $\text{KKK}\epsilon(\text{LA-}^{99\text{m}}\text{Tc})\text{EEEEEEKKK}\epsilon(\text{LA-}^{99\text{m}}\text{Tc})\text{EEEE-NH}_2$ (**10**) bestätigte über eine direkte Markierung der konjugierten Liponsäure einen nierenspezifischen Transport des Wirkstoffs nach intravenöser Applikation. Zusätzlich zeigten die Aufnahmen eine veränderte Exkretion des Wirkstoffs über die Blase, statt über die Gallenwege. Nur geringfügige Veränderungen der pharmakokinetischen Eigenschaften des Carriers trotz multipler Wirkstoffbeladung im Vergleich zum „nackten“ Carrier konnten ermittelt werden. Die multiple Beladung des Carriers erlaubt eine weitere Steigerung der Dosis-Wirkungs-Beziehung und verdeutlicht die außergewöhnlichen Eigenschaften des Peptids als nierenspezifischen Carrier.

Die Distribution des Liponsäure-Konjugats nach intraperitonealer Applikation zeigte zunächst eine längere Verweilzeit des Konjugats im Intraperitonealraum des Tieres, nach 30 Minuten konnte jedoch eine Anreicherung in den Nieren detektiert werden, während die Aktivität im Bauchraum abnahm. Trotz der längeren Verweildauer im Intraperitonealraum konnten die Aufnahmen einen nierenspezifischen Transport der Liponsäure nach Konjugation an den Carrier bestätigen. Die Bedenken einer möglichen Freisetzung des Wirkstoffs im intraperitonealen Raum über Proteasen der Peritonealflüssigkeit konnten bei der verwendeten Verknüpfungsstrategie verworfen werden.

Die Konjugation des Antioxidans Carvedilol an den Carrier bewirkte eine veränderte Kinetik des Wirkstoffs. Durch den Carrier konnte ein spezifischer Transport in die Nieren *in vivo* detektiert werden. Die ermittelte Plasmastabilität des Carvedilol-Konjugats (**12**) von 1,8 Stunden im Mausplasma unterstützt die Ergebnisse der szintigraphischen Untersuchung. Die Markierung des Carvedilols erfolgt über ein Iodnuklid, was ein potentiell Substrat für Deiodinasen darstellt. Vermutlich kommt es durch die Abspaltung des Iods zu einer breiteren unspezifischeren Verteilung an Aktivität im Abdomen im Vergleich zum unbeladenen Carrier. Die quantitativ höchsten Mengen an Aktivität sind jedoch spezifisch in den Nieren des Tiers zu sehen.

Des Weiteren zeigen die Szintigramme nur geringe Mengen an Aktivität in der Blase, was daraufhin deutet, dass die Exkretion des Wirkstoffs nicht verändert wurde. Zwei Stunden nach der Injektion konnte zusätzlich eine breitere Verteilung der Aktivität im linken Abdomen beobachtet werden. Da sich in der Höhe der Nieren mehrere Organe überlagern (Leber, Magen, Dünndarm, Galle) kann hier keine zuverlässige Aussage über die Anreicherung des Carvedilols getroffen werden. Jedoch bei Betrachtung der pharmakokinetischen Eigenschaften des freien Wirkstoffs kann vermutet werden, dass nach der Abspaltung des Wirkstoffs in den Nieren eine erneute Aufnahme des Wirkstoffs in die Blutlaufbahn über die basolaterale Seite des proximalen Tubulus erfolgt. Anschließend bestimmen die Eigenschaften des freien Wirkstoffs die Pharmakokinetik und Spezifität. Demnach erfolgen anschlie-

3. Ergebnisse

ßend eine Akkumulation des Wirkstoffs in der Leber und eine Exkretion über die Galle in den Darm. Es könnte sich jedoch auch um das abgespaltene Iod handeln, das sich im Magen und Schilddrüse des Tiers ansammelt. Um fundierte Aussagen treffen zu können, werden jedoch weitere pharmakokinetische Untersuchungen benötigt, im besten Falle mit einer stabilen ^{13}C oder ^{14}C -Markierung.

Der Wirkstoff Silybin zeigt nach intravenöser Applikation eine spezifische hepatische Anreicherung. Die Markierung von Silybin wurde ebenso über eine nukleophile ^{125}I iodsubstitution durchgeführt. Da mehrere Anbindungsstellen für die Iodanbindung in Frage kommen, besteht die Möglichkeit einer mehrfachen Iodierung pro Molekül. Eine Studie von Skottova *et al.* zeigte die pharmakokinetischen Profile eines über ^{14}C -markierten Silybins im Vergleich zu dem iodierten Wirkstoff. Es konnte kein Einfluss der Iodmarkierung auf die pharmakologischen Eigenschaften des Wirkstoffs im Vergleich zu dem über einen ^{14}C -Austausch markierten Wirkstoff ermittelt werden [204]. Dennoch gilt zu beachten, dass auch hier eine enzymatische Deiodierung möglich ist.

Die Verteilungsstudien des Silybin-Konjugats (**13**) demonstrierten wiederum veränderte Kinetik und Spezifität des Wirkstoffs nach Konjugation an den Carrier. Neben einem nierenspezifischen Transport des Wirkstoffs konnten gleichzeitig größere Mengen Aktivität im oberen Abdomen detektiert werden. Eine genaue Zuordnung ist dabei nur schwer möglich. Im Vergleich zu den anderen Konjugaten ist eine breitere Verteilung des Silybin-Konjugats (**13**) ersichtlich. Da die Plasmastabilitätsuntersuchungen des Silybin-Konjugats eine hohe Stabilität von 4,1 Stunden in Mäuseplasma ergaben, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der breiteren Verteilung der Aktivität um abgespaltenes Iod handelt. Serumstabilitäten des markierten Konjugats könnten Aufschluss über die Stabilitäten der Iodmarkierung liefern.

Im Vergleich zu Carvedilol konnte hier nach Aufnahme in die Nieren eine veränderte Exkretion von Silybin detektiert werden. Eventuell könnte eine Metabolisierung Silybins zu veränderten Eigenschaften des Wirkstoffs führen. Da nach 30 Minuten erhöhte Mengen in der Blase analysiert wurden, ist eine Sekretion des Wirkstoffs oder dessen Metaboliten über die apikale Seite der proximalen Tubuluszellen in den Urin denkbar. Welche Metabolisierungs- und Eliminierungsmechanismen detailliert Ursache dieser Beobachtungen sind, gilt es noch zu klären. Dennoch kann zusammengefasst werden, dass auch bei Silybin ein erfolgreiches Wirkstoff-Targeting über den nierenspezifischen Carrier $(\text{KKEEE})_3\text{K-NH}_2$ (**1**) szintigraphisch bestätigt werden konnte.

Für das Apocynin-Konjugat wurden aufgrund der unzureichenden Stabilität keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Die Ergebnisse der Verteilungsstudien bestätigten für alle untersuchten Wirkstoffe einen nierenspezifischen Transport durch die Konjugation an den Carrier $(\text{KKEEE})_3\text{K-NH}_2$ (**1**). Es konnten jeweils

unterschiedlich starke Einflüsse der Wirkstoffe auf die Pharmakokinetik des Carriers beobachtet werden. Zusammen mit den Ergebnissen der Stabilitätsuntersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass sich – mit Ausnahme des Apocynin-Konjugates (**14**), alle untersuchten Konjugate für ein *Drug Targeting* in die Nieren eignen. Aufgrund der ausreichenden Stabilität, können alle drei untersuchten parenteralen Applikationsrouten angewandt werden.

4.5 Proof of concept „NephroGuard“

Ziel der folgenden Studien war die cisplatininduzierte Nephrotoxizität durch die Gabe protektiver Substanzen zu senken. Dazu wurden bereits im Vorfeld unterschiedliche Wirkstoffe ausgewählt, die in publizierten präklinischen Studien eine protektive Wirkung auf die Nierenfunktion erzielen konnten. Diese Wirkstoffe wurden über unterschiedliche Strategien an den nierenspezifischen Carrier $(\text{KKEEE})_3\text{K-NH}_2$ (**1**) konjugiert. Die in den folgenden Versuchen verwendeten Konjugate wiesen alle eine ausreichende Stabilität auf und konnten durch den Carrier alle spezifisch in die Nieren transportiert werden. Durch das *Targeting* soll eine verbesserte Dosis-Wirkungs-Beziehung im Vergleich zu den „nackten“ Wirkstoffen in den folgenden Studien gezeigt werden. Hintergrund des Wirkstoff-*Targetings* ist es eine Beeinträchtigung der anti-neoplastischen Wirkung Cisplatins durch die simultane Gabe der protektiven Substanzen auszuschließen.

Dazu wurden zwei Vorversuche durchgeführt. Die jeweiligen Studiendesigns sind im Kapitel 3.6 zu finden und dort detailliert erläutert.

4.5.1 Cisplatin-Dosisfindung

Die verwendeten Cisplatin-Dosen wurden an bereits veröffentlichte Studien, die eine nephrotoxische Wirkung Cisplatins in Ratten erzielten [132, 149, 161, 164-166, 206], angelehnt. Zwei Tage nach der Gabe zeigten alle Gruppen bereits einen Anstieg der Nierenfunktionsparameter, wobei nach drei Tagen je nach Parameter bei Gruppe 1 und 3 ein Plateau erreicht wurde und anschließend wieder eine Verbesserung beider Parameter ermittelt werden konnte. Der Großteil der bereits veröffentlichten Studien endeten drei Tage nach Cisplatingabe durch eine Euthanasierung der Versuchstiere und Analyse der protektiven Wirkung der jeweiligen getesteten Substanz. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten zeigten an Tag 4 (vier Tage nach Cisplatingabe) die größten Unterschiede unter den Gruppen. Es konnte ein signifikanter Einfluss der injizierten Vehikel auf die Ausprägung der schädigenden Wirkung Cisplatins auf die Nierenfunktion ermittelt werden. So zeigte zum Beispiel Gruppe 2 (7 mg/kg Cisplatin + 0,9 % NaCl) nur einen sehr geringen Anstieg beider Nierenfunktionsparameter im Vergleich zu Gruppe 1 mit einer geringeren Dosis von 5 mg/kg Cisplatin. Gruppe 1 erhielt während der ganzen Studie keine zusätzlichen Vehikel-Injektionen. Gruppe 3 (7 mg/kg Cisplatin + Glucose)

hingegen mit gleicher Dosis wie Gruppe 2 zeigte in beiden ermittelten Parametern einen signifikanten Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Gabe von NaCl-Lösungen eine protektive Wirkung auf die Nierenfunktion hat. Fulco *et al.* berichtete über eine Hemmung der Metabolisierung Cisplatin zu der reaktiveren hydrierten Form durch die erhöhte Verfügbarkeit an Chloridionen bedingt durch die Gabe von NaCl. Demzufolge findet eine Reduktion der Proteinanbindung Cisplatin statt, was wiederum Einfluss auf die zytotoxische Wirkung Cisplatin hat [230]. Allein die Lösung der zu testenden Wirkstoffe in 0,9 %iger NaCl-Lösung würde eine protektive Wirkung der Nierenfunktionsparameter erzielen. Dadurch wäre die Evaluierung der protektiven Wirkung der zu testenden Wirkstoffe nur bedingt möglich. Dennoch wurde in mehreren Studien, isotonische Kochsalzlösung zur Lösung der jeweiligen Wirkstoffe verwendet [132, 135, 144, 145, 150, 175]. In wie weit hier die protektive Wirkung von den jeweiligen Wirkstoffen ausging, ist deswegen fraglich.

Trotz der Tatsache, dass durch die Lösung Cisplatin in 0,9 %iger NaCl-Lösung eine Beeinträchtigung der anti-neoplastischen Wirkung entstehen könnte [231], wird die Hydratation der Patienten mit großen Volumen Kochsalzlösung vor und nach Cisplatingabe aktuell klinisch als Supportivmaßnahme bei platinhaltigen Chemotherapie angewandt, um Einschränkungen der Nierenfunktionen entgegen zu wirken [101]. Interessanterweise liegen aktuell keine weiteren Studien über den Einfluss der Gabe von Kochsalzlösung auf die anti-neoplastische Wirkung Cisplatin vor.

In den im Rahmen dieser Thesis ermittelten Daten zeigte Gruppe 2 (7 mg/kg Cisplatin + 0,9 % NaCl) nur sehr geringe Veränderungen der Nierenfunktionsparameter. Da jedoch eine Studie über die nephroprotektive Wirkung unterschiedlicher Substanzen erzielt werden sollte, wurde in den folgenden Untersuchungen die Verwendung von 0,9 % NaCl-Lösung sowohl als Lösungsmittel, als auch als Vehikel ausgeschlossen.

Eine weitere bedeutende Schlussfolgerung der Ergebnisse ist, dass die nephroprotektive Wirkung nicht durch eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr erzielt wurde, sondern der Effekt abhängig von Natriumchlorid und dessen Wirkung ausgeht. Gruppe 3 erhielt als Vehikel eine 5 %ige Glucose-Lösung, zeigte trotz vergleichbarer Flüssigkeitsvolumina (2 ml/kg) signifikant höhere Werte in beiden untersuchten Parametern im Vergleich zu Gruppe 2, die als Vehikel NaCl injiziert bekam. Gruppe 1, die keine weiteren Applikationen erhielt, also keine zusätzliche Flüssigkeitszufuhr, lag bezüglich der ermittelten Nierenfunktionsparameter zwischen den beiden anderen Gruppen.

Sieben Tage nach der Gabe von Cisplatin konnte bei der Bestimmung des Blutharnstoffgehalts in Gruppe 1 und 3 ein weiterer Anstieg beobachtet werden, wohingegen Gruppe 2 bereits den Kontrollwert von ca. 30 mg/dl erreichte. Jedoch wiesen die Tiere bei Gruppe 1 und 3 hohe Varianzen in den

ermittelten Nierenfunktionsparametern auf. Während bei einigen Tiere eine Genesung detektiert werden konnte, zeigten andere Tiere wiederum einen weiteren hohen Anstieg der Parameter. Ob einige Tiere höhere Resistenzen gegenüber Cisplatin aufweisen oder die Nephrotoxizität durch bestimmtes Verhalten (Bewegung, Trinkverhalten, Rangordnung in der Gruppe) beeinflusst wird, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht beurteilt werden. Um signifikante Unterschiede der Gruppen zu erhalten, empfiehlt sich für dieses nephrotoxische Tiermodell eine erhöhte Anzahl an Tieren pro Gruppe zu verwenden, um die Varianzen innerhalb der Gruppen zu senken und aussagekräftige Daten zu generieren.

4.5.2 24-Stunden-Modell

Der Fokus dieses schnellen 24-Stunden-Modells lag in der Ermittlung der Wirksamkeit der verwendeten Wirkstoffe auf die Cisplatin-Ausscheidung sowie deren antioxidative Wirkung in der Niere und Leber. Da in den Vorversuchen zur Cisplatin-Dosisfindung (Kapitel 3.6.1) keine Veränderungen der Nierenfunktionsparameter (Kreatinin und Harnstoff) in den ersten 24 Stunden auftreten, dienten Platin- und Glutathionkonzentrationen von Niere und Leber als Parameter.

Die Platinkonzentrationen der Nieren wiesen alle erhöhte Werte von im Schnitt 19 µg/g Platin auf. Unbehandelte Tiere (Wistar-Ratten) hingegen besitzen nur eine sehr geringe Platinkonzentration von unter 0,035 µg/g [208]. Somit kann eine deutliche Akkumulation des Zytostatikums in den Nieren, 24 Stunden nach Cisplatingabe bestätigt werden. Gruppe 4, die als Therapiesubstanz das LA-Konjugat **(9)** appliziert bekam, wies als einzige Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen eine signifikant höhere Cisplatin-Konzentration von 30,3 µg/g auf. Der nackte Wirkstoff Liponsäure zeigte hingegen keine erhöhte Platinkonzentration in den Nieren, sodass die erhöhte Platinkonzentration mit der nierenspezifischen Anreicherung des LA-Konjugats in Zusammenhang stehen muss. *In-vitro*-Untersuchungen zur Metabolisierung Cisplatins zeigten, dass es unter physiologischen Bedingungen zu Konjugationen Cisplatins mit dem LA-Konjugat **(9)** unter Abspaltung eines Chloridions kommt (Kapitel 3.6.4). Vermutlich entstehen dabei spontane Anbindungen Cisplatins mit den freien Thiolen der Liponsäure des Konjugats. Die Ausbildung einer Thiol-Platin-Verbindung ist bereits aus Studien über GSH-Cisplatin-Interaktionen bekannt [110, 111]. Da beide Substanzen intraperitoneal im Abstand von 30 Minuten verabreicht werden, kann es im Intraperitonealraum, trotz kontralateraler Gabe, zu Vermischungen der Substanzen gekommen sein, die eine Cisplatin-Konjugation an das LA-Konjugat begünstigten. Daraus resultierte vermutlich ein spezifischer Transport des angebonden Cisplatins in die

Nieren durch den Carrier, was die Erhöhung der Platinkonzentration im Vergleich zu den weiteren Substanzen erklären würde.

Interessanterweise zeigte die Liponsäure selbst nicht die gleichen Formationen mit Cisplatin, wie die konjugierten Form **(9)**. Über HPLC-Analyse war eine Metabolisierung des Wirkstoffs ersichtlich, jedoch konnten keine logischen Schlussfolgerungen der Struktur der Metabolite aus den Fragmenten der HPLC-MS-Analytik getroffen werden. Gegebenenfalls entsteht durch die Ladungen der Seitenkettengruppen des Carriers eine Verstärkung der Nukleophilie des Thiols der Liponsäure bei dem Konjugat. Positiv geladene Ladungen der Seitenkettengruppen verstärken den pK_a -Wert des benachbarten Thiols [90]. Da die Kopplung der Liponsäure am *N*-Terminus des Carriers durchgeführt wurde, liegt potentiell eine positive Ladung des benachbarten Lysins vor, was somit eine Pt-Thiol-Anbindung begünstigt. Dennoch ist das Potential einer Cisplatin-Konjugation bei der Liponsäure im Vergleich zu den restlich getesteten Substanzen aufgrund der stark nukleophilen freien Thiole sehr viel höher einzuschätzen. Bei den Wirkstoffen Silybin, Carvedilol und dem Carrier selbst konnten nach der Inkubation mit Cisplatin keine Metabolisierung oder Veränderungen des HPLC-Spektrums detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Liponsäure weist nach intraperitonealer Gabe eine spezifische Anreicherung in der Leber auf (**Abbildung 27**). Aufgrund der erwähnten potentiellen Anbindung Cisplatins an den freien Wirkstoff Liponsäure, hätte es im Rahmen der Versuche zu einer erhöhten Aufnahme Cisplatin-Liponsäure-Konjugat in der Leber führen können, was über eine erhöhte Platinkonzentration in der Leber detektierbar wäre. Jedoch zeigten die Platinkonzentrationen der Leber, 24 Stunden nach Cisplatin-Injektion, keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen. Die Werte waren im Durchschnitt sehr viel geringer als die ermittelten Platinkonzentrationen der Niere. Im Vergleich zum Kontrollwert von $< 0,01 \mu\text{g/g}$ konnten dennoch auch in der Leber erhöhte Platinkonzentrationen festgestellt werden.

