

Entwicklung und Charakterisierung von Komplexen aus Cetrorelis und biophilen Trägermaterialien

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Chemiker Thomas Rattei
geboren am 23. 05. 1969 in Dresden

Gutachter: Herr Prof. Dr. K.-H. van Pée
Frau Prof. Dr. G. Schmidt
Herr Prof. Dr. J. Engel

Eingereicht am: 17. April 2002
Tag der Verteidigung: 12. August 2002

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biochemie der Technischen Universität Dresden im Zeitraum von 1996 bis 2001 in Zusammenarbeit mit der ASTA MEDICA AG (später ZENTARIS AG) und dem Institut für Technische Chemie der Technischen Universität Clausthal-Zellerfeld.

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz besonders

Herrn Prof. K.-H. van Pée als Leiter des Instituts für Biochemie, der die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte und unter dessen Leitung ich am Institut sehr gute Arbeitsbedingungen nutzen konnte,

Dr. Wolfgang Naumann als Leiter der Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie, unter dessen steter wissenschaftlicher Betreuung, Unterstützung und Diskussion diese Arbeit entstand und eine selbständige Ausgestaltung des Themas möglich war,

Dr. Sandra Murgas und Alexander Lang als Mitarbeiter der Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie für die hervorragende Zusammenarbeit und die vielen Anregungen und Diskussionen,

Hagen Domaschke und Sebastian Thieme als Praktikanten am Institut für Biochemie, die an der Darstellung und Charakterisierung der Komplexe mit Hydroxycarbonsäuren mitarbeiteten,

Dr. Anke Apitz für die beharrliche Motivation und kritische Diskussion,

Dr. Susanne Horn und Dr. Bernd Schwenzer für die Unterstützung bei der Planung und Vorbereitung der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen,

allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie für die sehr angenehme und offene Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft,

Herrn Prof. J. Engel und Herr Dr. Deger von der ASTA MEDICA AG sowie deren Mitarbeitern für die interessante und konstruktive Zusammenarbeit sowie die Bereitstellung von Chemikalien und technischen Ressourcen,

Frau Prof. G. Schmidt, Dr. Marco Drache und seiner Familie sowie den Mitarbeitern des Institutes für Technische Chemie der Technischen Universität Clausthal-Zellerfeld, die mich bei den Modellrechnungen der Cetrorelixkomplexe mit Ideen und Software sowie zahlreichen Anregungen, kritischer Diskussion und freundlicher Aufnahme in Clausthal sehr unterstützten,

dem Universitätsrechenzentrum und der Fachrichtung Chemie der Technischen Universität Dresden, mit deren Rechentechnik zahlreiche Berechnungen für diese Arbeit durchgeführt werden konnten und meiner Familie für die ständige Unterstützung und Geduld.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
1 Problemstellung	9
2 Theoretischer Teil	10
2.1 Einführung	10
2.1.1 GnRH-Analoga als Pharmazeutika	10
2.1.2 Cetrorelix - ein hochwirksamer GnRH-Antagonist	12
2.1.3 Überblick zu Applikationsmöglichkeiten und Depotformen für Peptidpharmaka	13
2.1.4 Komplexverbindungen als Depotssysteme	18
2.2 Untersuchungen zur Struktur von Cetrorelix und dessen Aggregaten	21
2.2.1 Sekundärstruktur von Peptiden	21
2.2.2 Experimentelle Methoden zur Sekundärstrukturanalyse von Peptiden	24
2.2.3 Bisheriger Stand der Sekundärstrukturanalyse von Cetrorelix	26
2.2.4 Aggregation von Cetrorelix	28
2.3 Charakterisierung und Entwicklung von Cetrorelixkomplexen	29
2.3.1 Komplexcharakterisierung durch in vitro-Liberationssysteme	29
2.3.2 Entwicklung eines kinetischen Modells zur Auswertung dynamischer Liberationsanalysen	32
2.3.3 FTIR-Untersuchungen zu Struktur und Stöchiometrie von Cetrorelix-Komplexen	35
2.4 Molecular Modeling	36
2.4.1 Grundlagen des Molecular Modeling	36
2.4.2 Energieberechnung von Biomolekülen mit Kraftfeldverfahren	36
2.4.3 Werkzeuge für die Modellierung isolierter Moleküle	39
2.4.4 Modellierung molekularer Umgebungen	40
2.4.4.1 Generierung molekularer Packungen mit EVOCAP	41
2.4.4.2 Implizite Solvation mit dem GB/SA-Verfahren	41
2.4.5 Sekundärstrukturanalyse von Cetrorelix mit MC-Simulationen	42
2.5 Entwicklung neuer Cetrorelix-Komplexe	44
2.5.1 Einführung	44
2.5.2 Entwicklung eines Simulationsverfahrens als Pre-Screening-Methode	45
2.5.3 Anwendung der Modellrechnungen auf Komplexe mit neuartigen Komplexpartnern	49

3	Material und Methoden	51
3.1	Materialien und Geräte	51
3.1.1	Chemikalien	51
3.1.2	Analytische Geräte und Messbedingungen	53
3.1.3	Rechentchnik	56
3.2	Darstellung der Komplexe	63
3.2.1	Allgemeines	63
3.2.2	Darstellung der Cetorelix-Embonsäure-Komplexe durch Fällung aus Cetorelix-Acetat	63
3.2.3	Darstellung der Cetorelix-Embonsäure-Komplexe durch Fällung aus der Cetorelix-Base	63
3.2.4	Darstellung der Cetorelix-Polyaminosäure-Komplexe	64
3.2.5	Darstellung der Cetorelix-Carbonsäure-Komplexe	64
3.2.6	Darstellung der Cetorelix-Dipeptid-Komplexe	64
3.3	Charakterisierung der Cetorelix-Komplexe	64
3.3.1	Bestimmung des Cetorelixgehaltes	64
3.3.2	Dynamische Liberationsanalyse	65
3.4	Ermittlung der Sekundärstruktur von Cetorelix aus FT-IR- und CD-Spektren	65
3.5	Durchführung und Auswertung der Modellrechnungen zur Komplexierung von Cetorelix	66
3.5.1	Erzeugung der Konformationssets der Moleküle (Cetorelix und Komplexpartner)	66
3.5.2	Erstellung und Charakterisierung der Molekülcluster	68
3.5.3	Dateiformat der Ergebnisdateien von EVOCAP- und SMILESTYPE-Rechnungen	71
3.5.4	Simulationsumgebung für die Steuerung von EVOCAP und SMILESTYPE	73
3.5.4.1	TCL-Skripte zur Steuerung von EVOCAP und SMILESTYPE	73
3.5.4.2	TCL-Bibliotheken und deren Prozeduren für EVOCAP- und SMILESTYPE-Rechnungen	74
4	Ergebnisse	77
4.1	Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Cetorelix	77
4.1.1	FTIR-Spektroskopische Untersuchungen der Sekundärstruktur von Cetorelix	77
4.1.2	MC-Simulation der Sekundärstruktur von Cetorelix	83
4.1.2.1	Evaluierung des MC-Simulationsverfahrens anhand von Peptiden bekannter Sekundärstruktur	83
4.1.2.2	Anwendung des MC-Simulationsverfahrens auf Cetorelix	83

4.2	Aggregation von Cetorelix	89
4.2.1	FTIR-Spektroskopische Untersuchungen von Cetorelix-Aggregaten	89
4.3	Charakterisierung von Struktur und Zusammensetzung von Cetorelix-Komplexen . .	91
4.3.1	Einfluss der Stöchiometrie von Cetorelix-Komplexen auf deren Liberationseigenschaften	91
4.3.2	FTIR-spektroskopische Untersuchungen zur Stöchiometrie von Cetorelixkomplexen	93
4.4	Entwicklung neuer Cetorelix-Komplexe	97
4.4.1	Analyse bekannter Cetorelix-Komplexe	97
4.4.2	Evaluierung des MC-Simulationsverfahrens von Cetorelix-Komplexen	97
4.4.3	Anwendung der MC-Simulationen auf Komplexe mit neuartigen Komplexp Partnern	101
4.4.4	Herstellung und Charakterisierung der Komplexe von Cetorelix mit aromatischen Hydroxycarbonsäuren	105
4.4.5	Herstellung und Charakterisierung der Komplexe von Cetorelix mit Dipeptiden	111
5	Diskussion	120
5.1	Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Cetorelix	120
5.1.1	FTIR-Spektroskopische Untersuchungen der Sekundärstruktur von Cetorelix .	120
5.1.2	MC-Simulation der Sekundärstruktur von Cetorelix	120
5.1.2.1	Fazit	122
5.2	Aggregation von Cetorelix	123
5.2.1	FTIR-Spektroskopische Untersuchungen von Cetorelix-Aggregaten	123
5.2.2	CD-Spektroskopische Untersuchungen von Cetorelix-Aggregaten	124
5.2.3	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von Cetorelix-Aggregaten . . .	124
5.2.4	Fazit	127
5.3	Charakterisierung von Struktur und Zusammensetzung von Cetorelix-Komplexen . .	128
5.3.1	Einfluss der Stöchiometrie von Cetorelix-Komplexen auf deren Liberationseigenschaften	128
5.3.2	FTIR-spektroskopische Untersuchungen zur Stöchiometrie von Cetorelixkomplexen	129
5.3.3	Fazit	130
5.4	Entwicklung neuer Cetorelix-Komplexe	131
5.4.1	Analyse bekannter Cetorelix-Komplexe	131
5.4.2	Evaluierung des MC-Simulationsverfahrens von Cetorelix-Komplexen	131
5.4.3	Anwendung der Modellrechnungen auf Komplexe mit neuartigen Komplexp Partnern	133

5.4.4	Herstellung und Charakterisierung der Komplexe von Cetorelix mit aromatischen Hydroxycarbonsäuren	134
5.4.5	Herstellung und Charakterisierung der Komplexe von Cetorelix mit Dipeptiden	134
5.4.6	Fazit	135
6	Zusammenfassung	137
7	Quellenverzeichnis	139
8	Abbildungsverzeichnis	152
9	Tabellenverzeichnis	155

Abkürzungen

a, b, c	Parameter des kombinierten Zeitgesetzes der dynamischen Liberationen
ATR	Abgeschwächte Totalreflektion
[C]	Cetorelixkonzentration
CD-Spektroskopie	Circular-Dichroismus-Spektroskopie
Cit	Citrullin
COSY	Korrelierte Spektroskopie (Correlation Spectroscopy)
DMA	Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRIFT-Spektroskopie	Fourier Transformations-Infrarotspektroskopie in Diffuser Reflektion
EVOCAP	Programm EVOCAP (<i>Excluded VOlume Constrained Assembly Packing</i>)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSD	Fourier-Selbstentfaltung
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FT	Fourier-Transformations
FTIR-Spektroskopie	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GB/SA	Solvatation mit der Generalized-BORN/Solvent-Accessible-Area-Methode
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HATR	Horizontale Abgeschwächte Totalreflexion
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon
MC-Simulation	Monte-Carlo-Simulation
MD-Simulation	Molekulardynamik-Simulation
MM3	Kraftfeld für Molekülmechanik von Kohlenwasserstoffen
Nal	Naphthylalanin
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminum Garnet-Laser
NLLS-Fit	Nichtlineares Fitverfahren (Non-Linear-Least-Squares-Fit)
NMR-Spektroskopie	Kernresonanzspektroskopie
Pal	Pyridylalanin
PD	Pharmakodynamik
pGlu	Pyroglutaminsäure
Phe(4Cl)	para-Chlor-Phenylalanin
PK	Pharmakokinetik
QEQ	Ladungsberechnung durch Charge-Equilibration
QSAR	Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen
R	Ideale Gaskonstante
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehungen
T	Temperatur
t_{50}	Halbwertszeit

Die Bezeichnungen der Aminosäuren in der vorliegenden Arbeit entsprechen den Konventionen der IUPAC-IUB-Kommission der Biochemischen Nomenklatur [Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **348** (1967) 256; J. Biol. Chem. **247** (1972) 977].

Zur besseren Übersicht sind im folgenden die 20 natürlichen Aminosäuren mit ihren ein- und drei-Buchstaben-Abkürzungen angegeben.

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit werden Beiträge zur Entwicklung neuer Depot- und Applikationsformen von Cetrorelix, einem Antagonisten des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) vorgestellt. Im Gegensatz zu zahlreichen Alternativen wird dabei auf eine kovalente Bindung oder den Einschluss des Peptidwirkstoffes an bzw. in eine meist polymere Matrix verzichtet. Vielmehr wird aufgrund der zahlreichen Erfahrungen in den Arbeitsgruppen von Prof. Losse und Prof. van Pée an der Technischen Universität Dresden das Verfahren der nichtkovalenten Komplexbildung von Peptiden mit Partnermolekülen eingesetzt. Diese Peptidkomplexe besitzen je nach Komplexpartner verschiedenste Aggregations- und Freisetzungseigenschaften und erlauben damit eine preiswerte und ausgesprochen vielseitige Wirkungsmodifizierung. Bei der Suche nach neuen Partnern und Herstellungsverfahren für Cetrorelixkomplexe wurde besonderer Wert auf die Biokompatibilität der Komplexpartner gelegt. Gegenüber traditionellen Depotformen sollen durch deren Einsatz der Schutz vor unerwünschter Aggregation des Wirkstoffs und die Biophilie der Depotpräparate deutlich verbessert werden. Die pharmakologischen Eigenschaften der entwickelten Cetrorelixkomplexe wurden im Rahmen von standardisierten dynamischen Freisetzungsexperimenten untersucht, sodass ein Vergleich der zahlreichen, im Rahmen verschiedener Arbeiten in der Arbeitsgruppe hergestellten Cetrorelixkomplexe möglich ist.