Des Weiteren wurden die GSH-Konzentrationen der Organhomogenisate bestimmt, um einen Eindruck über den oxidativen Stress der Zellen zu erhalten. Bei der Betrachtung der GSH-Konzentrationen der Niere weist lediglich Gruppe 8, die mit Carvedilol-Konjugat **(8)** behandelt wurde, als einzige signifikant höhere GSH-Konzentration im Vergleich zu den Gruppen 1, 3, 4, 5 und 7 auf. Die vergleichsweise höheren GSH-Konzentrationen deuten auf einen geringeren oxidativen Stress hin, den die Zellen ausgesetzt waren und bestätigen damit die antioxidative Wirkung Carvedilols. Da ein signifikanter Unterschied zu dem freien Wirkstoff ($0,98 \mu\text{mol/g} \pm 0,32$ vs. $0,28 \mu\text{mol/g} \pm 0,04$) ermittelt wurde, deutet dies auf einen *Targeting*-Effekt hin. Durch die Konjugation an den Carrier, konnte ein verbesserter Dosis-Wirkungs-Effekt erzielt werden. Alle weiteren getesteten Wirkstoffe

3. Ergebnisse

(Liponsäure und Silybin) konnten jedoch diesen *Targeting*-Effekt nicht bestätigen, wobei die über Silybin-behandelten Gruppen (Gruppe 5 und 6) eine vergleichbare Tendenz aufweisen. Dennoch ist zusammenfassend zu sagen, dass die Varianz innerhalb der Gruppe 8 (Carvedilol-Konjugat) relativ hoch ist und die Anzahl an Tieren gleichzeitig ($n = 4$) sehr klein war, was zu einer sehr geringen Aussagekraft der Ergebnisse führt.

Zusätzlich ist kein Vergleich zu einem Nullwert möglich, da das Studiendesign keine Kontrollgruppe beinhaltete. Zudem kann kein *Bridging* zu Werten aus der Literatur stattfinden, da sehr große Abweichungen der Werte bereits innerhalb einzelner Literaturquellen aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Methoden zur GSH-Bestimmung vorliegen. Somit ist keine Aussage über das Maß des ausgelösten oxidativen Stresses durch die Gabe Cisplatins möglich.

Im Vergleich zur Niere wurden im Schnitt höhere GSH-Konzentrationen in der Leber festgestellt. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede in allen Gruppen untereinander ermittelt werden. Gleichzeitig sind die Varianzen innerhalb der Gruppen durchgängig klein, sodass die Ergebnisse insgesamt aussagekräftiger sind.

Schlussfolgernd lässt sich zusammenfassen, dass die Leber in dem untersuchten Zeitfenster von 24 Stunden nach Cisplatingabe nur eine geringe Rolle in der Metabolisierung von Cisplatin spielt, da sowohl bei den Platin- als auch bei den GSH-Konzentrationen keine gravierenden Abweichungen vom Kontrollwert oder signifikante Unterschiede unter den Gruppen ermittelt werden konnten. Die Nieren hingegen wiesen stark erhöhte Platinkonzentrationen im Vergleich zu Kontrollwerten aus der Literatur auf. Insbesondere Gruppe 4, die das LA-Konjugat als Protektivum erhielt, wies im Vergleich zu allen anderen Gruppen eine erhöhte Platinkonzentration auf, sogar im Vergleich zur unbehandelten Cisplatin-Gruppe (Gruppe 1). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es zur Anbindung Cisplatins an das LA-Konjugat kam, woraufhin ein nierenspezifischer Transport in die Nieren stattgefunden haben muss. Alle weiteren Gruppen konnten im Vergleich zur unbehandelten Gruppe 1 keine Unterschiede bezüglich der Platinkonzentration und keine aussagekräftigen Erhöhungen der GSH-Konzentration in dem Zeitfenster von 24 Stunden erzielen. Um die Aussagekraft der Daten zu erhöhen, würde sich eine Wiederholung der Versuche anbieten, um die Anzahl der ermittelten Daten pro Gruppe zu erhöhen.

4.5.3 7-Tage-Modell

Da Einschränkungen der Nierenfunktion in dem verwendeten Tiermodell frühestens drei Tage nach Cisplatingabe detektierbar sind (Kapitel 3.6.1), wurde diese Studie durchgeführt, um eine protektive

Wirkung der bereits untersuchten Wirkstoffe und Wirkstoff-Konjugate auf die Nierenfunktion ermitteln zu können. Das Studiendesign richtete sich bezüglich des ausgewählten Tiermodells, den verwendeten Dosen sowie Applikationsrouten und –zeitpunkten nach Nephrotoxizitäts-Modellen aus der Literatur. Als Parameter dienten Platinkonzentration der Niere, Konzentrationen an Serum-Harnstoff und Kreatinin sowie histologische Untersuchungen der Nieren. Alle Informationen zu der Studie wurden in Kapitel 3.6.3 detailliert erläutert.

Alle Tiere zeigten sieben Tage nach Cisplatingabe eine wesentlich niedrigere Platinkonzentrationen im Vergleich zu denen 24 Stunden nach Cisplatingabe (siehe Kapitel 3.6.2.1). Es konnte im Schnitt eine Reduzierung des Platingehalts der Nieren von ca. 78 % innerhalb von sechs Tagen ermittelt werden. Dennoch sind weiterhin erhöhte Platinkonzentrationen in den Nieren nachweisbar im Vergleich zum Kontrollwert von 0,035 µg/g [208]. Je nachdem um welche Cisplatin-Metaboliten es sich bei den bestimmten Platinkonzentrationen handelt, könnten auch sieben Tage nach Injektion noch anhaltende toxische Wirkungen auf das Nierengewebe von den Cisplatin-Metaboliten ausgehen.

Wie bereits im 24-Stunden-Modell weist auch sieben Tage nach Cisplatin-Injektion, die über das LA-Konjugat (**9**) behandelte Gruppe eine signifikant höhere Platinkonzentration von $10,6 \pm 1,9$ µg/g im Vergleich zu Gruppe 2, 4, 5 und 6 auf. Im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (Gruppe 1) wurden um 77 % höhere Platinkonzentrationen in den Nieren der Tiere ($5,97 \pm 0,63$ µg/g) ermittelt. Auch hier konnte diese Beobachtung lediglich in der konjugierten Form verzeichnet werden. Der freie Wirkstoff (Gruppe 2) zeigte signifikant niedrigere Platinkonzentrationen im Vergleich zu dem LA-Konjugat (**9**). Wie bereits im vorherigen Kapitel näher erläutert, konnte durch eine *In-vitro*-Inkubation von Cisplatin und dem LA-Konjugat, eine Anbindung des Zytostatikums an das Konjugat über eine Platin-Thiol-Verbindung bestätigt werden. Vermutlich kommt es durch die zeitnahe Injektion beider Substanzen im Intra-peritonealraum zu einer Vermischung und letztendlich zu der erwähnten Anbindung und folglich zu einem nierenspezifischen Transport Cisplatins in die Nieren. Die Aufnahme des Cisplatin-Konjugats in die proximalen Tubuli erfolgt dabei wohlmöglich über den Aufnahmemechanismus des peptidischen Carriers. Zusätzlich wird ungebundenes Cisplatin über den organischen Kationentransporter (OCT2) und den Kupfertransporter 1 (Ctr1) in die Zellen aufgenommen. Beide Transporter sind auf der basolateralen Seite der proximalen Tubuli und bekannt für die renale Aufnahme von Cisplatin [107, 232, 233]. Durch dieses Zusammenspiel der drei Resorptionsfaktoren kommt es zu einer gesteigerten Cisplatin-Aufnahme von 77 % im Vergleich zur unbehandelten Gruppe 1.

Alle weiteren behandelten Gruppen wiesen tendenziell im Vergleich zur Cisplatin-Gruppe (Gruppe 1) niedrigere Konzentrationen auf. Gruppe 4 (Carrier) zeigte dabei mit einem Mittelwert von $3,8 \pm 3,12$ µg/g die geringste Platinkonzentration. Eine Studie von Kim *et al.* berichtet über eine Sen-

3. Ergebnisse

kung der OCT2-Expression und damit zusammenhängenden reduzierten Aufnahme Cisplatin durch die Gabe der Aminosäure Glutamin [234]. Des Weiteren konnte durch die Glutamingabe erhöhte GSH-Konzentrationen detektiert werden, die damit erklärt wurden, dass Glutamin zur Synthese des Tripeptids Glutathion benötigt wird. In Kombination resultieren die beiden Effekte in einer protektiven Wirkung der Nierenfunktion [234, 235]. Der Carrier, der aus Glutaminsäure und Lysin aufgebaut ist, könnte durch seine Bestandteile evtl. auch eine Wirkung auf die Eliminierungsmechanismen Cisplatin aufweisen, die Expressionen von Transportern inhibieren oder die Synthese wichtiger antioxidativer Enzymkomplexe stimulieren. Glutaminsäure wird zum Beispiel intrazellulär zu Glutamin metabolisiert [236], das wiederum ein Baustein des körpereigenen Antioxidans Glutathion ist. Aktuell ist über die renalen Eliminierungsmechanismen von Cisplatin nur sehr wenig bekannt. Schlussfolgernd ist zu erwähnen, dass in diesem Fall lediglich Tendenzen diskutiert werden, bei denen rechnerisch keine Signifikanzen ermittelt werden konnten.

Auch die Carvedilol-Gruppen (Gruppe 5-8) zeigten sowohl bei der Hoch- und Niedrigdosis, als auch im freien und konjugierten Fall im Vergleich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Plattingehalts. Rodrigues *et al.* konnten in ihren Studien mit Carvedilol bereits postulieren, dass die Gabe des Antioxidans nicht in Zusammenhang mit einer reduzierten renalen Aufnahme Cisplatin gebracht werden kann [161, 164]. Dennoch steht dem gegenüber, dass Carvedilol ebenso wie Cisplatin über den OCT2-Rezeptor in die proximalen Tubulus aufgenommen wird [237]. Dadurch könnte es zu einer kompetitiven Anbindung der beiden Substrate (Carvedilol vers. Cisplatin) an OCT2 kommen und ggfs. zu einer Senkung der Aufnahme eines Substrats führen. Im Rahmen dieser Studie konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden.

Um unabhängig von der Platinkonzentration einen protektiven Effekt der Wirkstoffe ermitteln zu können, wurden die Nierenfunktionsparameter Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff im zeitlichen Verlauf bestimmt. Dabei zeigten beide Parameter sieben Tage nach Cisplatin-Injektion die größten Streuungen der Gruppen untereinander. Während bei Gruppe 1 (Cisplatin + Vehikel) und Gruppe 3 (Liponsäure-Konjugat) ein weiterer Anstieg der untersuchten Parameter zu verzeichnen ist, konnte bei den restlichen Gruppen eine Regenerierung der Nierenfunktion festgestellt werden, was mit den Platinkonzentrationen der Gruppen in Korrelation gebracht werden kann.

Wie bereits bei der Cisplatin-Dosisfindung ersichtlich (Kapitel 3.6.1) stiegen die Varianzen innerhalb der Gruppen bei Zunahme des Mittelwerts stark an. Gruppe 1 und 3 zeigten dabei jeweils die höchsten Konzentrationen beider Parameter, jedoch gleichzeitig auch im Vergleich die größten Varianzen innerhalb der Gruppe. Insbesondere ist hervorzuheben, dass Gruppe 1 (Cisplatin + Vehikel) trotz starkem Anstieg des Mittelwerts im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied

zum Kontrollwert aufweist. Dadurch ist eine Evaluierung des protektiven Effekts der behandelten Gruppen im Vergleich zu Gruppe 1 nicht möglich.

Im Vergleich zur Literatur erreichte keine Gruppe weder nach vier, noch sieben Tage nach Cisplatin-Applikation eine Normalisierung der untersuchten Parameter [135, 137, 161, 166]. Wie bereits erwähnt und auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, konnte durch die Applikation von Kochsalzlösung eine starke nephroprotektive Wirkung erzielt werden. Da in den zitierten Studien teilweise isotonische Kochsalzlösungen zur Lösung der Wirkstoffe verwendet wurden oder keine Angaben dazu gemacht wurden, ist nur schwer nachzuvollziehen in wie weit die protektive Wirkung von den verwendeten Wirkstoffen ausging. Generell ist ein *Bridging* mit anderen Studien gleicher Thematik nur bedingt möglich, da bereits kleine Veränderungen von nebensächlich erscheinenden Parametern starke Auswirkungen haben können. Im Rahmen dieser Studie wurde den Versuchstieren beispielweise mehrfach Blut entnommen, um einen Eindruck der Nierenfunktion im zeitlichen Verlauf zu erhalten. Gegebenenfalls führte die häufigere Blutentnahme zu größerem Stress und zu einer stärkeren Schwächung der Tiere, die mit einer schlechteren Genesung einhergeht.

Aus den Daten lässt sich des Weiteren schlussfolgern, dass eine Korrelation zwischen den bestimmten Platinkonzentration und den Nierenfunktionsparametern existiert. Laut Literatur ist die Nephrotoxizität Cisplatins dosis- und zeitabhängig [110]. Daraus ergibt sich unter anderem eine Abhängigkeit der renalen toxischen Wirkung Cisplatins von dessen Eliminierungskinetik. Die Anbindung Cisplatins an Plasmaproteine sowie zelleigene Proteine beeinflusst die renale Ausscheidung des Zytostatikums enorm [238]. Deswegen kann davon ausgegangen werden, je höher die intrazellulären Konzentrationen an Cisplatin und je länger dessen Verweilzeit in den Zellen, desto höher die induzierten renalen Schädigung.

Gruppe 3 (Cisplatin + LA-Konjugat) zeigte als einzige Gruppe signifikante Unterschiede in allen ermittelten Parametern. Erhöhte Platinkonzentrationen resultierten in erhöhten Plasma-Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen, die Indizien für eine stärkere renale Schädigung sind. Das Studiendesign sah vor, dass jeweils eine Stunde vor und nach der Cisplatingabe eine Applikation erfolgt und zusätzlich eine weitere in den vier darauffolgenden Tagen. Da nach 24 Stunden von einer Eliminierung Cisplatins aus dem Blutkreislauf und dem Intrapertonealraum ausgegangen werden kann, erfolgte in den vier aufeinander folgenden Tagen eine Behandlung über den nierenspezifischen Transport der Liponsäure durch die Gabe des LA-Konjugats. Dennoch zeigte sich kein Behandlungseffekt. Die Applikation von Antioxidantien kann vermutlich lediglich als präventive Maßnahme gegen die cisplatininduzierte Nephrotoxizität eingesetzt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Liponsäure keinen Einfluss auf die Ausscheidungsprozesse Cisplatins hat.

3. Ergebnisse

Die histologischen Untersuchungen, sieben Tage nach der Cisplatingabe, zeigten die erwartete tubulotoxische Wirkung Cisplatins, besonders deutlich in Gruppe 1 (Cisplatin + Vehikel). Im Nierencortex konnten unterschiedliche Zellschädigungen festgestellt werden sowie tubuläre Dilatationen durch Kollageneinlagerungen, was auf tubulointerstitielle Fibrose deutet. Zusätzlich wurden durch die Färbung Ablagerungen, sogenannte „casts“ im distalen Tubuluslumen sichtbar, die stark auf eine Proteinurie hindeuten [209]. Im Glomerulum konnten dagegen keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden, sodass eine Schädigung des Glomerulum ausgeschlossen werden kann. Um die Auswirkungen der Behandlungen mit der Kontrollgruppe (Cisplatin + Vehikel) vergleichen zu können, wurden quantitative Untersuchungen durchgeführt, die eine Aussage über den Grad des fibrotischen Gewebes liefern. Da die Ursache von Kollageneinlagerungen Entzündungsprozesse sind, dient der Grad an fibrotischen Gewebe – im Vergleich zum Kontrolltier – als Marker der Kondition der Zelle.

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung des Nierencortexes bei Gruppe 1 (Cisplatin + Vehikel) zeigten im Vergleich zu allen weiteren Gruppen die signifikant größten Kollagenablagerungen. Bei Gruppe 4 (Cisplatin + LA-Konjugat), die sonst bei den anderen Parametern die stärksten Abweichungen vom Kontrollwert aufwies, konnten im Schnitt 25 % weniger fibrotisches Gewebe im Vergleich zu Gruppe 1 ermittelt werden. Dennoch konnten auch hier signifikant höhere Schädigungen im Vergleich zu allen weiteren Behandlungsgruppen festgestellt werden, teilweise bis zu 75 % im Vergleich zu Gruppe 3 (Carrier + Cisplatin). Da keine signifikanten Unterschiede der Kollageneinlagerungen bei allen behandelten Gruppen (ausgeschlossen Gruppe 4) im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden konnten, kann histologisch von einer protektiven Wirkung der Wirkstoffe auf die nephrotoxische Wirkung Cisplatins ausgegangen werden. Die Carvedilol-Behandlungen mit unterschiedlichen Dosen sowie in konjugierter Form zeigten auch hier untereinander keine signifikanten Unterschiede.

Die quantitative Auswertung des intermediären Bereichs zwischen Cortex-Medulla zeigte ähnliche Unterschiede unterhalb der Gruppen wie im Cortex. Interessanterweise löste Cisplatin in der Medulla noch starke Alterationen aus, die durch ausgeprägte Kollagenablagerungen in der Gruppe 1 detektierbar waren. Alle sonstigen Gruppen zeigten hier keine Auffälligkeiten, woraus geschlossen werden kann, dass eine protektive Wirkung der Wirkstoffe in der Medulla (Henle-Schleife, Sammelrohre) der Nieren zu Trage kommt. Eine Auswirkung der zytotoxischen Wirkung Cisplatins ist jedoch lediglich im proximalen Tubulus sowie distalen Tubulus der Nieren bekannt (Nierencortex). Da für die histologischen Aufnahmen lediglich ein Tier verwendet wurde, empfehlen sich zur Validierung dieser Beobachtung weitere Versuche.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Zeitpunkt der Applikation, die Applikationsroute und der Wirkmechanismus für die protektive Wirkung eine entscheidende Rolle spielen. So sollte

die Gabe von Antioxidantien vor der Cisplatin-Applikation oder kurz danach verabreicht werden, um die Zellen präventiv gegen oxidativen Stress zu stärken. Gleiches gilt für Substanzen, die die spezifischen Rezeptoren für die Cisplatin-Aufnahme (OCT2, Ctr1) inhibieren. Apoptose-Inhibitoren, entzündungshemmende Wirkstoffe sowie Substanzen, die die Ausscheidungsmechanismen regulieren, sollten simultan oder nach der Cisplatin-Injektion appliziert werden.

Um eine möglichst hohe protektive Wirkung zu erzielen, sollten ggfs. Kombinationen mehrerer Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen verabreicht werden. Um einen Einfluss der applizierten Substanzen auf die anti-neoplastische Wirkung Cisplatins zu vermeiden, ist generell ein nieren-spezifisches *Targeting* weiterhin zu empfehlen.

4.5.4 Langfristige Alterationen des Nierengewebes

In einer retrospektiven Studie mit über 800 Patienten, die Cisplatin als Chemotherapeutikum verabreicht bekamen, konnten neben akuten Nierenschädigungen auch langfristig permanente Einschränkungen der Nierenfunktionen festgestellt werden [100]. Um die langfristigen Auswirkung des Zytostatikums zu untersuchen, wurden Organschnitte der Nieren, 30 Tage nach der einmaligen Cisplatingabe durchgeführt und analysiert. Im Vergleich zu 7 Tage nach der Cisplatingabe erhaltenen Daten, konnte nach Anfärbung der Kollagenfasern und quantitativer Auswertung teilweise eine Erhöhung der Schädigung der tubulären Strukturen beobachtet werden. Die Gruppen zeigten jedoch insgesamt ein inkonsistentes Muster. Während Gruppe 1 (Cisplatin + Vehikel) keine signifikanten Unterschiede aufweist, zeigt die LA-Konjugat-Gruppe einen Anstieg der Kollageneinlagerungen von über 440 %.