Nur durch möglichst exakte Kenntnis von Art und Größe der beteiligten Wechselwirkungen, der Raumstruktur größerer Moleküle und der Struktur der festen Form der Komplexe ist es möglich, effizient, schnell und zielgerichtet neuartige Komplexe mit den gewünschten Freisetzungs- und Applikationseigenschaften zu entwickeln. Besonderer Wert wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Aufklärung der Struktur von Cetrorelix sowie dessen Aggregaten und Komplexen gelegt. Neben klassischen Methoden der Strukturaufklärung, wie Kernresonanz-, Infrarot- und Fluoreszenzspektroskopie wurden erstmals molekülmechanische Berechnungen für die Strukturaufklärung der Cetrorelixkomplexe eingesetzt. Dabei wurde ein neuartiges, auf an der Technischen Universität Clausthal entwickelter Software basierendes Modellierungsverfahren erarbeitet, das die Simulation und Charakterisierung von Molekülaggregaten mit Hilfe von atomistischen Monte Carlo-Verfahren erlaubt und für die Simulation von Polymeren in Solvathüllen bereits in ähnlicher Form erfolgreich angewendet wurde.

Neben dem Ziel des verbesserten Verständnisses der Komplexstruktur und -stabilisierung wurde untersucht, inwieweit durch die Computersimulationen der wichtigsten molekularen und Freisetzungseigenschaften eine Vorhersage der *in vitro*- und später auch *in vivo*-Eigenschaften von Peptidkomplexen möglich ist. Gelingt dies, kann die Entwicklung der Komplexe vom derzeit praktizierten, gezielten Screening hin zu einem „Maßschneidern“ von Depotformen mit den für die jeweilige Therapie gewünschten Eigenschaften verbessert und beschleunigt werden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Einführung

2.1.1 GnRH-Analoga als Pharmazeutika

Peptide sind kurzkettige Polymere aus Aminosäuren und treten in lebenden Organismen als Hydrolyseprodukte von Proteinen sowie als eigenständig synthetisierte Moleküle auf. Viele dieser freien Peptide, vielfach Hormone, weisen eine hohe biologische Aktivität auf. Hormone sind Botenstoffe, die von spezifischen Zellen endokriner Drüsen ausgeschieden und durch das Blut transportiert werden. Sie stimulieren oder supprimieren Funktionen anderer Gewebe oder Organe. Bekannte Peptidhormone sind die von dem Pankreas ausgeschiedenen Peptide Insulin und Glucagon sowie die Hypophysenhormone Corticotropin und Oxytocin. Bestimmend für die biologische Wirkung und Spezifität der Peptidhormone ist deren Aminosäuresequenz. Durch die unterschiedliche Kombination der Aminosäuren wirken Peptide in so unterschiedlichen Bereichen wie Gehirn (Enkephaline), Gewebe (Bradykinin) oder Hypophyse (Thyroliberin) [Schambach et al. 1986].

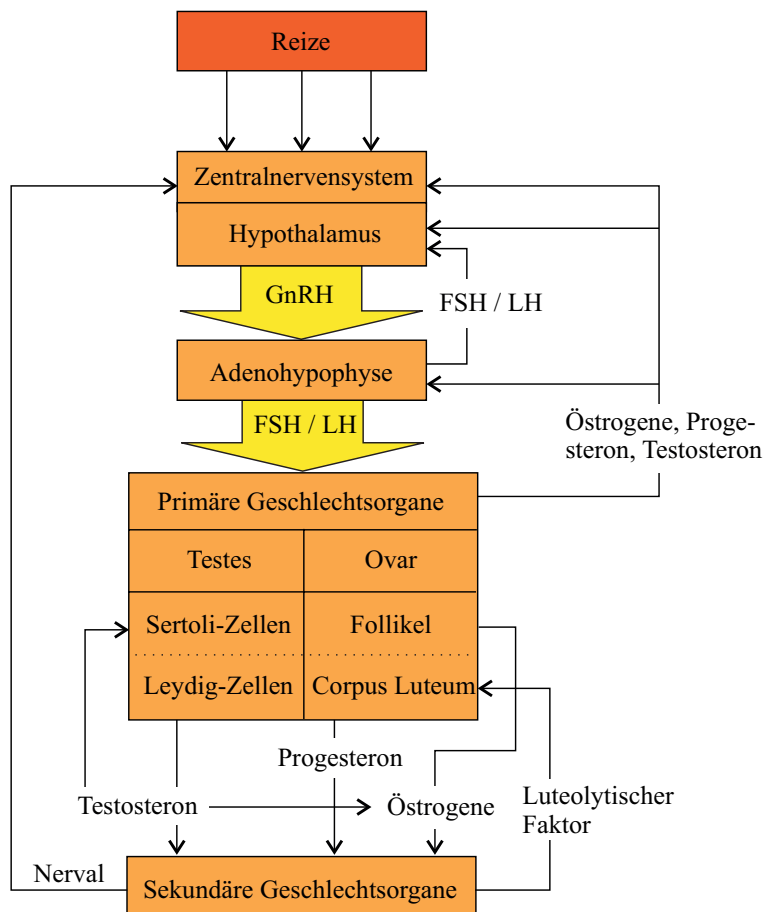


Abbildung 1: Vereinfachter Wirkungsmechanismus von GnRH im menschlichen Organismus [Voet & Voet 1992]

Das Dekapeptid Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)⁽¹⁾ stellt ein zentrales Element der pituitär-gonadalen Achse im menschlichen Organismus dar und besitzt die Sequenz pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. GnRH wird im Hypothalamus gebildet und pulsweise freigesetzt. Es bindet an spezifische Rezeptoren der Hypophysenmembran und bewirkt damit die Sekretion der gonadotropen Peptidhormone Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH). Deren biologische Aktivität besteht u.a. in der Steuerung der Steroidhormonsekretion in den Gonaden. Eine anhaltend hohe Konzentration an GnRH führt nach anfänglich hoher LH- und FSH-Ausschüttung zu einer down-Regulation durch Reduktion der Rezeptoranzahl in der Adenohypophyse. Darüber hinaus regulieren die sezernierten Sexualhormone über einen Feedbackmechanismus die GnRH-Synthese. In der Steuerung der hormonalen Reproduktionskontrolle nehmen Synthese und Wirkung von GnRH somit eine zentrale Stellung ein (Abb. 1). Die Isolation, Charakterisierung und Synthese von GnRH gelang 1971 den unabhängig voneinander arbeitenden Gruppen um SCHALLY und GUILLEMIN, die für diese wissenschaftliche Leistung 1977 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt wurden [Schally et al. 1971].

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen von GnRH und ausgewählten GnRH-Analoga (dargestellt sind die gegenüber dem natürlichen GnRH veränderten Aminosäuren [von Angerer 1996, Kutscher et al. 1997]).

GnRH	pGlu ¹	His ²	Trp ³	Ser ⁴	Tyr ⁵	Gly ⁶	Leu ⁷	Arg ⁸	Pro ⁹	Gly ¹⁰ -NH ₂
Agonisten										
Buserelin						D-Ser(tBu)				Gly-NHEt
Leuprorelin						D-Leu				Gly-NHEt
Nafarelin						D-Nal(2)				
Histrelin						D-His(Bzl)				Gly-NHEt
Triptorelin						D-Trp				
Goserelin						D-Ser(tBu)				Azagly-NH ₂
Antagonisten										
Cetrorelix	Ac-D-Nal(2)	D-Phe(4Cl)	D-Pal			D-Cit				D-Ala-NH ₂
Nal-Glu	Ac-D-Nal(2)	D-Phe(4Cl)	D-Pal			D-Glu(AA)				D-Ala-NH ₂
Ramorelix	Ac-D-Nal(2)	D-Phe(4Cl)	D-Trp			D-Ser(Rha)				Azagly-NH ₂
Ganirelix	Ac-D-Nal(2)	D-Phe(4Cl)	D-Trp			D-hArg(Et ₂)		hArg(Et ₂)		D-Ala-NH ₂
Antarelix	Ac-D-Nal(2)	D-Phe(4Cl)	D-Trp			HCi		Lys(Ipr)		D-Ala-NH ₂
Antide	Ac-D-Nal(2)	D-Phe(4Cl)	D-Trp		Lys(Nic)	D-Lys(Nic)				D-Ala-NH ₂

Das therapeutische Potenzial von GnRH erstreckt sich aufgrund seiner zentralen Rolle in der Steuerung der Sexualhormonsekretion auf Behandlungen sowohl des gesunden als auch des erkrankten Organismus. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Ovulationsinduktion im Rahmen der in vitro-Fertilisation [Collins & Hughes 1995, Jennings et al. 1996] sowie die Behandlung frühzeitiger Pubertät, Endometriose und steroidhormonabhängiger Tumore [Vijayan 1996, Leyendecker & Wildt 1996]. Dabei sind dem Einsatz von natürlichem GnRH als Therapeutikum aufgrund dessen kurzer biologischer Halbwertszeit von 2-4 Minuten enge Grenzen gesetzt. Vielmehr kommen für den therapeutischen Einsatz GnRH-Analoga (Agonisten und Antagonisten) mit verbesserter Wirkung und Bioverfügbarkeit zur Anwendung [von Angerer 1996].

¹Vielfach wird GnRH auch als LHRH (Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon) bezeichnet, mitunter auch als LRF (Luteinizing Hormone Releasing Factor), Gonadoliberin oder Luliberin.

Bis heute wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen ca. 4600 GnRH-Agonisten und -Antagonisten synthetisiert und analysiert. Die zurzeit klinisch angewandten GnRH-Analoga sind Peptide mit gegenüber GnRH veränderter Primärstruktur. Vor allem durch den Einsatz nichtnatürlicher und D-Aminosäuren sowie durch die Veränderung von C- und NH₂-Termini lassen sich die Proteasestabilität drastisch erhöhen und agonistische oder antagonistische Wirkprofile erzielen [Geiger 1984] (Tab. 1).

2.1.2 Cetrorelix - ein hochwirksamer GnRH-Antagonist

Der GnRH-Antagonist Cetrorelix ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Cetrorelix ist ein GnRH-Antagonist der dritten Generation und wurde durch SCHALLY et al. 1986 erstmals synthetisiert²⁾ und 1988 vorgestellt [Bajusz et al. 1988]. Die Substanz wurde aufgrund ihrer hohen Rezeptoraffinität, niedriger Histaminfreisetzung [Kleemann et al. 1991] sowie hoher Stabilität unter dem Einfluss proteolytischer Enzyme [Deger et al.] intensiv in ihren Eigenschaften und pharmakologischem Potenzial untersucht [Asta Medica 1996, Asta Medica and Nippon Kayaku Shionogi 1997].

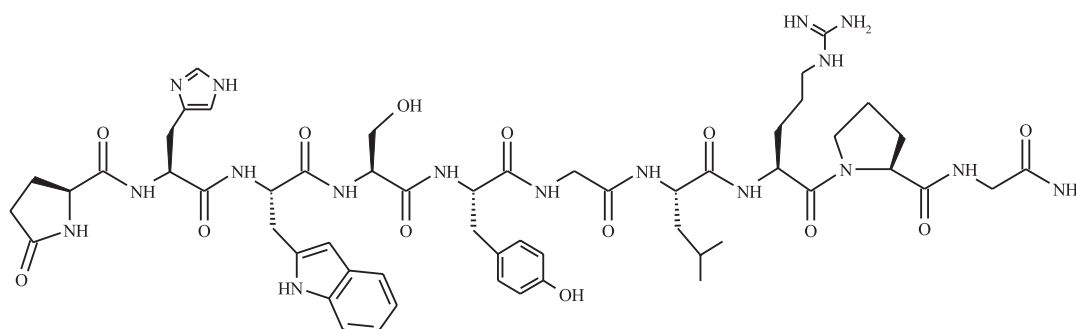


Abbildung 2: Aminosäuresequenz von GnRH

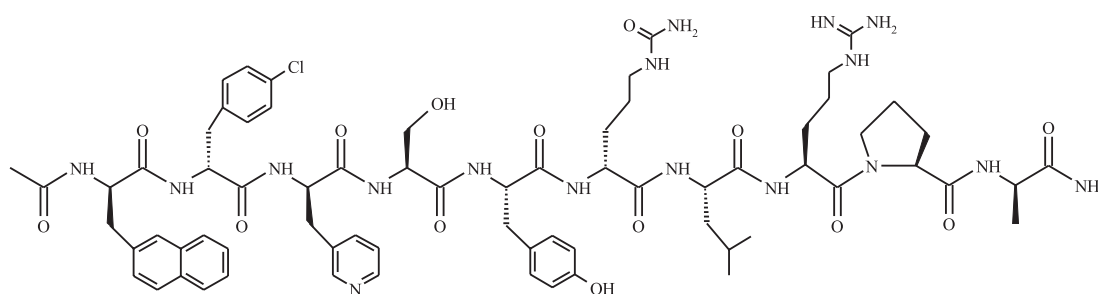


Abbildung 3: Aminosäuresequenz von Cetrorelix

Die Primärstruktur von Cetrorelix ist durch zahlreiche Veränderungen gegenüber dem natürlichen Vorbild GnRH gekennzeichnet. Lediglich die Aminosäuren in Position 4 und 5 sowie 7-9 der Peptidsequenz blieben unverändert. Den hydrophoben NH₂-Terminus zeichnen proteasestabile D-Aminosäuren aus, die für das Wirkprofil essentielle Position 6 [Bajusz et al. 1988, Folkers et al. 1987] wurde mit

²⁾Die vorläufige Bezeichnung für Cetrorelix lautete SB-075. Dieser Name wurde noch längere Zeit in Publikationen verwandt.