Da auch im Rahmen dieser Untersuchung jeweils nur ein Tier histologisch untersucht wurde, kann keine repräsentative Aussage über die Gruppe getroffen werden. Um die Ergebnisse zu validieren, werden größere Zahlen an Versuchstieren benötigt. Zusätzlich wäre interessant zu ermitteln, ob ein Zusammenhang zwischen der Platinkonzentration in den Nieren und den langfristigen Schädigungen des Nierengewebes besteht. Gegebenenfalls kann es durch die Anbindung Cisplatins an das LA-Konjugat zu einer Verhinderung der Ausscheidung des reaktiven Metabolits kommen, der folglich eine längerfristige renale Schädigung hervorruft.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden literaturbekannte protektive Wirkstoffe an den nierenspezifischen Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**) konjugiert, um eine Senkung der Nephrotoxizität des Zytostatikums Cisplatin zu erzielen. Durch das *Targeting* sollte im Vergleich zu den freien Wirkstoffen eine verbesserte Dosis-Wirkungs-Beziehung erzielt werden.

Je nach Wirkstoff wurden dabei unterschiedliche Verknüpfungsstrategien verwendet. Amid-, Ester- und Carbamatverbindungen wiesen bei den untersuchten Konjugaten ausreichende Plasmastabilitäten auf, die ein Wirkstoff-*Targeting* in die Nieren ermöglichen. Szintigraphische Untersuchungen der radiomarkierten Konjugate konnten eine exklusive nierenspezifische Anreicherung der Wirkstoffe in den Nieren bestätigen.

Das Studiendesign wurde bezüglich des Tiermodells, Dosis und Applikation an unterschiedliche bereits veröffentlichten Nephrotoxizitätsstudien angelehnt. Anhand der Vorversuche konnte festgestellt werden, dass die Gabe von isotonischer Kochsalzlösung bereits eine starke nephroprotektive Wirkung in dem verwendeten Tiermodell aufweist, sodass zur Lösung aller Substanzen 5 %ige Glucose-Lösung eingesetzt wurde. Des Weiteren konnte im 24-h-Modell eine hohe Anreicherung Cisplatin in den Nieren bestätigt werden. Die Leber wies dagegen nur eine leichtere Erhöhung der Platinkonzentration in allen Gruppen auf.

Im 7-Tage-Modell wurde der Effekt der Behandlungen auf die Nierenfunktionsparameter Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff untersucht. Hier zeigten weder die freien Wirkstoffe, noch die Konjugate in dem verwendeten Studiendesign signifikante Verbesserungen. Die mittels Liponsäure-Konjugat behandelte Gruppe wies signifikant höhere Werte im Vergleich zur unbehandelten Gruppe auf, was auf eine verstärkte Nephrotoxizität deutet. Dieser Effekt konnte lediglich bei der konjugierten Form beobachtet werden. Die Bestimmungen der Platinkonzentrationen zeigten eine um ca. 43 % höhere Platinkonzentration in den Nieren, der über das Liponsäure-Konjugat behandelten Gruppe. *In-vitro*-Untersuchungen bestätigten, dass unter physiologischen Bedingungen eine Anbindung Cisplatin an die Thiole der Liponsäure stattfindet, die so bei dem Konjugat zu einer erhöhten Aufnahme des Zytostatikums in den Nieren führt.

Zwischen den übrigen getesteten Wirkstoffen und deren Konjugate konnten in allen untersuchten Parametern aufgrund der hohen Varianzen innerhalb der Gruppen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Tendenziell zeigten jedoch alle behandelten Gruppen niedrigere Mittelwerte im Vergleich zur unbehandelten Gruppe in allen ermittelten Parametern. Überraschenderweise wies der freie Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ einen protektiven Effekt der Nierenfunktionsparameter auf und zeigte gleichzeitig einen Einfluss auf die Cisplatin Aufnahme in den proximalen Tubuluszellen, da vergleichsweise niedrige Platinkonzentrationen in den Nieren gemessen wurden. Grundsätzlich konnte in allen Gruppen eine Korrelation zwischen der Cisplatin Aufnahme und den Nierenfunktionsparametern beobachtet werden.

Schlussfolgernd kann zusammengefasst werden, dass Liponsäure bei systemischer Gabe tendenziell Cisplatin bindet und somit die Effektivität des Zytostatikums reduzieren kann. Solche Effekte sind bei der Wahl des Protektivums zu beachten, um die Antitumorwirkung der Chemotherapie zu garantieren. Zudem sollten andere Schutzstrategien, die nicht auf antioxidativen Effekten beruhen, wie zum Beispiel OCT2-Inhibitoren oder Antiapoptotika, untersucht werden.

Aufgrund starker Schwankungen der Blutparameter innerhalb der Gruppen können bei dem verwendeten Studiendesign nur gering aussagekräftige Schlussfolgerungen gezogen werden. Somit sollten in Zukunft größere Tieranzahlen pro Gruppe verwendet werden, um die Varianzen zu senken und damit signifikante Ergebnisse zu generieren. Zusätzlich sollten weitere Funktionsparameter, wie beispielsweise Proteinurie, ermittelt werden, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen.

Konventionelle Supportivmaßnahmen zur Senkung der Nephrotoxizität Cisplatin insbesondere bei der Verwendung höherer Dosen sowie bei kumulativer Gabe verbleiben bis dato unbefriedigend. Es bestehen Bedenken darüber, dass potentielle Wirkstoffe bei systemischer Administration die anti-neoplastische Wirkung Cisplatin negativ beeinflussen können. Nur wenige Ansätze wurden in klinischen Studien weiterverfolgt. Das nierenspezifische Wirkstoff-*Targeting* mit Hilfe des Carriers (KKEEE)₃K-NH₂ stellt eine attraktive Methode dar, um die Effektivität der protektiven Wirkung zu erhöhen und Nebenwirkungen der systemischen Gabe von Wirkstoffen zu verhindern. Applikations- und Administrationsrouten sind bei zukünftigen Arbeiten zu optimieren, da sie einen erheblichen Einfluss auf die Schutzwirkung haben. Da antioxidative Protektiva weder in Konjugation, noch in freier Form einen signifikanten Effekt zeigten, sollten verstärkt Wirkstoffe mit anderen Wirkmechanismen in Betracht gezogen werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Methoden

6.1.1 Festphasenpeptidsynthese

Alle verwendeten Peptide wurden über einen Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems GmbH (Darmstadt), Modell 433A, unter Verwendung der Fmoc/tBu-Strategie hergestellt. Je nach Synthesestrategie wurden unterschiedliche Harze als feste Phase eingesetzt. Abhängig von der gewünschten Produktmenge wurden unterschiedliche Verfahrensprotokolle verwendet. Bei 0,1 mmol-Ansätzen wurde die Synthese jeweils mit 10-fachem Überschuss an Aminosäuren und HBTU durchgeführt und bei 0,25 mmol mit jeweils 4-fachem Überschuss. Beide Methoden führten weitgehend zu gleichen Ausbeuten und Produktreinheiten. Als Lösungsmittel wurde NMP verwendet; zur Quellung der Harze DCM und zur Fmoc-Abspaltung 20 %iges Piperidin in NMP. Nach einer Fmoc-Abspaltung werden jeweils automatisiert Leitfähigkeitsmessungen durchgeführt, um eine erfolgreiche Abspaltung nachzuweisen oder ggfs. Abspaltungsvorgänge zu wiederholen. Die Schutzgruppen der reaktiven Seitenketten der Aminosäuren variierten je nach Synthesestrategie. Folgende Tabelle liefert eine Übersicht zu den verwendeten Aminosäuren mit der jeweiligen verwendeten Schutzgruppe. Alle angegebenen Aminosäuren wurden bei Novabiochem (Merck KGaA, Darmstadt) erworben

Tabelle 11: Verwendete Aminosäuren mit jeweiligen Schutzgruppen.

Aminosäure	Schutzgruppen
Arginin	Fmoc-Arg(Pbf)-OH
Asparagin	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
Cystein	Fmoc-Cys(Trt)-OH
Glutamin	Fmoc-Gln-OH
Glutaminsäure	Fmoc-Glu(OtBu)-OH
Lysin	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Serin	Fmoc-Ser(OtBu)-OH
Tyrosin	Fmoc-Tyr(OtBu)-OH Fmoc-D-Tyr(OtBu)-OH

6.1.1.1 Abspaltung von Peptiden

Zur Abspaltung der Peptide wurden unterschiedliche Abspaltungsreagenzien verwendet, die an die unterschiedlichen reaktiven Seitenketten des Peptids sowie an das verwendete Harz angepasst wurden.

Als Standard-Harz für die unterschiedlichen Peptide wurde das flexible und hoch quellfähige Tenta-Gel-S-Harz von Firma Rapp Polymere (Tübingen) verwendet, das mit einem Rink-Amid-Linker funktionalisiert ist. Zur Abspaltung wurde TFA/TIS/H₂O im Volumenverhältnis 95/2,5/2,5 eingesetzt. Aufgrund der Linker-Funktionalisierung des Harzes beinhalten alle abgespaltenen Peptide am C-Terminus eine Amidbindung. Das säurelabile 2-Chlorotriyl-Chlorid-Harz (Merck Millipore, Darmstadt) hingegen, erlaubt eine Abspaltung mit 1 %iger TFA-Lösung und ermöglicht somit eine Abspaltung des Peptids mit vollgeschützten reaktiven Seitenketten. Je nach Synthesestrategie wurden somit 1- 50 % TFA in DCM und 5 % TIS zur Abspaltung des Harzes verwendet. Nach Abspaltung des Peptids von einem Chlorotriyl-Harz bildet sich am C-Terminus – im Gegensatz zu einem Rink-Amid-Harz – eine freie Carboxylgruppe aus.

Je nach verwendetem Harz wurden die Peptidylharze mit dem Abspaltungsreagenz suspendiert (1 ml Abspaltungsreagenz pro 100 mg Harz) und für ca. 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Harz über eine Glasfritte abgetrennt und das Filtrat in kaltem MTBE gegeben, wobei es zur Ausfällung des Peptids kam. Die milchige Suspension wurde zentrifugiert (10 min bei 2000 g), sodass der MTBE abdekantiert und das isolierte Peptid getrocknet werden konnte. Um ggfs. Reste des Ab-

spaltungsreagenzes zu entfernen, kann der Waschschrift (Suspension des Peptids mit MTBE und anschließende Zentrifugation) mehrfach wiederholt werden.

Bei schwefelhaltigen Seitengruppen, wie zum Beispiel Cystein oder Methionin wurde zur Verhinderung der Bildung von Disulfidbindungen oder weiteren nukleophilen Angriffen der abgespaltenen Schutzgruppen folgendes Abspaltungsreagenz verwendet: TFA/Anisol/Thioanisol (90/2/8, v/v/v).

6.1.1.2 Aufreinigung und Charakterisierung von Peptiden

Die Reinigung des vom Harz abgespaltenen Peptids wurde mittels semipräparativer HPLC durchgeführt. Mischer und Injektor der Firma Knauer GmbH, sowie Pumpen (LaPrep, P130) und Detektor (LaPrep, 314) der Firma VWR GmbH wurden für die Aufreinigung verwendet. Als stationäre Phase wurde eine Säule vom Typ Waters XBridge BEH130 PREP C18 (5 μm , 19 \times 150 mm) verwendet. Für die Trennung wurde ein Fluss von 15 ml/min eingestellt, wobei 0,1 % TFA in Wasser und Acetonitril als Lösungsmittel dienten. Zur Trennung wurde ein Gradient von Wasser auf Acetonitril verwendet, der den physikochemischen Eigenschaften des Peptids angepasst wurde. Nach der Lyophilisierung der gesammelten Fraktionen wurde das gereinigte Peptid als farbloser Feststoff erhalten.

Zur Charakterisierung der Produkte diente eine analytische HPLC (HITACHI Interface D-7000), sowie eine HPLC-MS der Firma Agilent Technologies GmbH, Serie 1100. Die HPLC-Analyse für Peptide unter Standardbedingungen erfolgte anhand eines linearen Gradienten von 0,1 % TFA in Wasser auf 0,1 % TFA in Acetonitril innerhalb von 10 min. Bedingungen: Chromolith Performance RP-18e-Säule (100 \times 4,6 mm), Flussrate: 2 ml/min, Wellenlänge = 214 nm. Für massenspektrometrische Untersuchungen wurden als Standard folgende Bedingungen gewählt: Linearer Gradient von 4 % auf 100 % ACN in 2,8 Minuten, Säule: Chromolith SpeedRod RP-18e, 50 - 4,6 mm, Flussrate: 2,4 ml/min, Wellenlänge = 220 nm. Die Massenspektren wurden im Bereich $m/z = 100-2000$ aufgenommen.

6.1.2 Peptidsynthese

Die Synthese der Peptoide erfolgte über Festphasensynthese automatisiert an einem Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems GmbH (Darmstadt), Modell 433A im Größenmaßstab von 0,05 mmol. Als feste Phase diente das Rink-Amid-Harz Tenta-Gel-S der Firma Rapp Polymere (Tübingen), das nach der Abspaltung am C-Terminus des Peptoids ein Amid generiert. Nach einer standardisierten Fmoc-Abspaltung des Harzes wurde das Peptoid schrittweise über die Submonomer-Methode

aufgebaut [239]. Die Synthese erfolgte dabei jeweils in zwei aufeinanderfolgenden Syntheseschritten: Bromacetylierung und Substitution über ein primäres Amin. Dazu wurden folgende Schritte programmiert:

Bromacetylierung: 1 ml einer 1,2 M Bromessigsäure in DMF
+ 0,15 ml reines DIC
→ Schütteln für 20 min bei RT

Waschschritt: 5 × mit jeweils 5 ml DMF

Substitution: 2 ml einer 1,5 M Lösung des gewünschtenamins in DMF
→ Schütteln für 60 min bei RT

Waschschritt: 5 × mit jeweils 5 ml DMF

Die jeweilige Menge an Aminobaustein wurde in eine Kartusche abgefüllt und in gewünschter Sequenz in den Peptidsynthesizer gestellt. Das Kopplungsreagenz DIC sowie die Bromessigsäure wurden vorgelöst in Flaschen an den Peptidsynthesizer montiert. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte, wie Abspaltung, Aufreinigung, Trocknung, Radiomarkierung und Analytik verlaufen analog zu denen der Peptidsynthese (siehe Kapitel 6.1.1).

6.1.3 Kaisertest

Zum Test auf primäre Aminogruppen wurden einige wenige Harzkügelchen entnommen und mit Ethanol gewaschen. Danach wurden 100 µl Ninhydrinlösung (50 mg/ml Ninhydrin in Ethanol) mit 100 µl einer wässrigen KCN-Lösung (2 % einer 10 mM wässrigen KCN-Lösung in Pyridin) zusammen mit dem Harz vermischt und 5 min bei 120 °C erhitzt. Eine dunkelblaue Verfärbung zeigte sich bei der Anwesenheit von primären Aminen und deutete auf eine unvollständige Kupplung hin.

6.1.4 Radioaktive Iodierung von Peptiden

Die Markierung der Peptide erfolgte mittels elektrophiler aromatischer Substitution an Tyrosin-Resten mittels Chloramin-T-Methode [240]. Dabei wurden folgende Iodisotope für die Radiomarkie-

rungen der Peptide verwendet: ^{123}I od, ^{125}I od oder ^{131}I od. Zur Markierung wurde eine 1 mM Peptidstammlosung in Wasser hergestellt. Wenn nötig, wurde DMSO zur besseren Löslichkeit zugesetzt. Anschließend wurden 10 μl dieser Stammlosung mit 20 μl Phosphatpuffer (0,25 M, pH 7,4) versetzt und die gewünschte Menge an radioaktivem Iod hinzugegeben. Zur Markierung wurden 5 μl Chloramin-T (2 mg/ml H_2O) hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte für 30 Sekunden und wurde anschließend mit 10 μl einer gesättigten Methionin-Lösung gequenchet. Nach der Markierung wurde das Peptid mittels semi-präparativer HPLC (Chromolith Performance RP-18e-Säule, 100 \times 4,6 mm) aufgereinigt, um das überschüssige freie Iod und andere Nebenprodukte zu entfernen. Zur Trennung wurde ein linearer Gradient von 0,1 % TFA in Wasser auf 0,1 % TFA in Acetonitril in 10 Minuten verwendet, UV-Absorption = 214 nm, γ -Detektion. Zum Schluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das markierte Peptid im gewünschten Puffer aufgenommen. Die Markierungsausbeute nach der Reaktion bzw. die Reinheit des markierten Peptids konnten mittels HPLC charakterisiert werden. Standardbedingungen: linearer Gradient von 0,1 % TFA in Wasser auf 0,1 % TFA in Acetonitril in 5 min, Chromolith Performance RP-18e-Säule (100 \times 4.6 mm), Flussrate: 2 ml/min, Wellenlänge = 214 nm, γ -Detektion.

6.1.5 *In-vivo*-Verteilungsstudien

Die Bioverteilung wurde in weiblichen NMRI-Mäusen bzw. Wistar-Ratten anhand radioaktiv markierter Peptide untersucht. Etwa 100 μl der markierten Verbindung wurden pro Tier injiziert. Die Tiere (n = 3 pro Zeitpunkt) wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten getötet und die Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen Organen mittels γ -Counter (Berthold LB951G) quantifiziert. Folgende Organe/Gewebe wurden entnommen, gewogen und untersucht: Blut, Herz, Lunge, Milz, Leber, Niere, Muskel, Hirn, Darm. Zur Auswertung wurden ebenfalls Standards des markierten Peptids im γ -Counter bestimmt, um die Radioaktivität [cpm] pro mg Injektionslösung zu bestimmen. Die gemessene Radioaktivität pro Gramm Organ/Gewebe bezogen auf die injizierte Dosis (ID) wurde bestimmt und als %ID/g angegeben.

6.1.6 Szintigraphische Studien

Planare Aufnahmen von Mäusen und Ratten wurden mit einer γ -Kamera der Firma Biospace Lab (Paris, Frankreich), Gamma imager-sct, aufgenommen. Die Tiere wurden mit Sevofluran (Sevorane, Ab-

bott) narkotisiert und der radioaktive Tracer appliziert. Für szintigraphische Bilder wurde ^{125}I verwendet. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden Bilder der radioaktiven Verteilung aufgezeichnet. Die Aufnahmezeit betrug 5 Minuten. Fokussierte Flächen („region of interest“, ROI) wurden mit Hilfe der zugehörigen Software ausgewertet.

6.1.7 *In-vitro*-Bestimmung der Plasmastabilität

Alle Plasmastabilitätsuntersuchungen erfolgten in Human-, Maus- und Rattenplasma, die jeweils mit 5 Vol.-% 1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) stabilisiert wurden. Vor der Zugabe der Proben wurde das Plasma bei 37 °C vorinkubiert. Alle untersuchten Proben wurden in ACN/H₂O (6/4) zu einer Konzentration von 10 mM gelöst und anschließend mit Wasser auf eine Konzentration von 40 µM verdünnt. Zur Überprüfung der Assaybedingungen wurde bei jeder Messreihe Propanthelinbromid als Kontrollsubstanz eingesetzt. Für das Propanthelinbromid galt die gleiche Vorgehensweise wie bei allen anderen untersuchten Substanzen. Jeweils 2 µl der zu untersuchten Substanzlösung und der Kontrollsubstanz wurden mit 246 µl Plasma in Eppendorf-*Tubes* vermischt und bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Messzeitpunkte (0, 1, 2 und 4 Stunden) wurden jeweils 100 µl der Proben zum Abstoppen der Reaktion mit 300 µl ACN vermischt und 5 min bei 3600 min⁻¹ zentrifugiert. 100 µl der gewonnenen Probenüberstände wurden mit 500 µl H₂O verdünnt und per HPLC-MS/MS (Agilent Technologies GmbH, Serie 1200) analysiert. Als mobile Phasen diente 0,1 Vol.-% Ameisensäure in H₂O und ACN, die in einem linearen Gradienten von 0 % auf 90 % ACN in 1,5 min gefahren wurden. Weitere Bedingungen: 10 µl Injektionsvolumen, Flussrate: 0,9 mL/min, Säule: Chromolith FastGradient RP-18e, 50 - 3 mm (Merck KGaA, Darmstadt). Quantifiziert wurde über die Konzentration der Kontrollsubstanz Propanthelinbromid (1-Punkt-Kalibration) mittels der Software „Analyst“, Version 1.6.2 (AB Sciex Instruments). Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung ausgeführt.