D-Citrullin gegenüber Glycin im GnRH stark verändert sowie die C-terminale Position 10 durch D-Alanin modifiziert (Abb. 2 und 3). Cetrorelix kann sowohl durch Festphasensynthese [Asta Medica 1994], als Fragmentkondensation auch mit Hilfe der klassischen Flüssigphasensynthese [Kleemann et al. 1991] hergestellt werden. Das synthetisierte Peptid wird fast ausschließlich als Acetat (CAS 130143-01-0, D-20761), selten als Trifluoracetat (CAS 130289-71-3, D-20453) mittels präparativer HPLC gereinigt und anschließend gefriergetrocknet [Asta Medica 1994]. Das entstandene Produkt ist eine weiße, flockige, in verdünnter Essigsäure leicht lösliche Substanz.

Durch zahlreiche in vitro- und in vivo-Untersuchungen konnte die hervorragende Wirksamkeit von Cetrorelix für verschiedene Indikationen festgestellt werden. So bewirkt das Peptidhormon eine Testosteron- [Csernus et al. 1990] und LH-Suppression [Albano et al. 1996, Albano et al. 1997], bei längerer Anwendung auch die Reduktion von GnRH-Rezeptoren [Pinski et al. 1996]. Die Verabreichung von Cetrorelix beeinflusst die Chromatinreifung in den Spermatozoen [Golan et al. 1997] und stimuliert die Ovarien [Felberbaum et al. 1995]. Eine der wichtigsten nachgewiesenen Wirkungen ist die Hemmung des Wachstums hormonabhängiger Tumore [Asta Medica 1994, Horvath et al. 1995, Jungwirth et al. 1997, Jungwirth et al. 1998]. Einen Überblick über derzeit definierte Indikationen und Anwendungsgebiete für den klinischen Einsatz von Cetrorelix vermittelt Abb. 4.

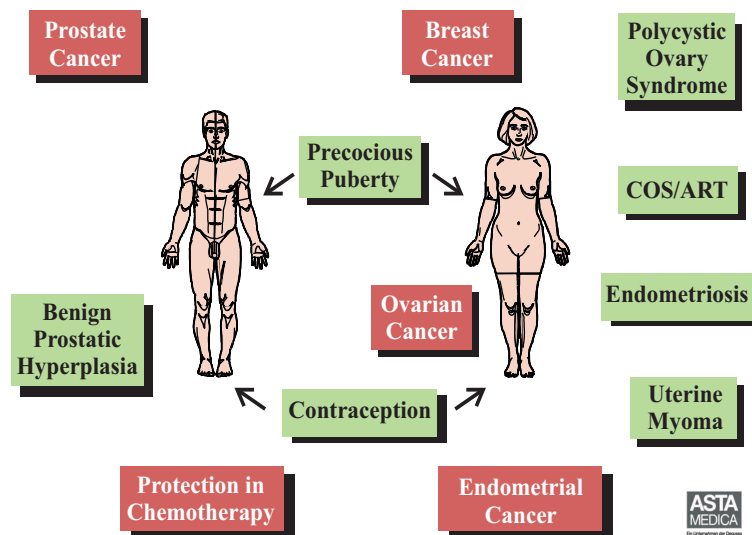


Abbildung 4: Indikationen und Anwendungsgebiete für den klinischen Einsatz von Cetrorelix (Quelle: ASTA MEDICA AG)

2.1.3 Überblick zu Applikationsmöglichkeiten und Depotformen für Peptidpharmaka

Die Applikation eines Pharmakons bildet den Beginn einer Kette biochemischer Vorgänge, die zu einer bestimmten und zeitlich festgelegten biologischen Reaktion im Organismus führen. Dabei wird das Pharmakon entweder an Körpergrenzflächen oder direkt in das Körperinnere bewegt. Nach der Verteilung im Organismus konkurrieren Rezeptorbindung und damit verbunden die biologische Wirkung mit Biotransformation und Exkretion (Abb. 5). Bei der Auswahl eines geeigneten Applikationsmodus sind eine Reihe von Faktoren zu berücksichtigen, die medizinische, stoffliche und ökonomische Gesichtspunkte repräsentieren [Scheler 1989, Chess 1998]:

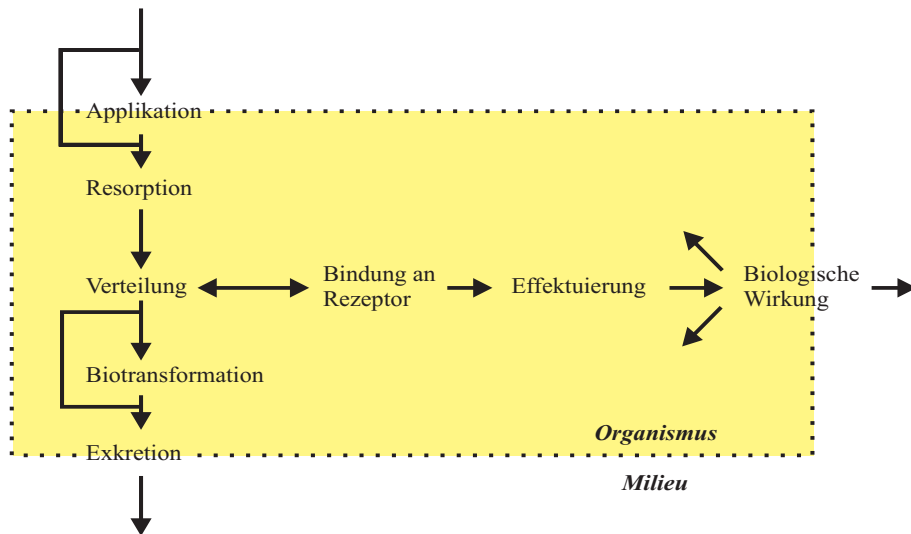


Abbildung 5: Vorgänge nach Applikation eines Pharmakons im Organismus [Scheler 1989]

- gewünschte Resorptionsgeschwindigkeit und Wirkungsdauer,
- Aggregatzustand des Wirkstoffs und Art der Arzneiform,
- Löslichkeit des Pharmakons,
- Chemische Eigenschaften der Verbindungen,
- Bedingungen seitens des Patienten und
- ökonomischer Aufwand.

Für die Applikation an Körpergrenzflächen sowie in das Körperinnere bestehen zahlreiche, verschiedene Verfahren, die den Einsatz verschiedenster Arzneiformen sowie unterschiedliche Resorptionsprozesse ermöglichen. Somit lassen sich für ein Pharmakon gezielt Resorptionsgeschwindigkeit und Wirkungsdauer steuern (Tab. 2). Bei der Applikation von Peptid- und Proteinpharmaka sind im Vergleich zu strukturell einfacheren Arzneistoffen zusätzliche Anforderungen zu berücksichtigen. So ist für die Bindung des Pharmakons an den Rezeptor neben der Erhaltung der Primärstruktur oft auch die Sekundärstruktur, bei Proteinen zusätzlich die Tertiärstruktur entscheidend [Leonard et al. 1995, Liu & Zhou 1995, Okuyama & Ohuchi 1996]. Bereits geringfügige Änderungen der Umgebungsbedingungen, wie pH-Wert, Ionenstärke oder Temperatur können die Konformation der Pharmaka bedeutend beeinflussen, wodurch insbesondere die bequeme orale Applikation mit bukkaler, gastraler oder intestinaler Resorption für unmodifizierte Peptide kaum anwendbar ist. Die Erhaltung der Primärstruktur stellt unter den Bedingungen des Organismus aber auch wegen der Präsenz zahlreicher Proteasen eine erhebliche Schwierigkeit dar. Darüber hinaus neigen Peptide und Proteine zu Aggregation mit sich selbst oder mit Körperproteinen sowie zur Adsorption an Oberflächen. Weitere potenzielle Probleme beim Einsatz von Peptidpharmaka entstehen durch deren unerwünschte Speicherung nach der Applikation. Derartige, körpereigene Depots bilden sich entweder durch Affinität zu Biostrukturen bzw. Löslichkeitseffekte oder seltener durch aktiven bzw. spezifischen Transport [Scheler 1989].

Tabelle 2: Überblick über wichtige Applikationsarten für Pharmaka [Scheler 1989]

Applikationsart	geeignete Aggregatzustände bzw. Phasengemische	bevorzugte Arzneiformen
Applikation an der Körpergrenzfläche		
1. Verabreichung auf die Haut (perkutan, epikutan)	viskos-flüssig, fest, Emulsionen, Suspensionen	Lösungen, Extrakte, Salben, Pasten, Puder
2. Anwendung auf Schleimhäuten		
a) Mund- und Zungenschleimhaut (buccal, perlingual, sublingual)	flüssig, fest	Lösungen, Extrakte, Pulver, Tabletten
b) Magen- und Darmschleimhaut (enteral)	flüssig, fest, Suspensionen, Emulsionen	Lösungen, Extrakte, Pulver, Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln
c) Rektumschleimhaut (rektal)	flüssig, fest, Suspensionen, Emulsionen	Lösungen und Einläufe, Suppositorien
d) Nasenschleimhaut (nasal)	flüssig, Emulsionen	Lösungen, Salben
e) Bronchial- und Alveolarepithel (pulmonar)	gasförmig, Aerosole, Rauche	Gase, Dämpfe, Flüssigkeiten, Spray
f) Konjunktivalschleimhaut (konjunktival)	flüssig, Emulsionen	Lösungen, Salben
g) Schleimhäute der Genitalorgane und Harnwege (vaginal, urethral)	flüssig, Emulsionen (auch fest)	Lösungen, Extrakte, Salben, Puder, Globuli
Applikation in das Körperinnere (parenteral)		
1. unter Umgehung einer Resorption		
a) intrakardinal	flüssig	Lösungen
b) intraarteriell	flüssig, gasförmig	Lösungen, Gase
c) intravenös	flüssig	Lösungen
2. unter Einschaltung eines Resorptionsprozesses		
a) intrakutan	flüssig	Lösungen
b) subkutan	Suspensionen, Emulsionen, flüssig	Lösungen, Kristallsuspensionen, Emulsionen
c) intramuskulär	Suspensionen, Emulsionen, flüssig	Lösungen, Kristallsuspensionen, Emulsionen
d) intraperitoneal, intrapleural	Suspensionen, Emulsionen, flüssig	Lösungen, Suspensionen, Emulsionen

Das hohe und vielfältige therapeutische Potenzial von Peptidhormonpräparaten erfordert eine breite Palette gewünschter Resorptionsgeschwindigkeiten und Wirkungsprofilen. So sind im Fall der GnRH-Antagonisten kurzzeitige Applikationen z.B. bei der Ovulationsinduktion mit möglichst sofortiger Resorption und begrenzter Wirkungsdauer ebenso von Bedeutung wie Langzeitapplikationen z.B. in der Tumorthherapie mit möglichst langanhaltender, konstanter Resorption und somit langer Wirkungsdauer. In allen klinischen Anwendungsfällen ist jedoch die exakte Kontrollierbarkeit des zeitlichen Wirkprofils eine Grundvoraussetzung für die Zulassung eines Pharmakons.

Peptidpharmaka werden derzeit bevorzugt parenteral [Duijkers et al. 1997, Kamijo et al. 1996, Pinski et al. 1992] oder enteral [Lee & Chien 1995, Flinn et al. 1996b, Flinn et al. 1996a], in Einzelfällen auch perkutan [Bhatia & Singh 1997, Bhatia et al. 1997], verabreicht. Bei der Entwicklung der dafür anzuwendenden Applikationsformen stehen die gezielte Freisetzung des Wirkstoffes sowie dessen Schutz vor proteolytischem Abbau im Vordergrund. Einen wesentlichen Beitrag zur Verringerung der enzymatischen Spaltung liefert die Primärstruktur der Peptidpharmaka selbst. So konnte durch die Sequenzabwandlung mit nichtnatürlichen und D-Aminosäuren eine wesentliche Stabilisierung der GnRH-Analoga gegenüber Proteasen erreicht werden [Kleemann et al. 1991, Deger et al., Jankowsky 1995]. Weitere Stabilisierungen lassen sich durch die kovalente Bindung (Konjugation) der Wirkstoffe an Proteaseinhibitoren [Bernkop-Schnurch et al. 1997] oder Polymere [Morgan et al. 1996] erzielen. Auch zur Steuerung der Wirkstofffreisetzung wird die kovalente Fixierung der Pharmaka an oder in einem polymeren Träger bevorzugt [Stolnik et al. 1995, Torchilin & Trubetskoy 1995, Tracy 1998, Zaslipsky 1995]. Durch die Auswahl der Art des Trägermaterials sowie der Art der Fixierung lassen sich somit die gewünschten Freisetzungsprofile erzielen [Pinski et al. 1992, Lee & Chien 1995, Kamijo et al. 1996]. Nachteilig wirken sich dabei jedoch der teilweise große Aufwand für die Herstellung der Konjugate, die Gefahr irreversibler Veränderungen der Pharmaka bei langandauernder Wechselwirkung mit dem Trägermaterial sowie die notwendige Entfernung oder Metabolisierung des Trägers nach erfolgter Wirkstoffabgabe aus. Eine ausführliche Zusammenstellung der untersuchten und teilweise klinisch eingesetzten Depotpräparate für GnRH und GnRH-Analoga ist in der Dissertation von MURGAS [Murgas 1998] zu finden.