6.1.8 *In-vitro*-Studie über Cisplatin-Wirkstoff-Metabolisierung

Die *In-vitro*-Inkubation wurde in Anlehnung einer Studie von Townsend *et al.* durchgeführt [210]. Jeweils 1 ml Cisplatin (3,33 mM in 0,9 % NaCl, Apothekenlösung 1mg/ml, Uniklinikum Heidelberg) wurde äquimolar mit 1 ml der jeweiligen Wirkstofflösung (3,3 mM in 5 mM HEPES-Puffer, pH 7,2) vermischt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Alle in der Studie verwendeten Wirkstoffe und deren Konjugate wurden auf spontane Formationen von Cisplatin-Konjugationen einzeln untersucht.

Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch über analytische HPLC (Agilent 1100) und zusätzlich HPLC-MS (Exactive, Thermo Fisher Scientific) analysiert. Die HPLC-Analyse unter Standardbedingungen erfolgte anhand eines linearen Gradienten von 0,1 % TFA in Wasser auf 0,1 % TFA in Acetonitril in 5 min. Bedingungen: Chromolith Performance RP-18e-Säule (100 × 4.6 mm), Flussrate: 2 ml/min, Wellenlänge = 214 nm. Für die Massenspektrometrie diente eine Agilent 1200 als HPLC-System. Zur Massenkalisierung im positiven Ionenbereich wurde eine Mischung aus Koffein, dem Peptid (Met-Arg-Phe-Ala) und Ultramark 1621 verwendet. HPLC-Bedingungen waren wie folgt: Hypersil Gold C₁₈ Säule (0.21 × 200 mm), Gradient-Elution von 0,1 % TFA in Wasser auf 0,1 % TFA in Acetonitril in 30 min, Flussrate: 200 µl/min, Säulenofen: 60 °C, Wellenlänge = 214 nm. Massenspektren wurden im Bereich m/z = 200-4000 aufgenommen.

6.1.9 GSH-Bestimmung

Die Messung der Glutathion-Konzentration in Niere und Leber erfolgte mittels photometrischer Bestimmung nach Ellman [241]. Es wurde eine Methode gewählt, die die Bestimmung von nicht-proteingebundenen Sulfhydrylgruppen ermöglicht [242]. Zunächst wurden alle Organe ohne weitere Wasserzugabe homogenisiert. Anschließend wurden jeweils 100 mg des Homogenisats mit 4 ml 0,02 M EDTA-Lösung, 2,5 ml destilliertem H₂O und 500 µl einer 50 %igen Trichloracetat-Lösung vermischt und bei RT für 10 min geschüttelt. Die Suspension wurde danach bei 3000 g für 15 min zentrifugiert. Jeweils 1 ml des klaren Überstands werden mit 2 ml 0,4 M TRIS-Puffer und 50 µl 0,01 M DTNB-Lösung in einer 3 ml Küvette vermischt und innerhalb von 5 min gegen den Blindwert ohne Homogenisat vermessen. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 412 nm an einem Cary-50-Photometer (Varian Medical Systems GmbH). Alle Messungen wurden in Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die Absorptionswerte wurden über einer GSH-Standardkurve extrapoliert. Die GSH-Konzentrationen wurden in µmol/g Organ angegeben.

6.1.10 Platinbestimmung

Jeweils 250 mg Nierenhomogenisat wurden mit 2 ml Salpetersäure und 1 ml H₂O versetzt und mittels Mikrowelle (Turbowave, MLS GmbH) bei einem Standard-Temperatur-Druck-Programm aufgeschlossen. Anschließend wurde die Aufschlusslösung mit Reinstwasser auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Der Lösung wurden zusätzlich zur Kontrolle jeweils 25 µl einer internen Standardlösung (Pt(II))

10 µg/ml) hinzugefügt. Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Standardadditionsverfahren) wurde die Messlösung aliquotiert. Die Messung erfolgte anschließend an einer ICP/MS der Firma Perkin Elmer, Serie Elan 6000.

6.1.11 Harnstoff- und Kreatinin-Bestimmung

Serumkonzentrationen von Harnstoff und Kreatinin wurden nach einer Methode von Tabacco *et al.* [4] spektralphotometrisch bestimmt. Die Proben wurden im Verhältnis 3 zu1 verdünnt mittels Aqua Pure (B. Braun AG, Melsungen) und über das klinisch-chemische Analysensystem ADVIA (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Erlangen) spektralphotometrisch analysiert. Die Konzentrationen werden in mg/dl bestimmt.

6.1.12 Histologische Untersuchungen

6.1.12.1 FITC-Antikörper-Färbung

Die immunhistochemischen Analysen wurden an weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt. Dazu wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an den Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (**1**) konjugiert (siehe Kapitel 6.2, Nr. **(7)**). Eine Stunde nach intravenöser Applikation des FITC-Konjugats (**7**) (1 mg in 0,9 %igem NaCl) wurden die Tiere euthanisiert und die Organe entnommen. Die Nieren wurden anschließend für 24 h in 4 % Formalin in PBS fixiert und in Paraffin gebettet. Es wurden 5 µM große Organschnitte angefertigt, die zunächst entparaffinisiert und rehydratisiert wurden. Nachdem die Schnitte in einem *Steamer* (MultiGourmet, Braun AG) in Citratpuffer (pH = 6, Dako GmbH, Glostrup, Dänemark) für 30 min inkubiert wurden, erfolgte eine Antikörperfärbung über den Primärantikörper (*Rabbit-anti-FITC*-Antikörper 1:100, Invitrogen) für ca. 12 h bei 4 °C. Anschließend wurden die Schnitte mittels TBS-T gewaschen und mit einem Sekundärantikörper (*Goat anti-rabbit IgG*, 1:200, Dako GmbH) für 40 min inkubiert. Die Schnitte wurden dann mit Peroxidase-Blocking-Lösungen für 7 min behandelt, gefolgt von einem Waschschriff über TBS-T. Daraufhin wurde eine Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Streptavidin-HRP, Dako) für 25 min auf die Schnitte gegeben bevor die Färbung der Schnitte über eine AEC-Lösung (AEC-Substrat Chromogen, Dako) durchgeführt wurde. Die Farbreaktion wurde durch mehrmaliges Spülen mit Wasser gestoppt. Zuletzt wurde mit Hämatoxylin für 5-10 Minuten gegenge-

färbt. Zuletzt folgte nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser eine Fixierung über Aquatex (Merck KGaA, Darmstadt).

6.1.12.2 Masson-Trichrom-Färbung

Bei der Trichromfärbung werden drei verschiedene Farbnuancen (Dreifachfärbung) angewandt, wodurch sich die unterschiedlichen Gewebebestandteile differenziert darstellen lassen. Für die Färbung wurde das Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit (Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet. Zunächst wurden die entparaffinierten Organschnitte in Bouin-Lösung umfixiert (60 min bei 56 °C). Die Pikrinsäure wurde durch mehrmaliges Spülen mit destilliertem Wasser ausgewaschen.

Anschließend erfolgte die Zellkernfärbung mittels Eisenhämatoxylin-Lösung (Weigerts Hämatoxylin-Lösung), wobei nach 5 min Inkubationszeit noch keine Überfärbung stattgefunden hatte. Auf eine Wiederholung der Kernfärbung wurde verzichtet, da die darauffolgenden Färbungen mit sauren Farblösungen eine Abschwächung der Kernfärbung hervorrufen. Nach Inkubation der Eisenhämatoxylin-Lösung wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült.

Danach erfolgte die eigentliche Trichromfärbung mit Farbstoffen, die sich in ihrer Molekülgröße unterscheiden. Dazu wurde eine Lösung aus Biebrich Scarlet und Säurefuchsin (Goldner-Lösung I) verwendet (pH = 2,5) und die Zellen für 5 min angefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült.

Um kollagene Fasern zu entfärben, sowie ein Aufhellen der Zytoplasmafärbung zu erzielen, wurde ein Gemisch aus Phosphormolybdänsäure und Phosphorwolframsäure (Goldner-Lösung II) auf die Schnitte gegeben und für 5 min inkubiert. Ohne weiteres Spülen wurde die Kollagenfärbung durchgeführt.

Hierzu wurde eine Anilinblaulösung (Goldner-Lösung III), pH = 2,5 für 5 min mit den Schnitten inkubiert, wobei eine intensive blaue Färbung entsteht. Daraufhin erfolgte das Spülen in 2 %iger Essigsäure, ein Entwässern in Ethanol, Klären in Xylol und Eindecken der Schnitte.

Färbeergebnis: schwarz-rote Kerne, rotes Zytoplasma, hellrotes Fibrin, orange-rote Erythrozyten, blaue Kollagenfasern.

6.1.12.2.1 Quantitative Auswertung von Kollagenstrukturen

Zunächst wurden mittels Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung jeweils 10 Bilder pro Organsegment (Cortex, Cortex-Medulla und Medulla) angefertigt. Ein vorheriger Weißabgleich der Aufnahmen

ist für die anschließende quantitative Bestimmung essentiell, um bläuliche Verfärbungen organfreier Regionen zu eliminieren. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch die Software „imageJ“, die den Anteil der Kollagenstruktur in Pixel pro Bild angibt.

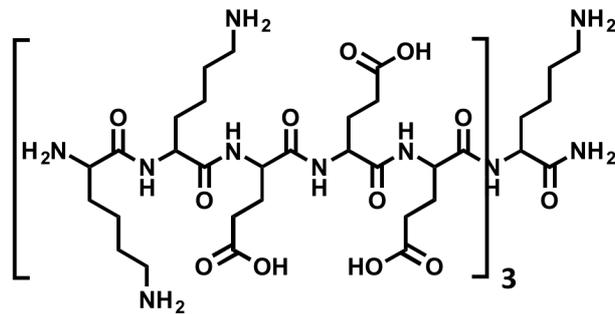
6.1.12.2.1.1 Statistische Auswertungen

Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SE) oder Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse, ANOVA getestet. Für die Evaluierung auf Varianzunterschiede innerhalb der Gruppe wurde anschließend die Turkey-Kramer-Methode angewendet. Für alle statistischen Tests wurde ein α -Fehler von 0,05 verwendet.

6.1.13 Peptidsynthese

Alle Peptide wurden, sofern nicht anders erwähnt, unter Standardbedingungen hergestellt (Kapitel 6.1.1).

Standard-Carrier (KKEEE)₃K-NH₂ (1)

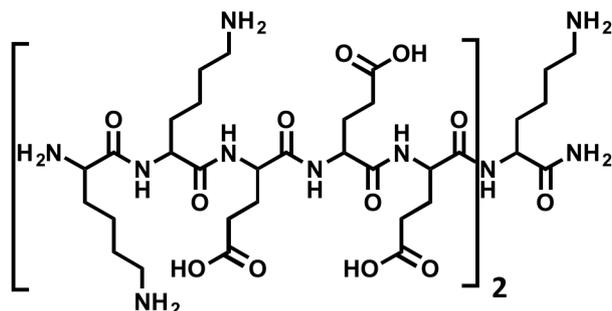


Ausbeute: 1250 mg, (54 %) als farbloser Feststoff

Analytische Daten: $M = 2076,3 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{87}\text{H}_{150}\text{N}_{24}\text{O}_{34}$

Retentionszeit (HPLC-MS): 0,38 min, Reinheit: 94 % (220 nm)

ESI-MS: $m/z = 520,0 [M+4H]^{4+}$, $693,0 [M+3H]^{3+}$, $1039,0 [M+2H]^{2+}$, Mittelwert: $2075,1 \text{ g/mol}$

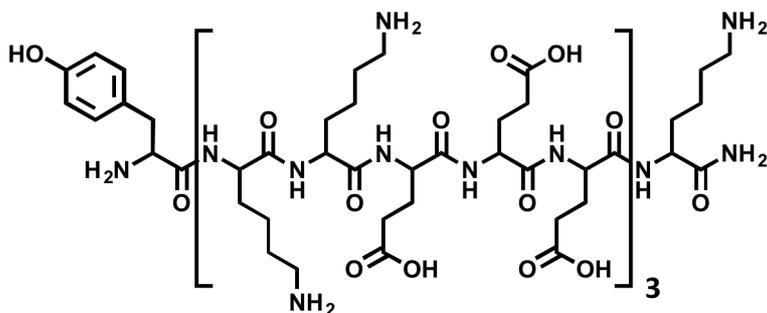
Standard-Carrier kurz (KKEEE)₂K-NH₂ (2)

Ausbeute: 640 mg, (37 %) als farbloser Feststoff

Analytische Daten: $M = 1432,6 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{60}\text{H}_{105}\text{N}_{17}\text{O}_{23}$

Retentionszeit (HPLC-MS): 0,31 min, Reinheit: 99 % (220 nm)

ESI-MS: $m/z = 359,1 [M+4H]^{4+}$, $478,2 [M+3H]^{3+}$, $716,7 [M+2H]^{2+}$, $1431,6 [M+H]^{1+}$ Mittelwert: $1431,8 \text{ g/mol}$

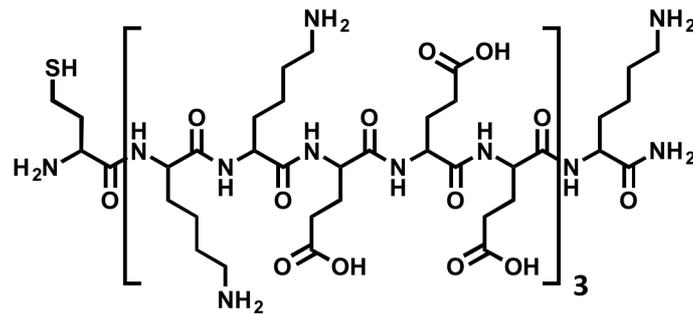
 γ (KKEEE)₃K-NH₂ (3)

Ausbeute: 1300 mg, (57 %) als farbloser Feststoff

Analytische Daten: $M = 2239,5 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{96}\text{H}_{159}\text{N}_{25}\text{O}_{36}$

Retentionszeit (HPLC-MS): 0,42 min, Reinheit: 95 % (220 nm)

ESI-MS: $m/z = 560,7 [M+4H]^{4+}$, $747,3 [M+3H]^{3+}$, Mittelwert: $2242,4 \text{ g/mol}$

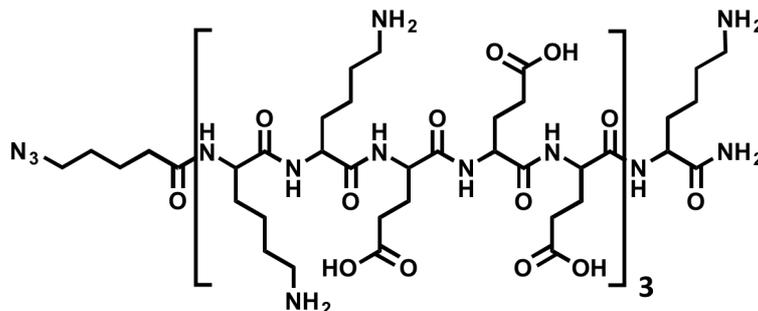
C(KKEEE)₃K-NH₂ (4)

Ausbeute: 600 mg, (28 %) als farbloser Feststoff

Analytische Daten: $M = 2179,4$ g/mol, $C_{90}H_{155}N_{25}O_{35}S$

Retentionszeit (HPLC-MS): 0,40 min, Reinheit: 92 % (220 nm)

ESI-MS: $m/z = 364,2$ $[M+6H]^{6+}$, $436,8$ $[M+5H]^{5+}$, $545,8$ $[M+4H]^{4+}$, $727,2$ $[M+3H]^{3+}$, Mittelwert: $2179,2$ g/mol

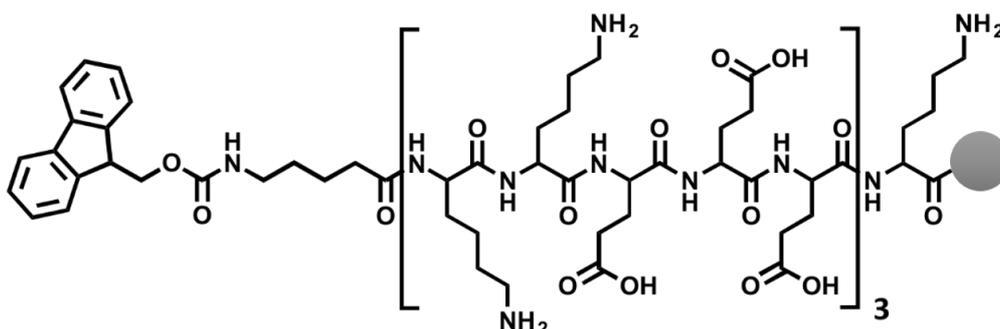
N₃(KKEEE)₃K-NH₂ (5)

5-Azido-Pentansäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, 3 eq, 930 mg, 6,5 mmol) wurden zusammen mit HBTU (3 eq, 2,47 g, 6,5 mmol) und DIEA (7,5 eq, 2,6 ml, 16,3 mmol) in 25 ml NMP gelöst und für ca. 10 min voraktiviert. Anschließend wurde die Lösung dem vorgequollenem Peptidyl-Harz (4500 mg, 1,08 mmol) hinzugegeben und bei RT für 2 h geschüttelt. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte mittels NMP und DCM. Die Abspaltung erfolgte über TFA/*m*-Cresol (95/5).

Ausbeute: 1800 mg, (38 %) als farbloser Feststoff

Analytische Daten:	$M = 2201,4 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{92}\text{H}_{157}\text{N}_{27}\text{O}_{35}$
Retentionszeit (HPLC-MS):	0,66 min, Reinheit: 89 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 551,1 [\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, $724,1 [\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, $1100,4 [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, Mittelwert: 2189,5 g/mol

Fmoc-Ahx-(KKEEE)₃K-Resin (6)

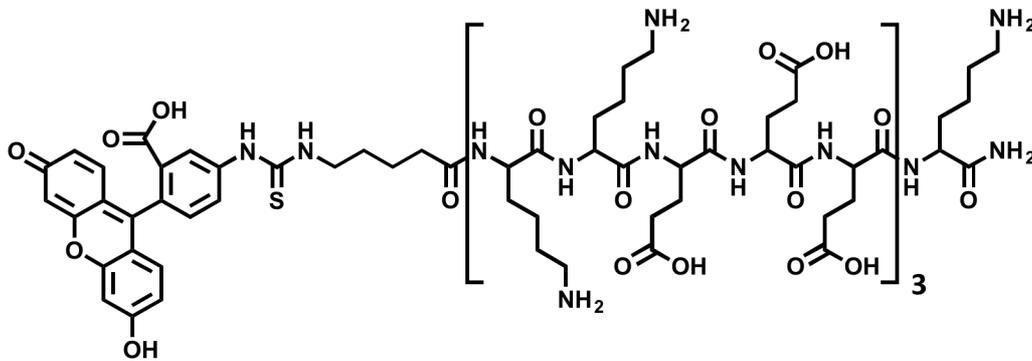


Die Synthese wurde vollautomatisiert, wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben, durchgeführt. Fmoc-6-Ahx-OH (Sigma Aldrich, St. Louis) wurde als Spacer an den *N*-Terminus des Standard-Carriers (KKEEE)₃K-NH₂ konjugiert. 1 mmol (353 mg) des Bausteins wurde in eine Kartusche abgefüllt und automatisiert über einen Peptidsynthesizer über Standard-Chemie 0,1 mmol gekoppelt.

Ausbeute:	keine Abspaltung vom Harz, sodass keine Angaben über Ausbeute möglich
Analytische Daten:	$M = 2189,4 \text{ g/mol}$ nach Abspaltung, $\text{C}_{93}\text{H}_{161}\text{N}_{25}\text{O}_{35}$

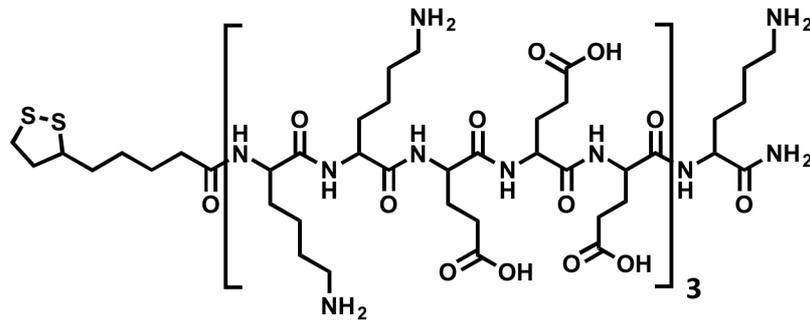
6.2 Peptid-Wirkstoff-Konjugate

FITC-(KKEEE)₃K-NH₂ (7)



Um einen Edman-Abbau der letzten Aminosäure des Peptides während der TFA-Abspaltung zu verhindern [243], wurde für die Synthese zunächst ein Ahx-Spacer an das Peptid gekoppelt. Anschließend erfolgte eine Fmoc-Abspaltung der Substanz **6**. Diesbezüglich wurden 200 mg von (**6**) mit 5 ml 20 %igem Piperidin in NMP suspendiert und für 5 min bei RT geschüttelt und anschließend abfiltriert. Dieser Vorgang wurde zwei weitere Male wiederholt, um eine erfolgreiche Fmoc-Abspaltung zu gewährleisten. Das Harz wurde dann 3 x mit 5 ml NMP gewaschen. Als Nächstes wurden 4 eq (74 mg, 0,19 mmol) Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Sigma Aldrich, St. Louis) mit 4 eq (72.81 mg, 0.19 mmol) HBTU und 10 eq (81,6 µl, 0,48 mmol) DIEA in 5ml NMP vorgelöst und zu dem Peptidylharz hinzugegeben. Die Suspension wurde bei RT für 2 h geschüttelt. Nach jeweils drei Waschschritten mit NMP und DCM erfolgte die vollständige Entschützung und Abspaltung über TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5). Das isolierte Konjugat wurde in H₂O/ACN 1:1 gelöst und aufgereinigt. Detaillierte Informationen der Parameter zur Aufreinigung sind in Kapitel 6.1.1.2 zu finden.

Ausbeute:	50 mg, (41 %) als farbloser Feststoff
Analytische Daten:	$M = 2578,8 \text{ g/mol}$, $C_{114}H_{172}N_{26}O_{40}S$
Retentionszeit (HPLC-MS):	1,07 min, Reinheit: 95 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 430,5 [M+6H]^{6+}$, $516,3 [M+5H]^{5+}$, $645,0 [M+4H]^{4+}$, $859,5 [M+3H]^{3+}$, Mittelwert: 2576,3 g/mol

Liponsäure-(KKEEE)₃K-NH₂ (8)

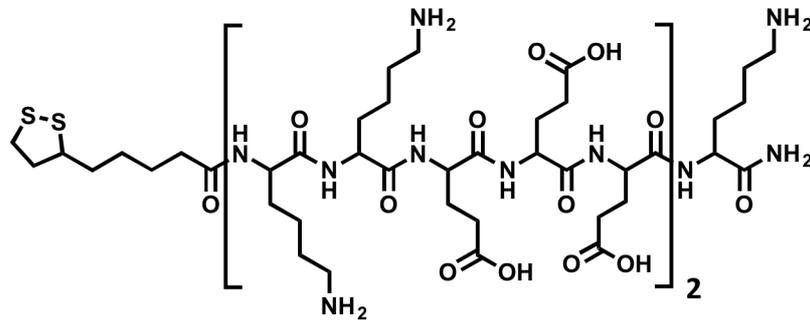
Die Synthese wurde vollautomatisiert, wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben, durchgeführt. α -Liponsäure (206 mg, 1 mmol, Merck Millipore, Darmstadt) wurde ebenfalls in eine Kartusche abgefüllt und über die Standard-Chemie 0,25 mmol mittels HBTU-Aktivierung und DIEA an den *N*-Terminus des Peptids gekoppelt. Anschließend erfolgten mehrere Waschschriffe mittels NMP und DCM. Die Abspaltung erfolgte über TFA/Anisol/Thioanisol (90/2/8). Das isolierte Konjugat wurde in H₂O/ACN 1:1 gelöst und aufgereinigt. Detaillierte Informationen der Parameter zur Aufreinigung sind in Kapitel 6.1.1.2 zu finden.

Ausbeute: 339 mg, (62 %) als farbloser Feststoff

Analytische Daten: $M = 2264,6 \text{ g/mol}$, C₉₅H₁₆₂N₂₄O₃₅S₂

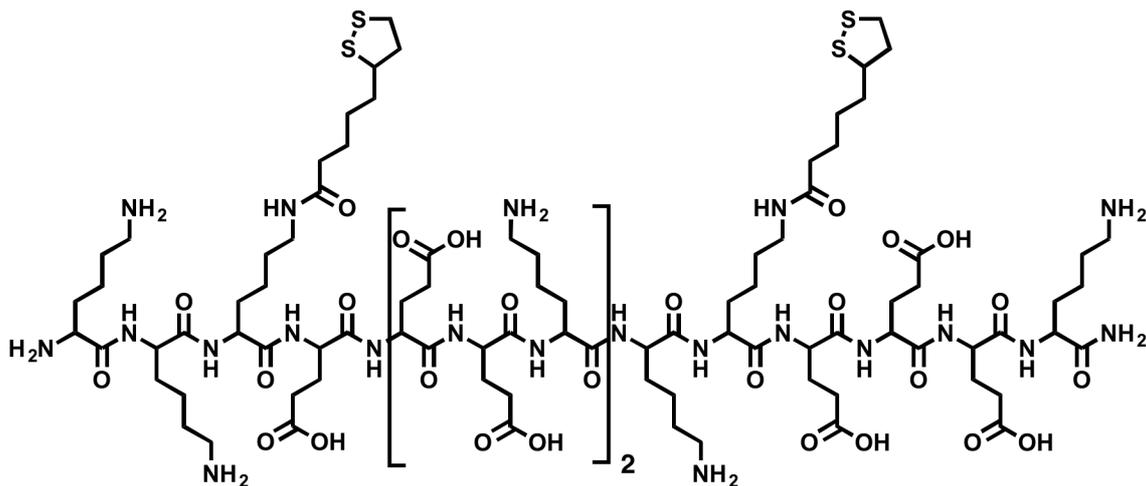
Retentionszeit (HPLC-MS): 0,99 min, Reinheit: 99 % (220 nm)

ESI-MS: $m/z = 567,0 [M+4H]^{4+}$, $755,7 [M+3H]^{3+}$, $1133,1 [M+2H]^{2+}$ Mittelwert: 2267,1 g/mol

Liponsäure-(KKEEE)₂K-NH₂ (9)

Die Synthese von Liponsäure-(KKEEE)₂K-NH₂ erfolgte analog zu **(8)**.

Ausbeute:	330 mg, (55 %) als farbloser Feststoff
Analytische Daten:	$M = 1621,0 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{68}\text{H}_{117}\text{N}_{17}\text{O}_{24}\text{S}_2$
Retentionszeit (HPLC-MS):	0,94 min, Reinheit: 99 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 540,9 [M+3H]^{3+}$, $810,6 [M+2H]^{2+}$, Mittelwert: 1619,5 g/mol

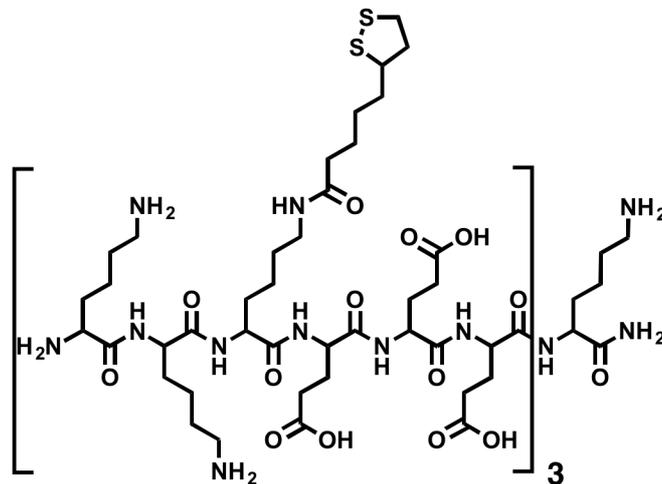
KKK_ε(LA)EEEEK_εKK_ε(LA)EEEEK-NH₂ (10)

Die Synthese wurde vollautomatisiert wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben durchgeführt. Fmoc-Lys_ε(LA)-OH (**17**, 556 mg, 1 mmol) wurde als Baustein ebenfalls in eine Kartusche abgefüllt und über die Standard-Chemie 0,25 mmol mittels HBTU-Aktivierung und DIEA gekoppelt. Die Abspaltung erfolgte über

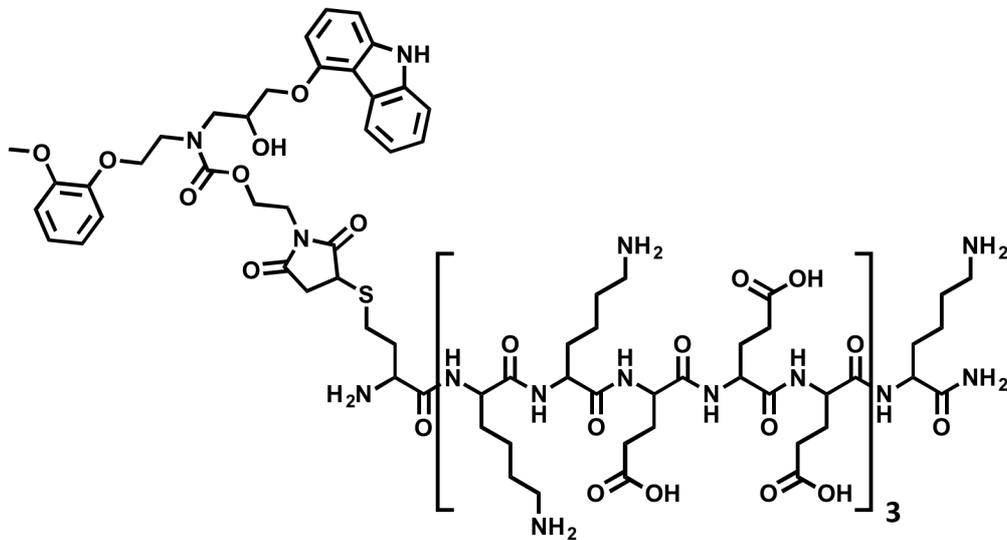
TFA/Anisol/Thioanisol (90/2/8). Das isolierte Konjugat wurde in H₂O/ACN 1:2 gelöst und aufgereinigt. Detaillierte Informationen der Parameter zur Aufreinigung sind in Kapitel 6.1.1.2 zu finden.

Ausbeute:	420 mg, (17 %) als farbloser Feststoff
Analytische Daten:	$M = 2452,0 \text{ g/mol}$ C ₁₀₄ H ₁₇₉ N ₂₅ O ₃₄ S ₄
Retentionszeit (HPLC-MS):	1,07 min, Reinheit: 87 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 613,8 [M+4H]^{4+}$, $817,8 [M+3H]^{2+}$, $1226,4 [M+2H]^{1+}$, Mittelwert: 2450,5 g/mol

(KKK_ε(LA)EEE)₃-NH₂ (11)



Ausbeute:	550 mg, (18 %) als farbloser Feststoff
Analytische Daten:	$M = 3025,7 \text{ g/mol}$, C ₁₂₉ H ₂₂₂ N ₃₀ O ₄₀ S ₆
Retentionszeit (HPLC-MS):	1,23 min, Reinheit: 98 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 605,4 [M+5H]^{5+}$, $756,6 [M+4H]^{4+}$, $1008,3 [M+3H]^{3+}$, Mittelwert: 3026,1 g/mol

Carvedilol-(KKEEE)₃K-NH₂ (12)

C(KKEEE)₃K-NH₂ (**4**, 100 mg, 0,05 mmol) wurde in 5 ml DMF gelöst und der pH-Wert mittels 1N NaOH-Lösung auf 6 eingestellt. 1,5 eq (39,5 mg, 0,07 mmol) der Substanz (**18**) wurden in 500 µl DMF gelöst und der pH-Wert mittels 1N HCl auf 7 eingestellt. Anschließend wurden die beiden Lösungen unter Rühren und Schutzgasatmosphäre zusammengegeben und für ca. 1 h bei RT gerührt. Reaktionskontrolle erfolgte über HPLC und HPLC-MS. Die Lösung wurde ohne weitere Verfahren über eine präparative HPLC, wie in Kapitel 6.1.1.2 näher erläutert, aufgereinigt.

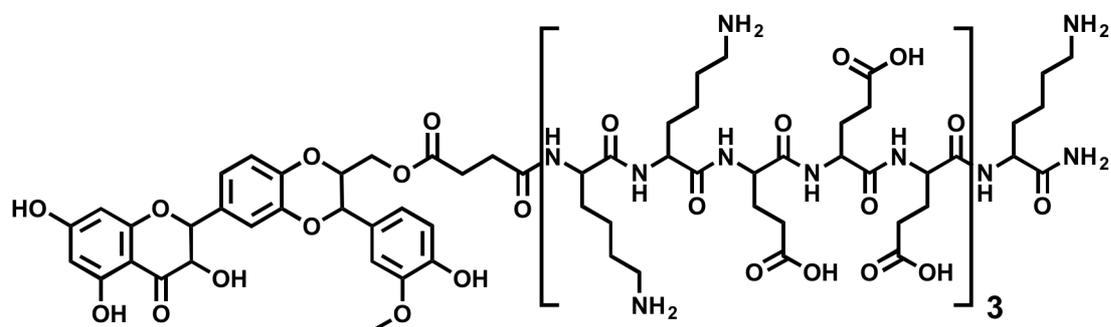
Ausbeute: 25 mg, (20 %) als farbloser Feststoff

Analytische Daten: $M = 2753,0 \text{ g/mol}$, $C_{121}H_{186}N_{28}O_{43}S$

Retentionszeit (HPLC-MS): 0,99 min, Reinheit: 96 % (220 nm)

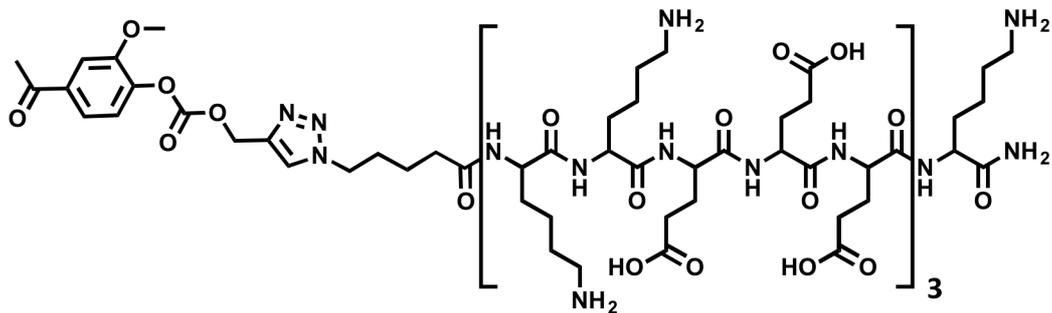
ESI-MS: $m/z = 689,4 [M+4H]^{4+}$, $918,6 [M+3H]^{3+}$, $1377,4 [M+2H]^{2+}$,

Mittelwert: 2756,1 g/mol

Silybin-(KKEEE)₃K-NH₂ (13)

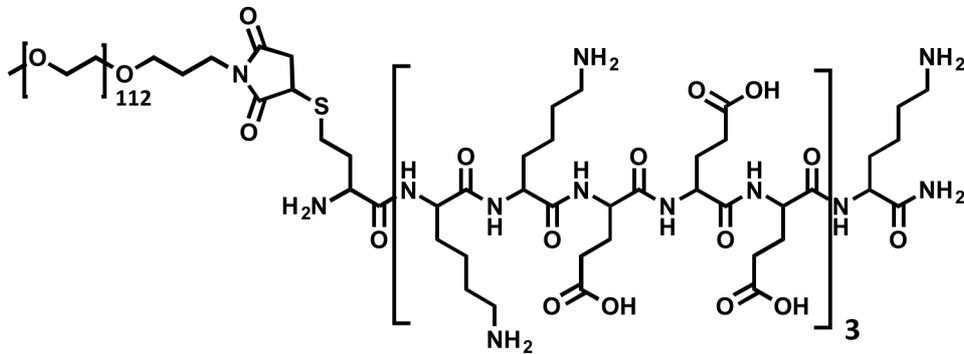
Silybin-Hemisuccinat (**19**, 3 eq, 113,2 mg, 0,19 mmol) wurden mit EDC (3 eq, 37,3 mg 0,19 mmol) und HOBT (1,6 eq, 14 mg, 0,1 mmol) in 5 ml getrocknetem DMF gelöst und mit dem vollgeschützten Peptid (KKEEE)₃K-Harz (270 mg, 0,06 mmol) suspendiert. Die Suspension wurde in einem Reaktor mit Fritte bei RT für 2 h geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung abfiltriert und das Harz 3 x mit ca. 10 ml DMF und 1 x mit DCM gewaschen. Das Harz wurde dann über TFA/TIS/H₂O, wie in Kapitel 6.1.1.1 detailliert beschrieben, abgespaltet. Die Charakterisierung erfolgte mittels HPLC und HPLC-MS. Das abgespaltene Peptid wurde in H₂O/ACN 1:1 gelöst und über eine RP-Säule aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte wie in Kapitel 6.1.1.2 näher erläutert.

Ausbeute:	50 mg, (29 %) als farbloser Feststoff
Analytische Daten:	$M = 2640,8 \text{ g/mol}$, $C_{116}H_{174}N_{24}O_{46}$
Retentionszeit (HPLC-MS):	1,03 min, Reinheit: 99 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 661,2 [M+4H]^{4+}$, $881,1 [M+3H]^{3+}$, $1320,9 [M+2H]^{2+}$, Mittelwert: 2639,6 g/mol

Apocynin-(KKEEE)₃K-NH₂ (14)

Für die spezifische Anbindung von Apocynin (**20**, 5 mg, 0,02 mmol) an die Azidogruppe des Peptids N₃-(KKEEE)₃K-NH₂ (**5**, 50 mg, 0,02 mmol) wurden beide Edukte äquimolar in 500 µl THF/H₂O 1:1 gelöst. Ein wichtiger Punkt bei der Huisgen-Klick-Chemie ist die Reduktion des Kupfers mittels Ascorbinsäure. Diese sollte getrennt stattfinden und benötigt für die Löslichkeit der Ascorbinsäure immer eine wässrige Komponente. Somit wurde Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (0,2 mg, 1,4 µmol, Merck, Darmstadt) mit Natriumascorbat (0,2 mg, 1,4 µmol, ABCR, Karlsruhe) in 200 µl THF/H₂O 1:1 suspendiert, wobei eine Orangefärbung entsteht. Diese Suspension wird unter Argon gerührt. Zu dem aktivierten Kupferkatalysator wurden die beiden vorgelösten Edukte hinzu pipettiert. Nach 2 h Rühren wurde das Gemisch lyophilisiert und zur Entfernung des Kupfers das Lyophilisat in 1 ml dest. H₂O suspendiert und über einen Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µmol, Pall GmbH) filtriert. Eine gelbliche, klare Lösung konnte dadurch gewonnen werden, die anschließend aufgereinigt wurde. Detaillierte Informationen der Parameter zur Aufreinigung sind in Kapitel 6.1.1.2 zu finden.