Für die Beurteilung des Freisetzungs- und Wirkungsprofils eines Pharmakons sind pharmakokinetische (PK-) und pharmakodynamische (PD-) Untersuchungen erforderlich. Dabei beschreiben pharmakokinetische Parameter die Verteilung und Konzentration eines Pharmakons im Organismus in Abhängigkeit von der applizierten Dosis. Mit Hilfe der Pharmakodynamik kann dagegen die erzielte Wirkung des Pharmakons in Abhängigkeit von dessen Lokalisierung und Konzentration im Organismus beschrieben werden (Abb. 6). Für die quantitative Beschreibung von PK und PD werden Modelle eingesetzt, die die biologische Realität in vereinfachter Form beschreiben (Tab. 3), jedoch die komplexen physiologischen Verhältnisse nur in grober Näherung darstellen können. Für die gezielte und Langzeitfreisetzung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten GnRH-Antagonisten Cetrorelix kommen bislang fast ausnahmslos Mikrokapseln aus biologisch abbaubaren Polymeren, zumeist DL-Milch-/Glykolsäure-Copolymere, zum Einsatz [Csernus et al. 1990]. Zusätzlich dazu kann Cetrorelix als schwerlösliches Embonat eingesetzt werden, was nach der Freisetzung aus der Polymermatrix zu einem weiteren Retardeffekt durch verzögerte Resorption führt [Pinski et al. 1992].

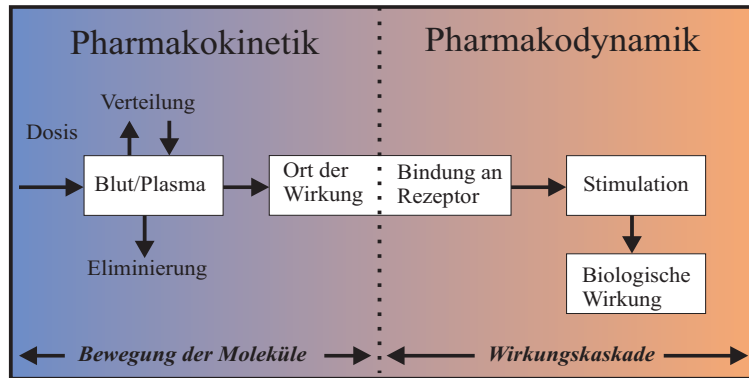


Abbildung 6: Zusammenhänge zwischen Pharmakokinetik (PK) und Pharmakodynamik (PD) [Cawello & Antonucci 1997]

Tabelle 3: Überblick über verbreitete PK/PD-Modelle für stationäre Systeme [Meibohm & Derendorf 1997, Cawello 1997]

PK/PD-Modell	Beschreibung	Grundgleichung
Schrankenmodell	Feststellung der Existenz eines vorbestimmten Effektes E_{fix} in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration c	$E = E_{fix}$ wenn $c \geq c_{Schranke}$
lineares Modell	Direkte Proportionalität zwischen Effekt E und Wirkstoffmenge, bestehend aus Konzentration c im Transportmedium und Flussgeschwindigkeit m des Mediums	$E = E_0 + m \cdot c$
logarithmisch-lineares Modell	Logarithmische Proportionalität zwischen Effekt E und Wirkstoffmenge, bestehend aus Konzentration c im Transportmedium und Flussgeschwindigkeit m des Mediums	$E = m \cdot \log(c) + b$
E_{max} -Modell	Modell mit Betrachtung der Wechselwirkung von Wirkstoff und Rezeptor, in Abhängigkeit von Wirkstoffkonzentration c , Maximaleffekt E_{max} und Wirkstoffkonzentration E_{50} bei 50% des Effektes	$E = E_0 + \frac{E_{max} \cdot c}{E_{50} + c}$
erweitertes E_{max} -Modell	Erweiterung des E_{max} -Modells für die Beschreibung der Wechselwirkung von n Wirkstoffmolekülen und einem Rezeptor	$E = E_0 + \frac{E_{max} \cdot c^n}{E_{50}^n + c^n}$

2.1.4 Komplexverbindungen als Depotsysteme

Peptidpharmaka besitzen durch die vielfältigen Funktionalitäten ihrer Aminosäureeinheiten zahlreiche Möglichkeiten der Wechselwirkung mit ihrer Umgebung:

1. Ionenpaar- oder elektrostatische Wechselwirkungen zwischen elektrisch unterschiedlich geladenen Ionen, Atomen und Atomgruppen,
2. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protonendonoren und -akzeptoren,
3. Disulfidbrücken als kovalente inter- oder intramolekulare Bindung zwischen Cysteinseitenketten,
4. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Atomgruppen mit Ladungsverschiebung entlang der Bindungen und
5. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Atomgruppen und Molekülen.

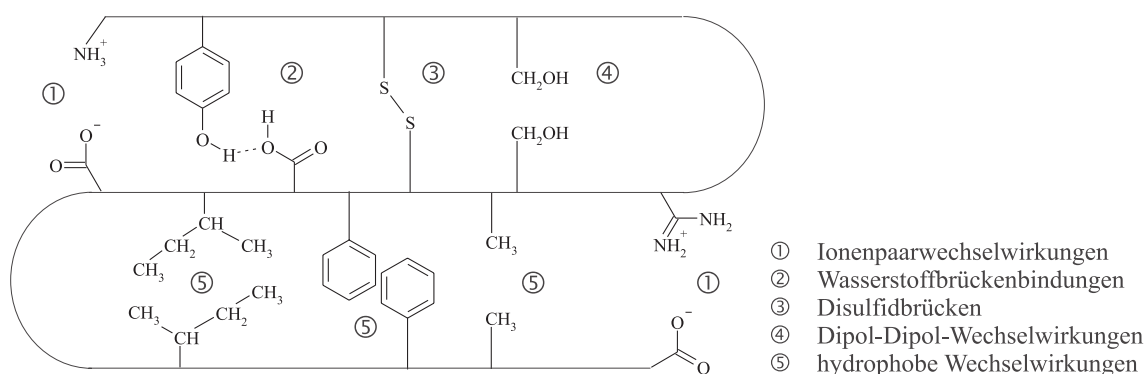


Abbildung 7: Schematische Darstellung der typischen Wechselwirkungen innerhalb und zwischen Peptiden und Proteinen [Visser 1992]