Ausbeute:	29 mg, (52 %) als farbloser Feststoff
Analytische Daten:	$M = 2452,7 \text{ g/mol}$, C ₁₀₅ H ₁₇₂ N ₂₇ O ₄₀
Retentionszeit (HPLC-MS):	0,91 min, Reinheit: 94 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 613,2 [M+4H]^{4+}$, $817,2 [M+3H]^{3+}$, $1225,2 [M+2H]^{2+}$, Mittelwert: 2448,6 g/mol

PEG-Mal-Thio-C(KKEEE)₃K-NH₂ (15)

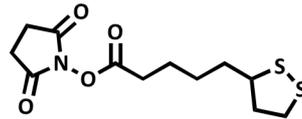
Peptid **(4)** (20 mg, 0,01 mmol) wurde in 1 ml PBS-Puffer (pH = 7) gelöst und mittels 1 N NaOH-Lösung erneut auf pH 7 eingestellt. Anschließend wurde die klare Lösung unter Argon inertisiert. MPeg-(5kDa)-ethyl-maleinimid (n=112) (52 mg, 0,01 mmol, Merck KGaA, Darmstadt) wurde in 500 µl PBS-Puffer gelöst und dem in 1 ml PBS-Puffer (pH= 7) vorgelösten Peptid hinzugegeben. Die Lösung wurde für 24 h unter Argon gerührt. Reaktionskontrolle erfolgte über HPLC und kombiniertem Lichtstreuendetektor (ELSD), wobei eine Verschiebung ins Polare im Vergleich zu dem PEG-Edukt beobachtet werden konnte. Außerdem konnte gleichzeitig eine Retentionszeitverschiebung des Peptids ins Unpolare detektiert werden. Eine massenspektrometrische Charakterisierung war aufgrund der großen molaren Masse des Produkts und der großen Anzahl an Fragmenten nicht möglich. Anschließend wurde die Lösung lyophilisiert und über präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute:	9 mg, (14 %) als farbloser Feststoff
Analytische Daten:	$M = 7277,1 \text{ g/mol}$, $C_{323}H_{616}N_{25}O_{150}$
Retentionszeit (HPLC-MS):	1,50 min, Reinheit: 94 % (220 nm)
ELSD:	1,56 min, Reinheit: 89 %

6.3 Wirkstoffmodifikationen

6.3.1 Liponsäure

Liponsäure-Succinimid-Aktivester (16)

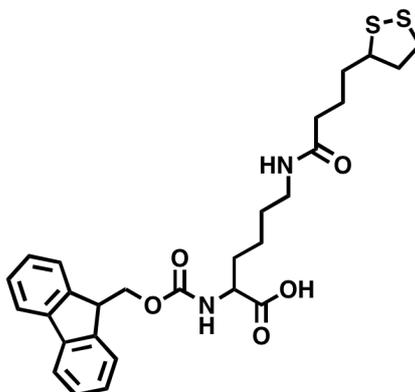


N-Hydroxysuccinimid (1,05 eq, 1150 mg, 10 mmol) und EDAC (1917 mg, 10 mmol) wurden mit α -Liponsäure (2022 mg, 9,8 mmol) in 50 ml DMF gelöst und bei Raumtemperatur für ca. 4 h gerührt. Danach wurde der Ansatz mit 60 ml Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wurde 3 x mit 60 ml dest. Wasser, 3 x mit 60 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 1 x mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die Ethylacetat-Phase wurde darauf über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockenen eingengt.

Ausbeute:	2,23 g, (74 %) als gelbes Öl
Analytische Daten:	$M = 303,4 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}_2$
Retentionszeit (HPLC-MS):	2,19 min, Reinheit: 95 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 304,0 \text{ [M+1H]}^{1+}$, $326,0 \text{ [M+Na]}^+$, $321,0 \text{ [M+H}_2\text{O]}^+$

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) $\delta = 11.39$ (s, 1H), 3.58 (dq, $J = 8.5, 6.4 \text{ Hz}$, 1H), 3.19 (ddd, $J = 10.9, 7.1, 5.3 \text{ Hz}$, 1H), 3.12 (dt, $J = 11.0, 6.9 \text{ Hz}$, 1H), 2.47 (dtd, $J = 13.1, 6.6, 5.4 \text{ Hz}$, 1H), 2.38 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H), 1.92 (dq, $J = 12.6, 6.9 \text{ Hz}$, 1H), 1.78 – 1.61 (m, 4H), 1.59 – 1.40 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, Chloroform-*d*) $\delta = 180.0, 56.3, 40.2, 38.5, 34.6, 33.9, 28.7, 24.4 \text{ ppm}$.

Fmoc-Lys_ε(LA)-OH (17)

Fmoc-Lys-OH (1,05 eq, 2650 mg, 7,2 mmol) wurde in 110 ml HEPES-Puffer (pH= 7,4) suspendiert und mit Liponsäureaktivester **16**, 2138 mg, 7,05 mmol, vorgelöst in 130 ml Aceton) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach ca. 3 h Reaktionszeit wurde die Lösung mittels 0,1 N NaOH-Lösung auf pH 7 eingestellt und bei Raumtemperatur für ca. 20 h gerührt. Danach wurde der Ansatz mit 0,1 N NaOH auf pH 9 eingestellt und 2 x mit ca. 30 ml EE gewaschen, anschließend mittels 1 N HCl auf pH 3 eingestellt und 3 x mit ca. 40 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und bis zur Trockene eingengt.

Ausbeute: 4,14 g, (103 %) als gelber Feststoff

Analytische Daten: $M = 556,7 \text{ g/mol}$, C₂₉H₃₆N₂O₅S₂

Retentionszeit (HPLC-MS): 2,39 min, Reinheit: 93 % (220 nm)

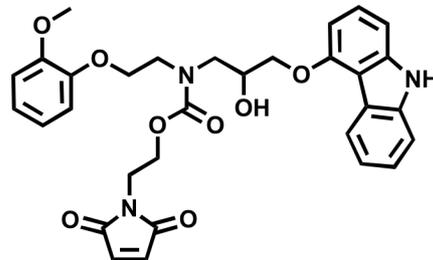
ESI-MS: $m/z = 557,2 [M+1H]^{1+}$, $558,2 [M+2H]^{1+}$, $559,2 [M+3H]^{1+}$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 12.51$ (s, 1H), 7.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.77 – 7.71 (m, 3H), 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.43 (td, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 2H), 7.34 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 2H), 4.32 – 4.20 (m, 3H), 3.94 (ddd, $J = 9.7, 8.1, 4.7$ Hz, 1H), 3.58 (dq, $J = 8.7, 6.2$ Hz, 1H), 3.22 – 2.98 (m, 4H), 2.39 (dp, $J = 12.4, 6.2, 5.8$ Hz, 1H), 2.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.85 (dp, $J = 13.4, 6.6$ Hz, 1H), 1.78 – 1.62 (m, 2H), 1.65 – 1.51 (m, 2H), 1.55 – 1.45 (m, 2H), 1.47 – 1.33 (m, 2H), 1.36 – 1.25 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 173.9, 171.7, 156.1, 143.8, 143.8, 140.7, 127.6, 127.0, 125.2, 125.2, 120.0, 120.0, 65.6, 56.0, 53.7, 46.6, 39.8, 38.1, 38.1, 35.2, 34.1, 30.4, 28.7, 28.3, 25.0, 23.0$ ppm.

6.3.2 Carvedilol

Carvedilol-Carbamat-Ethylmaleinimid (18)



Carvedilol (50 mg, 0,12 mmol) wurde in 5 ml getrocknetem DCM gelöst und unter Argon gerührt. Triethylamin (68,2 μ l, 0,49 mmol) wurden hinzugegeben, während die farblose Lösung mittels Eisbad auf 0 °C heruntergekühlt wurde. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur wurde die in 1 ml getrocknetem DCM vorgelöste Substanz **22** (50,1 mg, 0,25 mmol) langsam hinzu pipettiert, wobei sich die Lösung gelblich verfärbte. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde die Substanz säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt: 15 g Kieselgel-60, als Laufmittel dienen DCM/Methanol + 0,1 Vol% HOAc im Verhältnis 10:1.

Ausbeute: 65 mg, (92 %) als farbloser Feststoff

Analytische Daten: $M = 573,6 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8$

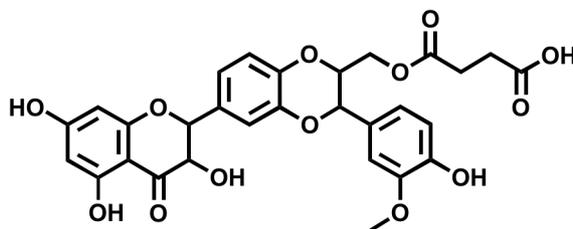
Retentionszeit (HPLC-MS): 1,73 min, Reinheit: 98 % (220 nm)

ESI-MS: $m/z = 574, 2[\text{M}+1\text{H}]^+, 596,2 [\text{M}+\text{Na}]^+$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) $\delta = 8.34$ (dd, $J = 17.5, 7.8 \text{ Hz}$, 2H), 8.12 (s, 2H), 7.48 – 7.31 (m, 6H), 7.28 – 7.15 (m, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.11 (t, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H), 7.00 – 6.81 (m, 7H), 6.77 – 6.64 (m, 3H), 6.37 (s, 1H), 4.59 – 4.48 (m, 2H), 4.51 – 4.33 (m, 2H), 4.36 – 4.18 (m, 7H), 4.18 (d, $J = 16.4 \text{ Hz}$, 2H), 3.96 – 3.80 (m, 7H), 3.84 – 3.59 (m, 5H), 2.09 (s, 1H) ppm.

6.3.3 Silybin

Silybinhemisuccinat (19)



Die Synthese wurde an die Vorschrift von Theodosiou *et al.* adaptiert [200]. Hierzu wurden Silybin (1,2 g, 2,5 mmol) und Bernsteinsäureanhydrid (0,63 g, 6,25 mmol) in 10 ml getrocknetem ACN suspendiert und bei 50 °C erhitzt. Zusätzlich wurde aktiviertes Molekularsieb (ca. 30 mg) hinzugegeben, um entstehende Wassermoleküle abzufangen. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur wurden 2 g des Enzyms 453 Lipase (Novozym) hinzugegeben und die Suspension 12 h unter Argon bei 50 °C gerührt. Reaktionskontrolle erfolgte über HPLC-MS, die nach 12 h eine quantitative Umsetzung des gewünschten Produkts bestätigte. Anschließend wurde die gelbe Suspension mittels Glasfritte filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung erfolgte über Flashchromatographie mittels Kieselgel-60, 175 g. Als Laufmittel dienten: A: ACN/H₂O/HOAc (10/88/2, v/v/v) und B: ACN/H₂O/HOAc (90/8/2, v/v/v), Flussrate: 60 ml/min. Ein Gradient von 0 % B auf 30 % B in 15 Minuten wurde angewandt, um nicht umgesetztes Edukt vom gewünschten Produkt erfolgreich zu trennen. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

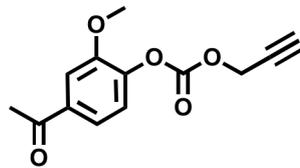
Ausbeute:	450 mg, (31 %) als hell-gelber Feststoff
Analytische Daten:	$M = 582,5 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$
Retentionszeit (HPLC-MS):	1,88 min, Reinheit: 84 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 605,0 \text{ [M+Na]}^+$, $600,0 \text{ [M+O]}^+$, $583,0 \text{ [M+1H]}^+$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 11.88$ (s, 1H), 7.12 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.06 – 6.99 (m, 3H), 6.89 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.95 – 5.86 (m, 2H), 5.80 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.61 (dd, $J = 11.1, 4.8$ Hz, 1H), 4.50 (dd, $J = 10.8, 4.3$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J = 12.3, 2.5$ Hz, 1H), 3.96 (dd, $J = 12.4, 4.7$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.59 – 2.45 (m, 5H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 197.6, 172.7, 166.8, 163.2, 162.4, 147.7, 147.2, 143.2, 130.5, 126.6, 121.3, 120.5, 116.6, 116.4, 115.4, 111.9, 100.4, 96.0, 95.0, 82.4, 75.7, 75.01, 71.6, 62.6, 55.6, 28.8, 21.0 ppm.

6.3.4 Apocynin

Apocynincarbonatethin (20)



Apocynin (332 mg, 2 mmol, Merck Millipore, Darmstadt) wurden in 5 ml getrocknetem Chloroform gelöst und mit 1 ml Pyridin (980 mg, 12,4 mmol) versetzt, wobei eine gelbe Verfärbung entsteht. Die Lösung wurde auf 0 °C mittels Eisbad runtergekühlt und Propargylchlorformiat der Firma Sigma Aldrich, St. Louis (240 μl , 2,4 mmol) langsam hinzu pipettiert. Die Lösung wurde bei RT am Rückfluss für ca. 2 h gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

Ausbeute: 550 mg, (111 %) als farbloser Feststoff

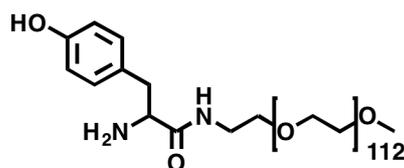
Analytische Daten: $M = 248,2$ g/mol, $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_5$

Retentionszeit (HPLC-MS): 2,59 min, Reinheit: 85 % (220 nm)

ESI-MS: $m/z = 249,4$ $[\text{M}+1\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ = 7.61 (s, 2H), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H), 7.29 – 7.21 (m, 4H), 4.85 (s, 3H), 3.92 (s, 9H), 1.19 (s, 1H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ = 196.7, 151.3, 136.2, 122.2, 121.8, 111.7, 76.2, 56.2, 56.1, 26.5 ppm.

H-D-Tyr-PEG (21)

Boc-D-Tyr(*t*Bu)-OH (37 mg, 0,11 mmol, Sigma Aldrich, St. Louis) wurden in 10 ml DCM gelöst und mit EDC (21 mg, 0,11 mmol) und DIEA (19 mg, 0,15 mmol) für 10 min voraktiviert. Anschließend wurde Methoxypolyethylenglycolamin (16 mg, 0,1 mmol Sigma Aldrich, St. Louis), vorgelöst in 2 ml DCM hinzugegeben und für 3 h bei RT unter Argon gerührt. Zur Analytik wurde neben der UV-Absorption ein Lichtstreuendetektor (ELSD) verwendet. Zur Vorreinigung wurde die Lösung zunächst auf 20 ml mit DCM aufgefüllt, 3 x mit 0,1 N HCl-Lösung, 3 x mit 0,1 N NaOH und 1 x mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Nach der Trocknung der DCM-Phase, wurde der farblose Feststoff in 1,5 ml H₂O/ACN 1:1 gelöst und aufgereinigt. Als stationäre Phase wurde eine Waters XBridge BEH130 PREP C18 (5 µm, 19 × 150 mm) Säule verwendet. Für die Trennung wurde ein Fluss von 15 ml/min eingestellt, wobei 0,1 % TFA in Wasser und Acetonitril als Lösungsmittel dienten. Bei einem Gradienten von 0 auf 100 % ACN in 20 min konnten zwei Peaks voneinander getrennt werden (*R_t*: Peak 1: 9 min; Peak 2: 10 min). Die vereinigten Fraktionen wurden über Nacht lyophilisiert. Bei einem Vergleich der Retentionszeiten entspricht Fraktion 1 dem PEG-Edukt. Fraktion 2 hingegen zeigte eine Retentionszeitverschiebung ins Unpolare. Zur Abspaltung der Schutzgruppen wurde Fraktion 2 in 10 ml DCM/TFA 1:1 gelöst und bei RT für 2 h gerührt. Anhand einer HPLC-Analytik konnte eine erneute Retentionszeitverschiebung in Polare detektiert werden, was für eine erfolgreiche Abspaltung der Schutzgruppen sprach. Die Retentionszeit des Lichtstreuendetektors bestätigte diese Annahme. Die Lösung wurde erneut lyophilisiert und mittels ¹H NMR untersucht

Ausbeute: 30 mg, (92 %) als farbloser kristalliner Feststoff

Analytische Daten: *M* = 5169,1 g/mol, C₂₃₆H₄₆₆N₂O₁₁₅

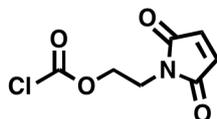
Retentionszeit (HPLC-MS): 1,67 min, Reinheit: 100 % (220 nm)

ELSD: 1,7 min, Reinheit: 100 %

¹H NMR (500 MHz, Deuterium Oxide) δ = 7.31 – 6.98 (m, 2H), 6.90 – 6.85 (m, 2H), 3.68 (s, 462H) pp

6.4 Linker

Chlorameisensäure-2-maleinimidoethylester (22)



Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Beyer *et al.* [244]. 2-Hydroxyethylmaleinimid (500 mg, 3,54 mmol) wurden in 10 ml getrocknetem DCM gelöst, mit Triphosgen (356 mg, 1,20 mmol) versetzt und am Rückfluss und Argon-Schutzgasatmosphäre gerührt. Nach der Zugabe von Triethylamin (166 μ l, 1,20 mmol) wurde der Ansatz 72 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt: Kieselgel-60, 70 g, als Laufmittel dienten Heptan/THF 2:1.

Ausbeute: 276 mg, (38 %) als farbloser Feststoff

Analytische Daten: $M = 203,6$ g/mol, $C_7H_6ClNO_4$

Retentionszeit (HPLC-MS): 1,24 min, Reinheit: 85 % (220 nm)

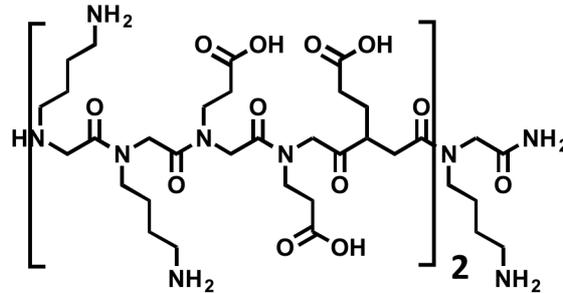
ESI-MS: $m/z = 204,0$ $[M+1H]^{1+}$

1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) $\delta = 6.75$ (s, 2H), 4.51 – 4.40 (m, 2H), 3.89 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) $\delta = 170,0$, 151,3, 134,3, 68,0, 36,2 ppm.

6.5 Peptoidchemie

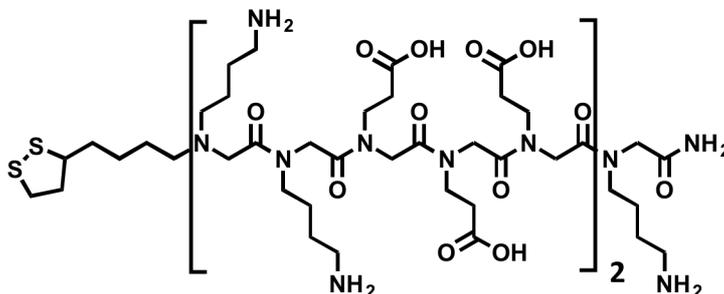
NTyr(NLys-NLys-NGlu-NGlu-NGlu)₂NLys-NH₂ (23)



Das Peptoid *NTyr(NLys-NLys-NGlu-NGlu-NGlu)₂NLys-NH₂* wurde wie in Kapitel 6.1.2 detailliert erläutert automatisiert an einem Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems GmbH (Darmstadt), Modell 433A synthetisiert. Als Amine wurden *N*-Boc-1,4-Butandiamin (Sigma Aldrich, St. Louis) und beta-Alanin-*t*-butylester (als freie Base, Sigma Aldrich, St. Louis) eingesetzt. Die Bromessigsäure und das Kopplungsreagenz *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) wurden beide bei Merck Millipore, Darmstadt gekauft. Die Abspaltung sowie Aufreinigung und Analytik verhielten sich analog zur Peptidaufbereitung (siehe auch Kapitel 6.1.1.).

Ausbeute:	20 mg, (28 %) als farbloser Feststoff
Analytische Daten:	$M = 1432,6 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{60}\text{H}_{105}\text{N}_{17}\text{O}_{23}$
Retentionszeit (HPLC-MS):	0,41 min, Reinheit: 95 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 359,1 [M+4H]^{4+}$, $478,2 [M+3H]^{3+}$, $716,7 [M+2H]^{2+}$, Mittelwert: 1432,1 g/mol

LA-(NLys-NLys-NGlu-NGlu-NGlu)₂NLys-NH₂ (24)



Die Kopplung der Liponsäure an das beladene Harz mit **(23)** erfolgte mittels Acetylierung über DIC. Dazu wurde α -Liponsäure (20 eq, 41,3 mg, 0,20 mmol, Merck Millipore, Darmstadt) 1,2 M in DMF und DIC (25,2 mg, 0,20 mmol) mit dem Peptoidharz suspendiert und für 3 h bei RT geschüttelt. Nach 5 Waschstritten mit jeweils 5 ml DMF und 1 x mit DCM wurde das Peptoid vom Harz abgespalten. Dazu wurde folgender Abspaltungscocktail verwendet: TFA/Anisol/Thioanisol (90/2/8). Das abgespaltene Konjugat wurde in H₂O/ACN 1:2 gelöst und aufgereinigt. Detaillierte Informationen der Parameter zur Aufreinigung sind in Kapitel 6.1.1.2 zu finden.

Ausbeute:	5 mg, (31 %) als farbloser Feststoff
Analytische Daten:	$M = 1621 \text{ g/mol}$, C ₆₈ H ₁₁₇ N ₁₇ O ₂₄ S ₂
Retentionszeit (HPLC-MS):	0,99 min, Reinheit: 85 % (220 nm)
ESI-MS:	$m/z = 406,2 [M+4H]^{4+}$, $541,2 [M+3H]^{3+}$, $810,9 [M+2H]^{2+}$, Mittelwert: 1620,1 g/mol

Literaturverzeichnis

1. Brück, K., et al. Ckd prevalence varies across the european general population. *Journal of the American Society of Nephrology* **27**, 2135-2147 (2016).
2. Perico, N. and Remuzzi, G. Chronic kidney disease: A research and public health priority. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **3**, 19-26 (2012).
3. Ryan, T.P., et al. Chronic kidney disease prevalence and rate of diagnosis. *The American Journal of Medicine* **120**, 981-986 (2007).
4. Schoolwerth, A.C., et al. Chronic kidney disease: A public health problem that needs a public health action plan. *Preventing Chronic Disease* **3**, A57 (2006).
5. Cignarelli, M. and Lamacchia, O. Obesity and kidney disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **17**, 757-762 (2007).
6. Koopman, R.J., et al. Changes in age at diagnosis of type 2 diabetes mellitus in the united states, 1988 to 2000. *Annals of Family Medicine* **3**, 60-63 (2005).
7. Rubenstein, A.Y. Obesity: A modern epidemic. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **116**, 103-113 (2005).
8. Levey, A.S. and J. Coresh. Chronic kidney disease. *The Lancet* **379**, 165-180 (2012).
9. Chin, M.P., et al. Risk factors for heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 4 chronic kidney disease treated with bardoxolone methyl. *Journal of Cardiac Failure* **20**, 953-958 (2014).
10. de Zeeuw, D., et al. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *New England Journal of Medicine* **369**, 2492-2503 (2013).
11. Cheng, J., et al. Efficacy and safety of paricalcitol therapy for chronic kidney disease: A meta-analysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **7**, 391-400 (2012).
12. Perez-Gomez, M.V., et al. Horizon 2020 in diabetic kidney disease: The clinical trial pipeline for add-on therapies on top of renin angiotensin system blockade. *Journal of Clinical Medicine* **4**, 1325-1347 (2015).
13. Mann, J.F.E., et al. Avosentan for overt diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **21**, 527-535 (2010).
14. Braun, Y.E., et al. Low-dose rapamycin (sirolimus) effects in autosomal dominant polycystic kidney disease: An open-label randomized controlled pilot study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **9**, 881-888 (2014).

15. Walz, G., et al. Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *New England Journal of Medicine* **363**, 830-840 (2010).
16. Torchilin, V.P. Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **11, Supplement 2**, S81-S91 (2000).
17. Molema, G. Drug targeting: Basic concepts and novel advances. *Drug targeting*. Wiley-VCH Verlag GmbH.1-22. (2001).
18. Akizawa, Y., Uehara, T. and Arano, Y. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1319-1328 (2008).
19. Haas, M., et al. Specific drug delivery to the kidney. *Cardiovascular Drugs and Therapy* **16**, 489-496 (2002).
20. Stormark, T.A., et al. Three-dimensional ultrasonography can detect the modulation of kidney volume in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Ultrasound in Medicine & Biology* **33**, 1882-1888 (2007).
21. Zhou, P., Sun, X. and Zhang, Z. Kidney-targeted drug delivery systems. *Acta Pharmaceutica Sinica. B* **4**, 37-42 (2014).
22. Franssen, E.J.F., et al. Drug and gene targeting with (glyco)-proteins and other glycoconjugates drug targeting to the kidney with low-molecular-weight proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* **14**, 67-88 (1994).
23. Haas, M., et al. Drug-targeting to the kidney: Renal delivery and degradation of a naproxen-lysozyme conjugate in vivo. *Kidney International* **52**, 1693-1699 (1997).
24. Kok, R.J., et al. Specific delivery of captopril to the kidney with the prodrug captopril-lysozyme. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**, 281-285 (1999).
25. Windt, H.A., et al. Renal targeting of captopril using captopril-lysozyme conjugate enhances its antiproteinuric effect in adriamycin-induced nephrosis. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **5**, 197-202 (2004).
26. Haverdings, R.F.G., et al. Potentials and limitations of the low-molecular-weight protein lysozyme as a carrier for renal drug targeting. *Renal Failure* **23**, 397-409 (2001).
27. Baker, M.P., et al. Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self Nonself* **1**, 314-322 (2010).
28. Laakkonen, P. and Vuorinen, K. Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integrative Biology* **2**, 326-337 (2010).
29. Svensen, N., Walton, J.G.A. and Bradley M. Peptides for cell-selective drug delivery. *Trends in Pharmacological Sciences* **33**, 186-192 (2012).
30. Ladner, R.C., et al. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discovery Today* **9**, 525-529 (2004).
31. Janzer, M. Nierenspezifische Therapie- und Schutzkonzepte: Synthese und Optimierung neuartiger Wirkstoff-Transportsysteme. *Hochschule Fulda, Fulda*, (2013).

32. Geng, Q., et al. Peptide–drug conjugate linked via a disulfide bond for kidney targeted drug delivery. *Bioconjugate Chemistry* **23**, 1200-1210 (2012).
33. Wischnjow, A., et al. Renal targeting: Peptide-based drug delivery to proximal tubule cells. *Bioconjugate Chemistry* **27**, 1050-1057 (2016).
34. Sarko, D. Polylysine derivatives as a novel targeting tool for the kidney-specific drug deliver. *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*, (2011).
35. Wischnjow, A. Synthese und pharmakokinetische Untersuchung Peptid-basierter WirkstoffCarrier zur Nierenprotektion. *Technische Universität Darmstadt, Darmstadt*, (2013).
36. Akilesh, S., et al. Podocytes use fcrn to clear igg from the glomerular basement membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 967-972 (2008).
37. Levidiotis, V. and Power, D.A. New insights into the molecular biology of the glomerular filtration barrier and associated disease. *Nephrology* **10**, 157-166 (2005).
38. Batsford, S.R., Rohrbach, R. and Vogt, A. Size restriction in the glomerular capillary wall: Importance of lamina densa. *Kidney International* **31**, 710-717 (1987).
39. Lewis, E.J. and Xu, X. Abnormal glomerular permeability characteristics in diabetic nephropathy. *Implications for the therapeutic use of low–molecular weight heparin* **31**, S202-S207 (2008).
40. Pavenstädt, H. Roles of the podocyte in glomerular function. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **278**, F173-F179 (2000).
41. Reiser, J., et al. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *Journal of the American Society of Nephrology* **11**, 1-8 (2000).
42. Dolman, M.E.M., et al. Drug targeting to the kidney: Advances in the active targeting of therapeutics to proximal tubular cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 1344-1357 (2010).
43. Bearer, E.L. and Orci, L. Endothelial fenestral diaphragms: A quick-freeze, deep-etch study. *The Journal of Cell Biology* **100**, 418-428 (1985).
44. Nico, B., Crivellato, E. and Ribatti, D. The importance of electron microscopy in the study of capillary endothelial cells: An historical review. *Endothelium* **14**, 257-264 (2007).
45. Satchell, S.C. and Braet, F. Glomerular endothelial cell fenestrations: An integral component of the glomerular filtration barrier. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, (2009).
46. Zeisberg, M. and Kalluri, R. Physiology of the renal interstitium. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **10**, 1831-1840 (2015).
47. Christensen, E.I. and Birn, H. Megalin and cubilin: Synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **280**, F562-F573 (2001).
48. Christensen, E.I., Verroust, P.J. and Nielsen, R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **458**, 1039-1048 (2009).

49. Moestrup, S.K. and Verroust, P.J. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annual Review of Nutrition* **21**, 407-428 (2001).
50. Saito, A., et al. Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, 403272 (2010).
51. Norbert Sewald, H.-D.J. Peptides: Chemistry and biology. *Wiley-VCH* **2**, (2009).
52. Sheehan, J.C. and Hess, G.P. A new method of forming peptide bonds. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1067-1068 (1955).
53. Gisin, B.F. and Merrifield, R.B. Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. Side reaction in solid-phase peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **94**, 3102-3106 (1972).
54. Kurtoglu, Y.E., et al. Poly(amidoamine) dendrimer-drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery. *Biomaterials* **30**, 2112-2121 (2009).
55. Bohley, P. and Seglen, P.O. Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* **48**, 151-157 (1992).
56. Qiu, L.Y. and Bae, Y.H. Polymer architecture and drug delivery. *Pharmaceutical Research* **23**, 1-30 (2006).
57. Sogorb, M.A. and Vilanova, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters* **128**, 215-228 (2002).
58. Huang, H., et al. Adrenomedullin impairs the profibrotic effects of transforming growth factor- β 1 through recruiting smad6 protein in human renal tubular cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* **15**, 117-124 (2005).
59. West, K.R. and Otto, S. Reversible covalent chemistry in drug delivery. *Current Drug Discovery Technologies* **2**, 123-160 (2005).
60. Saito, G., Swanson, J.A. and Lee, K.-D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: Role and site of cellular reducing activities. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 199-215 (2003).
61. Dolman, M.E.M., et al. Renal targeting of kinase inhibitors. *International Journal of Pharmaceutics* **364**, 249-257 (2008).
62. Park, J.W., et al. Rho kinase inhibition by fasudil attenuates cyclosporine-induced kidney injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **338**, 271-279 (2011).
63. Prakash, J., et al. Intracellular delivery of the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor sb202190 [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1h-imidazole] in renal tubular cells: A novel strategy to treat renal fibrosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **319**, 8-19 (2006).
64. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless. Click-Chemie: Diverse chemische Funktionalität mit einer handvoll guter Reaktionen. *Angewandte Chemie* **113**, 2056-2075 (2001).

65. Tang, W. and Becker, M.L. "Click" reactions: A versatile toolbox for the synthesis of peptide-conjugates. *Chemical Society Reviews* **43**, 7013-7039 (2014).
66. Hein, C.D., Liu, X.-M. and Wang, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharmaceutical research* **25**, 2216-2230 (2008).
67. Huisgen, R. Kinetics and mechanism of 1,3-dipolar cycloadditions. *Angewandte Chemie International Edition* **2**, 633-645 (1963).
68. Himo, F., et al. Copper(i)-catalyzed synthesis of azoles. Dft study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 210-216 (2005).
69. Li, H., Aneja, R. and Chaiké, I.. Click chemistry in peptide-based drug design. *Molecules* **18**, 9797-9817 (2013).
70. Bock, V.D., et al. 1,2,3-triazoles as peptide bond isosteres: Synthesis and biological evaluation of cyclotetrapeptide mimics. *Organic & Biomolecular Chemistry* **5**, 971-975 (2007).
71. Valverde, I.E., et al. 1,2,3-triazoles as amide bond mimics: Triazole scan yields protease-resistant peptidomimetics for tumor targeting. *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 8957-8960 (2013).
72. Williams, G.M., et al. Replacement of the cysa7-cysb7 disulfide bond with a 1,2,3-triazole linker causes unfolding in insulin glargine. *Organic & Biomolecular Chemistry* **13**, 4059-4063 (2015).
73. Miller, N., Williams, G.M. and Brimble, M.A. Synthesis of fish antifreeze neoglycopeptides using microwave-assisted "click chemistry". *Organic Letters* **11**, 2409-2412 (2009).
74. Rijkers, D.T.S., et al. Efficient microwave-assisted synthesis of multivalent dendrimeric peptides using cycloaddition reaction (click) chemistry. *Chemical Communications* **36**, 4581-4583 (2005).
75. Yim, C.-B., et al. Versatile conjugation of octreotide to dendrimers by cycloaddition ("click") chemistry to yield high-affinity multivalent cyclic peptide dendrimers. *Bioconjugate Chemistry* **20**, 1323-1331 (2009).
76. Hong, V., et al. Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 9879-9883 (2009).
77. Soriano del Amo, D., et al. Biocompatible copper(i) catalysts for in vivo imaging of glycans. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 16893-16899 (2010).
78. Besanceney-Webler, C., et al. Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: A comparative study. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 8051-8056 (2011).
79. Cintas, P., et al. Alkyne-azide click reaction catalyzed by metallic copper under ultrasound. *Nat. Protocols* **5**, 607-616 (2010).
80. Hong, V., et al. Electrochemically protected copper(i)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *ChemBioChem* **9**, 1481-1486 (2008).

81. Baskin, J.M., et al. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 16793-16797 (2007).
82. Codelli, J.A., et al. Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 11486-11493 (2008).
83. Dehnert, K.W., et al. Imaging the sialome during zebrafish development with copper-free click chemistry. *ChemBiochem* **13**, 353-357 (2012).
84. Lutolf, M.P., et al. Systematic modulation of michael-type reactivity of thiols through the use of charged amino acids. *Bioconjugate Chemistry* **12**, 1051-1056 (2001).
85. Lutolf, M.P., et al. Cell-responsive synthetic hydrogels. *Advanced Materials* **15**, 888-892 (2003).
86. Brewer, C.F. and Riehm, J.P. Evidence for possible nonspecific reactions between n-ethylmaleimide and proteins. *Analytical Biochemistry* **18**, 248-255 (1967).
87. Smyth, D., Blumenfeld, O. and Konigsberg, W. Reactions of n-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochemical Journal* **91**, 589-595 (1964).
88. Hermanson, G.T. Chapter 2 - the chemistry of reactive groups. *Bioconjugate techniques (second edition)*. Academic Press: New York.169-212. (2008).
89. Baldwin, A.D. and Kiick, K.L. Tunable degradation of maleimide–thiol adducts in reducing environments. *Bioconjugate Chemistry* **22**, 1946-1953 (2011).
90. Fontaine, S.D., et al. Long-term stabilization of maleimide–thiol conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **26**, 145-152 (2015).
91. Lyon, R.P., et al. Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody–drug conjugates. *Nat Biotech* **32**, 1059-1062 (2014).
92. Wang, D. and Lippard, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 307-320 (2005).
93. Voigt, W., Dietrich, A. and Schmoll, H.-J. Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. *Pharmazie in unserer Zeit* **35**, 134-143 (2006).
94. Jamieson, E.R. and Lippard, S.J. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chemical Reviews* **99**, 2467-2498 (1999).
95. Dasari, S. and Tchounwou, P.B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* **0**, 364-378 (2014).
96. O'Dwyer, P.J., Stevenson, J.P. and Johnson, S.W. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs* **59**, 19-27 (2000).
97. Kuhlmann, M.K., Burkhardt, G. and Köhler, H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrology Dialysis Transplantation* **12**, 2478-2480 (1997).

-
98. Akcay, A., et al. Update on the diagnosis and management of acute kidney injury. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* **3**, 129-140 (2010).
 99. Ozkok, A. and Edelstein, C.L. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *BioMed Research International* **2014**, 967826 (2014).
 100. Latcha, S., et al. Long-term renal outcomes after cisplatin treatment. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **11** (2016).
 101. Yao, X., et al. Cisplatin nephrotoxicity: A review. *The American Journal of the Medical Sciences* **334**, 115-124 (2007).
 102. Skinner, R., et al. Cisplatin dose rate as a risk factor for nephrotoxicity in children. *British Journal of Cancer* **77**, 1677-1682 (1998).
 103. Finkel, M., et al. Cisplatin nephrotoxicity in oncology therapeutics: Retrospective review of patients treated between 2005 and 2012. *Pediatric Nephrology* **29**, 2421-2424 (2014).
 104. Arany, I. and Safirstein, R.L. Cisplatin nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology* **23**, 460-464 (2003).
 105. Kröning, R., K.A. Lichtenstein, and Nagami, T.G. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **45**, 43-49 (2000).
 106. Gately, D.P. and Howell, S.B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *British Journal of Cancer* **67**, 1171-1176 (1993).
 107. Ciarimboli, G., et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *The American Journal of Pathology* **167**, 1477-1484 (2005).
 108. Ishida, S., et al. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14298-14302 (2002).
 109. Karasawa, T. and Steyger, P.S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicology Letters* **237**, 219-227 (2015).
 110. Townsend, D.M., et al. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 1-10 (2003).
 111. Zhang, L. and Hanigan, M.H. Role of cysteine s-conjugate β -lyase in the metabolism of cisplatin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **306**, 988-994 (2003).
 112. Hanigan, M.H., et al. Γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice are resistant to the nephrotoxic effects of cisplatin. *The American Journal of Pathology* **159**, 1889-1894 (2001).
 113. dos Santos, N.A.G., et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Archives of Toxicology* **86**, 1233-1250 (2012).
 114. Pabla, N.D., Dong, Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International* **73**, 994-1007 (2008).

115. Ramesh, G. and Reeves, W.B. Tnfr2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **285**, F610-F618 (2003).
116. Kazuhiko Tsuruya, et al. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney International* **63**, 72-82 (2003).
117. Hansen, S.W., et al. Long-term effects on renal function and blood pressure of treatment with cisplatin, vinblastine, and bleomycin in patients with germ cell cancer. *Journal of Clinical Oncology* **6**, 1728-1731 (1988).
118. Jordan, K., Behlendorf, T. und Schmoll, H-J. Nephro- und Neurotoxizität sicher beherrschen, adäquate Supportivtherapie beim Einsatz platinhaltiger Derivate. *Im Focus Onkologie* **6**, 55-58 (2007).
119. Benoehr, P., et al. Nephroprotection by theophylline in patients with cisplatin chemotherapy: A randomized, single-blinded, placebo-controlled trial. *Journal of the American Society of Nephrology* **16**, 452-458 (2005).
120. Block, K.I. and Gyllenhaal, C. Commentary: The pharmacological antioxidant amifostine—implications of recent research for integrative cancer care. *Integrative Cancer Therapies* **4**, 329-351 (2005).
121. Hensley, M.L., et al. American society of clinical oncology 2008 clinical practice guideline update: Use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 127-145 (2009).
122. Heidenreich, A., Marx, J.F. and Peters, J.H. Amifostine as protective agent in cisplatin-based chemotherapy of advanced bladder cancer. *Der Urologe A* **38**, 586-591 (1999).
123. Hartmann, J.T., et al. A randomized trial comparing the nephrotoxicity of cisplatin/ifosfamide-based combination chemotherapy with or without amifostine in patients with solid tumors. *Investigational New Drugs* **18**, 281-289 (2000).
124. Koukourakis, M.I. Amifostine: Is there evidence of tumor protection? *Seminars in Oncology* **30, Supplement 18**, 18-30 (2003).
125. McChesney, S.L., et al. Influence of wr 2721 on radiation response of canine soft tissue sarcomas. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* **12**, 1957-1963 (1986).
126. Goraca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E. and Skibska, B. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmaceutical Reports* **63**, 849-858 (2011).
127. Navari-Izzo, F., Quartacci, M.F. and Sgherri, C. Lipoic acid: A unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 463-470 (2002).
128. Greenamyre, J.T., Garcia-Osuna, M. and Greene, J.G. The endogenous cofactors, thioctic acid and dihydrolipoic acid, are neuroprotective against nmda and malonic acid lesions of striatum. *Neuroscience Letters* **171**, 17-20 (1994).

129. Haak, E., et al. Effects of alpha-lipoic acid on microcirculation in patients with peripheral diabetic neuropathy. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **108**, 168-174 (2000).
130. Nagamatsu, M., et al. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* **18**, 1160-1167 (1995).
131. Sumathi, R., G. Baskaran, and P. Varalakshmi. Relationship between glutathione and dl α-lipoic acid against cadmium-induced hepatotoxicity. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* **49**, 39-48 (1996).
132. Somani, S.M., et al. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: Antioxidant defense system. *Pharmacology & Toxicology* **86**, 234-241 (2000).
133. Kang, K.P., et al. Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation. *Nephrology Dialysis Transplantation* **24**, 3012-3020 (2009).
134. Bae, E.H., et al. A-lipoic acid prevents cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* **24**, 2692-2700 (2009).
135. El-Beshbishy, H.A., et al. Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. *European Journal of Pharmacology* **668**, 278-284 (2011).
136. Lee, Y.M., et al. Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced tubulointerstitial injuries through inhibition of mitochondrial bax translocation in rats. *Nephron Experimental Nephrology* **113**, 104-112 (2009).
137. Hussein A., Shouman, A.A., Sharawy S. Ameliorating effect of dl-alpha-lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discovery & Therapeutics* **6**, 147-156 (2012).
138. Reina, M. and Martínez, A. Silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans as free radical scavengers. *The Journal of Physical Chemistry* **119**, 11597-11606 (2015).
139. Trappoliere, M., et al. Silybin, a component of silymarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology* **50**, 1102-1111 (2009).
140. Ferenci, P., et al. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *Journal of Hepatology* **9**, 105-113 (1989).
141. Saller, R., Meier, S. and Brignoli, R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* **61**, 2035-2063 (2001).
142. Bartholomaeus, A.R., Bolton, R. and Ahokas, J.T. Inhibition of rat liver cytosolic glutathione s-transferase by silybin. *Xenobiotica* **24**, 17-24 (1994).
143. Campos, R., et al. Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta Medica* **55**, 417-419 (1989).

144. Gaedeke, J., et al. Cisplatin nephrotoxicity and protection by silibinin. *Nephrology Dialysis Transplantation* **11**, 55-62 (1996).
145. Karimi, G., Ramezani, M. and Tahoonian, Z. Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2**, 383-386 (2005).
146. Ninsontia, C., et al. Silymarin selectively protects human renal cells from cisplatin-induced cell death. *Pharmaceutical Biology* **49**, 1082-1090 (2011).
147. Prabu, S.M. and Muthumani, M. Silibinin ameliorates arsenic induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Molecular Biology Reports* **39**, 11201-11216 (2012).
148. Sonnenbichler, J., et al. Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle silybum marianum on kidney cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **290**, 1375-1383 (1999).
149. Abdelmeguid, N.C.H.Z. Protective effect of silymarin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pakistan Journal of Nutrition* **2010**, 642-636 (2010).
150. Bokemeyer, C., et al. Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity. *British Journal of Cancer* **74**, 2036-2041 (1996).
151. Momeni, A., et al. Effect of silymarin in the prevention of cisplatin nephrotoxicity, a clinical trial study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **9**, 11-13 (2015).
152. Giacomelli, S., et al. Silybin and its bioavailable phospholipid complex (idb 1016) potentiate in vitro and in vivo the activity of cisplatin. *Life Sciences* **70**, 1447-1459 (2002).
153. Feuerstein, G.Z., Ruffolo, R.R. and Shusterman, N.H. Carvedilol update iv: Prevention of oxidative stress, cardiac remodeling and progression of congestive heart failure. *Prous Science* **34**, **Supplemental B** (1998).
154. Ruffolo, R.R. and Feuerstein, G.Z. Pharmacology of carvedilol: Rationale for use in hypertension, coronary artery disease, and congestive heart failure. *Cardiovascular Drugs and Therapy* **11**, 247-256 (1997).
155. Ruffolo, R.R. and Feuerstein, G.Z. Carvedilol case history: The discovery and development of the first β -blocker for the treatment of congestive heart failure. *Expert Opinion on Drug Discovery* **1**, 85-89 (2006).
156. Yue, T.L., et al. Carvedilol, a new antihypertensive drug with unique antioxidant activity: Potential role in cerebroprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences* **738**, 230-242 (1994).
157. Dandona, P., Ghanim, H. and Brooks, D.P. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. *Journal of Hypertension* **25**, 731-741 (2007).
158. Noguchi, N., Nishino, K. and Niki., E. Antioxidant action of the antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* **59**, 1069-1076 (2000).

-
159. Yue, T.L., et al. Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **263**, 92-98 (1992).
160. Carvalho Rodrigues, M.A., et al. Carvedilol protects against apoptotic cell death induced by cisplatin in renal tubular epithelial cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **75**, 981-990 (2012).
161. Carvalho Rodrigues, M.A., et al. Carvedilol protects against the renal mitochondrial toxicity induced by cisplatin in rats. *Mitochondrion* **10**, 46-53 (2010).
162. Carvalho Rodrigues, M.A., et al. Carvedilol protects the kidneys of tumor-bearing mice without impairing the biodistribution or the genotoxicity of cisplatin. *Chemico-Biological Interactions* **245**, 59-65 (2016).
163. Carvalho Rodrigues, M.A., et al. Carvedilol efficiently protects kidneys without affecting the antitumor efficacy of cisplatin in mice. *Chemico-Biological Interactions* **206**, 90-99 (2013).
164. Rodrigues, M.A.C., et al. Carvedilol protects against cisplatin-induced oxidative stress, redox state unbalance and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Chemico-Biological Interactions* **189**, 45-51 (2011).
165. Santos, N.A.G., et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Archives of Toxicology* **81**, 495-504 (2007).
166. Gamal el-Din, Abdullah, A.A.-B. Carvedilol, a beta adrenoceptor blocker with antioxidative potential, attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Applied Sciences Research* **2**, 331-335 (2006).
167. Santos, N.A.G., et al. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **61**, 145-155 (2007).
168. Chan, E.C., et al. Adventitial application of the nadph oxidase inhibitor apocynin in vivo reduces neointima formation and endothelial dysfunction in rabbits. *Cardiovascular Research* **75**, 710-718 (2007).
169. Gracia-Sancho, J., et al. Evidence against a role for nadph oxidase modulating hepatic vascular tone in cirrhosis. *Gastroenterology* **133**, 959-966 (2007).
170. Stolk, J., et al. Characteristics of the inhibition of nadph oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **11**, 95-102 (1994).
171. Pacher, P., Beckman, J.S. and Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews* **87**, 315-424 (2007).
172. Chirino, Y.I., et al. Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology* **245**, 18-23 (2008).

173. Biswas, S.K., et al. Which comes first: Renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free Radical Research* **41**, 216-224 (2007).
174. Ding, H., et al. Endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic apoe-deficient mouse. *British Journal of Pharmacology* **146**, 1110-1118 (2005).
175. Wang, Y., et al. Pharmacological inhibition of nadph oxidase protects against cisplatin induced nephrotoxicity in mice by two step mechanism. *Food and Chemical Toxicology* **83**, 251-260 (2015).
176. World Health Organization. Principles and methods for assessing autoimmunity associated with exposure to chemicals. Environmental Health Criteria, *WHO Library Cataloguing* **236** (2006).
177. de Jong, M., et al. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of 111in-dtpa-octreotide. *Journal of Nuclear Medicine* **46**, 1696-1700 (2005).
178. Harris, J.M. and Chess, R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**, 214-221 (2003).
179. Jevšvar, S., Kunstelj, M. and Porekar, V.G. Pegylation of therapeutic proteins. *Biotechnology Journal* **5**, 113-128 (2010).
180. Kölmel, D.K., et al. Cell-penetrating peptoids: Introduction of novel cationic side chains. *European Journal of Medicinal Chemistry* **79**, 231-243 (2014).
181. Burkoth, T.S., et al. Toward the synthesis of artificial proteins: The discovery of an amphiphilic helical peptoid assembly. *Chemistry & Biology* **9**, 647-654 (2002).
182. Huang, K., et al. A threaded loop conformation adopted by a family of peptoid nonamers. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 1733-1738 (2006).
183. Seo, J., et al. In vivo biodistribution and small animal pet of (64)cu labeled antimicrobial peptoids. *Bioconjugate chemistry* **23**, 1069-1079 (2012).
184. Biewenga, G.P., Haenen, G.R.M.M. and Bast, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology: The Vascular System* **29**, 315-331 (1997).
185. Koike, M. and Reed, L.J. A-keto acid dehydrogenation complexes: li. The role of protein-bound lipoic acid and flavin adenine dinucleotide. *Journal of Biological Chemistry* **235**, 1931-1938 (1960).
186. Uchida, R., et al. Enantioselective pharmacokinetics of α -lipoic acid in rats. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 22781-22794 (2015).
187. Bustamante, J., et al. A-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radical Biology and Medicine* **24**, 1023-1039 (1998).
188. Gregus, Z., et al. Effect of lipoic acid on biliary excretion of glutathione and metals. *Toxicology and Applied Pharmacology* **114**, 88-96 (1992).
189. Cao, G., et al. Carvedilol protects the peritubular capillaries and kidney structure in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Cardiology* **181**, 415-416 (2015).

190. Yonekura, Y., et al. Anti-oxidative effect of the β -blocker carvedilol on diabetic nephropathy in non-obese type 2 diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **42**, 972-978 (2015).
191. Parlaktas, B.S., et al. The effects of carvedilol on ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *International brazilian journal of urology* **40**, 109-117 (2014).
192. Singh, D., Chander, V. and Chopra, K. Carvedilol attenuates ischemia–reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **18**, 627-634 (2004).
193. Perrin, D.D., Dempsey, B. and Serjeant, E.P. Molecular factors that modify pk a values. in *Pk a prediction for organic acids and bases*. Springer Netherlands: Dordrecht. 12-20. (1981).
194. Hansen, K.T., Faarup, P. and Bundgaard, H. Carbamate ester prodrugs of dopaminergic compounds: Synthesis, stability, and bioconversion. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **80**, 793-798 (1991).
195. Morgan, T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of carvedilol. *Clinical Pharmacokinetics* **26**, 335-346 (1994).
196. Neugebauer, G., et al. Pharmacokinetics and disposition of carvedilol in humans. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **10**, S85-S88 (1987).
197. Fujimaki, M., Murakoshi, Y. and Hokusui, H. Assay and disposition of carvedilol enantiomers in humans and monkeys: Evidence of stereoselective presystemic metabolism. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **79**, 568-572 (1990).
198. Lee, J.I., Narayan, M. and Barrett, J.S. Analysis and comparison of active constituents in commercial standardized silymarin extracts by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **845**, 95-103 (2007).
199. Faulstich, H., Jahn, W. and Wieland, T. Silybin inhibition of amatoxin uptake in the perfused rat liver. *Arzneimittel-Forschung* **30**, 452-454 (1980).
200. Theodosiou, E., et al. Biocatalytic synthesis and antitumor activities of novel silybin acylated derivatives with dicarboxylic acids. *New Biotechnology* **28**, 342-348 (2011).
201. Bergman, M., et al. Scavenging of reactive oxygen species by a novel glucuronated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach. *Phytochemistry* **62**, 753-762 (2003).
202. Middleton, E. and Kandaswami, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology* **43**, 1167-1179 (1992).
203. Wu, J.-W., et al. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **45**, 635-641 (2007).
204. Škottová, N., et al. Pharmacokinetic study of iodine-labeled silibinins in rat. *Pharmacological Research* **44**, 247-253 (2001).
205. Engels, F., et al. Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of picrorhiza kurroa, on arachidonic acid metabolism. *FEBS Letters* **305**, 254-256 (1992).

206. Cagin, Y.F., et al. Protective effects of apocynin on cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Archives of Medical Research* **46**, 517-526 (2015).
207. Chandasana, H., et al. Pharmacokinetic, bioavailability, metabolism and plasma protein binding evaluation of nadph-oxidase inhibitor apocynin using lc–ms/ms. *Journal of Chromatography B* **985**, 180-188 (2015).
208. Szentmihályi, K., et al. Cisplatin administration influences on toxic and non-essential element metabolism in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **28**, 317-321 (2014).
209. Schentag, J.J., et al. Urinary casts as an indicator of renal tubular damage in patients receiving aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **16**, 468-474 (1979).
210. Townsend, D.M., et al. High pressure liquid chromatography and mass spectrometry characterization of the nephrotoxic biotransformation products of cisplatin. *Drug Metabolism and Disposition* **31**, 705-713 (2003).
211. Motoyoshi Y, M.T., et al. Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney International* **74**, 1262–1269 (2008).
212. LEHESTE, J.R., et al. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *The FASEB Journal* **17**, 247-249 (2003).
213. Vegt, E., et al. Renal uptake of different radiolabelled peptides is mediated by megalin: Spect and biodistribution studies in megalin-deficient mice. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **38**, 623-632 (2011).
214. Barone, R., et al. Endocytosis of the somatostatin analogue, octreotide, by the proximal tubule-derived opossum kidney cell line. *Kidney International* **67**, 969-976
215. Shen, H., et al. Localization of pept1 and pept2 proton-coupled oligopeptide transporter mrna and protein in rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **276**, F658-F665 (1999).
216. Ganapathy, V. and Leibach, F.H. Carrier-mediated reabsorption of small peptides in renal proximal tubule. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **251**, F945-F953 (1986).
217. Veber, D.F., et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* **45**, 2615-2623 (2002).
218. Humphrey, M.J. The oral bioavailability of peptides and related drugs. *Delivery systems for peptide drugs*, S.S. Davis, L. Illum, and E. Tomlinson, Editors. Springer US: Boston, MA.139-151. (1986).
219. Turner, P.V., et al. Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **50**, 600-613 (2011).
220. D'Souza, A.J.M. and Topp, E.M. Release from polymeric prodrugs: Linkages and their degradation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **93**, 1962-1979 (2004).
221. Smith, R.M. and Hansen, D.E. The ph-rate profile for the hydrolysis of a peptide bond. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 8910-8913 (1998).

-
222. Meng, F., Hennink, W.E. and Zhong, Z. Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications. *Biomaterials* **30**, 2180-2198 (2009).
223. Saari, W.S., et al. Cyclization-activated prodrugs. Basic carbamates of 4-hydroxyanisole. *Journal of Medicinal Chemistry* **33**, 97-101 (1990).
224. Saari, W.S., et al. Cyclization-activated prodrugs. Basic esters of 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Journal of Medicinal Chemistry* **33**, 2590-2595 (1990).
225. de Groot, F.M.H., van Berkomp, L.W.A. and Scheeren, H.W. Synthesis and biological evaluation of 2'-carbamate-linked and 2'-carbonate-linked prodrugs of paclitaxel: Selective activation by the tumor-associated protease plasmin. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 3093-3102 (2000).
226. Rautio, J., et al. Prodrugs and targeted delivery: Towards better adme properties. Wiley. (2011).
227. Kelton, J.G., et al. Comparison of chemical composition of peritoneal fluid and seruma method for monitoring dialysis patients and a tool for assessing binding to serum proteins in vivo. *Annals of Internal Medicine* **89**, 67-70 (1978).
228. Johnston, J.M. and Wiggans, D.S. The toxicity of injected peptides as related to peptidase activity in peritoneal fluid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **87**, 167-170 (1960).
229. Marzilli, L.G., Worley, P. and Burns, H.D. A new electrophoretic method for determining ligand: Technetium stoichiometry in Carrier free 99mTc-radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine* **20**, 871-876 (1979).
230. Fulco, R.A., et al. Effect of normal saline on cisplatin pharmacokinetics and antitumor activity in mice bearing p388 leukemia. *Anticancer research* **10**, 1603-1610 (1990).
231. Ekborn, A., et al. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **51**, 36-42 (2003).
232. Pabla, N., et al. The copper transporter ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **296**, F505-F511 (2009).
233. Ciarimboli, G., et al. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *The American Journal of Pathology* **176**, 1169-1180 (2010).
234. Kim, H.-J., et al. Glutamine protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing cisplatin accumulation. *Journal of Pharmacological Sciences* **127**, 117-126 (2015).
235. Mora, L.d.O., et al. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research* **47**, 517-522 (2003).
236. Krebs, H.A. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochemical Journal* **29**, 1951-1969 (1935).

7. Literaturverzeichnis

237. Bachmakov, I., et al. Interaction of beta-blockers with the renal uptake transporter oct2. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **11**, 1080-1083 (2009).
238. Gullo, J.J., et al. Pharmacokinetics and protein binding of cis-dichlorodiammine platinum (ii) administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **5**, 21-26 (1980).
239. Zuckermann, R.N., et al. Efficient method for the preparation of peptoids [oligo(n-substituted glycines)] by submonomer solid-phase synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 10646-10647 (1992).
240. Eisenhut, M. and Mier, W. Radioiodination chemistry and radioiodinated compounds. in *Handbook of nuclear chemistry*, A. Vértes, et al., Editors. Springer US: Boston, MA. 2121-2141. (2011).
241. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**, 70-77 (1959).
242. Sedlak, J. and Lindsay, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* **25**, 192-205 (1968).
243. Jullian, M., et al. N-terminus fitc labeling of peptides on solid support: The truth behind the spacer. *Tetrahedron Letters* **50**, 260-263 (2009).
244. Beyer, U., et al. Synthesis of new bifunctional maleimide compounds for the preparation of chemoimmunoconjugates. *Chemical Monthly* **128**, 91-102 (1997).

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Wischnjow A., Sarko D., **Janzer M.**, Kaufman C., Beijer B., Brings S., Haberkorn U., Larbig G., Kübelbeck A., Mier W. Renal targeting: peptide-based drug delivery to proximal tubule cells. *Bioconjugate Chemistry* **27**(4), 1050–1057 (2016).

Janzer, M., Larbig, G., Kuebelbeck, A., Wischnjow, A., Haberkorn, U., Mier, W. Drug conjugation affects pharmacokinetics and specificity of kidney-targeted peptide Carriers. *Bioconjugate Chemistry* **27**(10), 2441-2449 (2016).