Die gezielte Nutzung der für natürliche Aminosäuren typischen Nebervalenzwechselwirkungen (Abb. 7) erlaubt die Entwicklung von Retardsystemen, die nicht auf der Konjugation der Wirkstoffe an Trägermoleküle beruhen, sondern sich vielmehr durch nichtkovalente Bindung der Peptide an Partnermoleküle auszeichnen. Die dabei entstehenden Molekülaggregate unterliegen keiner festgelegten Stöchiometrie, sondern lassen sich in einem meist großen, kontinuierlichen Bereich der Zusammensetzung synthetisieren. Zur Stabilisierung derartiger Komplexe können unterschiedliche Wechselwirkungen parallel beitragen, wie durch die zahlreichen Untersuchungen zur Peptid- und Proteinfaltung eindrucksvoll belegt wurde [Abkevich et al. 1995, Creighton 1995, Lemer et al. 1995, Michell et al. 1994, Smith & Regan 1995, Thornton et al. 1995].

Molekülaggregate aus Peptiden, Proteinen oder Molekülen ohne Peptidbindungen, die diese beschriebenen Wechselwirkungen zur intra- und intermolekularen Stabilisierung ausnutzen, werden im weiteren als Komplexverbindungen bezeichnet. Insbesondere die exakte Unterscheidung von Peptidsalzen und -komplexen ist wegen der aufwändigen Strukturaufklärung im festen Zustand oft kompliziert. Daher wird in dieser Arbeit für viele Aggregate von Peptidpharmaka der Komplexcharakter aufgrund

der variablen Stöchiometrie bei gleichzeitiger Abwesenheit ungebundenen Komplexpartners angenommen.

Zur Abgrenzung gegenüber polymeren Depotsystemen oder Salzverbindungen sind nachfolgende Eigenschaften für Peptid- und Proteinkomplexe charakteristisch:

- Peptid- und Proteinkomplexe werden durch nichtkovalente, teils verschiedenartige Wechselwirkungen stabilisiert,
- Peptid- und Proteinkomplexe sind in einem bestimmten, kontinuierlichen Stöchiometriebereich darstellbar und
- Peptid- und Proteinkomplexe besitzen kein ausgeprägtes Kristallgitter.

Die Darstellung von Peptidkomplexen kann je nach Größe und Eigenschaften der Komplexpartner auf unterschiedliche Weise erfolgen:

- Spontane oder durch Veränderung des Lösungsmittels induzierte Fällung von schwerlöslichen Peptidkomplexen aus gelöstem Peptid und gelöstem Komplexpartner und
- Lyophilisierung von teilweise oder vollständig löslichen Peptidkomplexen nach Vereinigung von gelöstem Peptid und gelöstem Komplexpartner.

Erste Depotpräparate für GnRH-Analoga durch Komplexierung wurden 1981 durch die Arbeiten von NESTOR bekannt [Nestor et al. a, Nestor et al. b]. In diesen Arbeiten wurden schwerlösliche Komplexe von GnRH-Analoga mit Partnern aus folgenden unterschiedlichen Substanzklassen synthetisiert:

- anorganische Säuren,
- organische Säuren,
- Metallionen und
- organische Kationen.

Weitere Arbeiten führten zu Komplexen von GnRH-Antagonisten mit Embonsäure und Tannin [Nestor & Vickery]. Für derart hergestellte Komplexe wurde eine Schwerlöslichkeit auch bei therapeutischer Anwendung am Organismus gefunden und somit die Eignung von Komplexverbindungen als Depotformen für Peptidpharmaka bewiesen.

Am Institut für Biochemie der TU Dresden konnten die Erfahrungen aus Arbeiten zur Komplexierung von Insulin, vor allem mit Polyaminosäuren, auf GnRH-Analoga erfolgreich übertragen werden. So wurde für D-Phe⁶-GnRH eine signifikante Dosisreduzierung bei Komplexierung des Peptides mit Polyglycin [Naumann et al. 1991] und anderen Polyaminosäuren erzielt [Braun 1991, Naumann et al.]. Weitere Arbeiten in dieser Arbeitsgruppe führten zur Synthese und Charakterisierung von Komplexen des GnRH-Antagonisten Cetrorelix mit Polyaminosäuren und Carbonsäuren [Engel et al.]. Dabei konnten auch für dieses Peptidpharmakon Komplexe mit sehr unterschiedlicher, teils stark verzögerter Wirkstofffreisetzung in statischen und dynamischen in vitro-Freisetzungsversuchen gewonnen werden [Murgas 1998].

Unsere Untersuchungen zur Herstellung und Charakterisierung von Peptidkomplexen, in der vorliegenden Arbeit bezogen auf Cetrorelix, verfolgen derzeit vor allem das Ziel, die gesamte Breite der potenziellen Komplexpartnern zu erschließen und somit eine Fülle von vielfältigen, verträglichen und preisgünstigen Depotformen für Peptidpräparate „nach Maß“ herstellen zu können.

2.2 Untersuchungen zur Struktur von Cetrorelix und dessen Aggregaten

2.2.1 Sekundärstruktur von Peptiden

Trotz der festgelegten Zusammensetzung von Peptiden und Proteinen aus einzelnen Aminosäuren ist deren räumliche Struktur wie bei fast allen Molekülen variabel, da alle Einfachbindungen im Molekül auch einen Rotationsfreiheitsgrad besitzen. Im Unterschied zur Konfiguration von geometrischen oder cis-trans-Isomeren, die durch Mehrfachbindungen oder Chiralitätszentren bestimmt wird und sich nur durch das Aufbrechen einer oder mehrerer kovalenter Bindungen ändern kann, ist die Konformation von Molekülen mit rotierbaren Bindungen auch ohne Veränderung kovalenter Bindungen im Prinzip unbegrenzt variabel. Da sich jedoch die Energie der Konformere eines Moleküls unterscheidet, liegen in der Realität meist nur wenige Konformere im Gleichgewicht zueinander vor.

Da im kovalenten Grundgerüst der Peptide und Proteine nur Einfachbindungen vorkommen, ist die Konformationsvielfalt dieser Moleküle besonders hoch und für deren chemisches und biologisches Verhalten überaus bedeutsam. Unter natürlichen Temperatur- und pH-Bedingungen überwiegen meist eines oder einige Konformere, deren chemische und Raumstruktur wie folgt beschrieben wird [Lehninger 1994]:

- Primärstruktur: Beschreibung der Zusammensetzung eines Moleküls aus Atomen und kovalenten Bindungen,
- Sekundärstruktur: Konformation der Teilbereiche eines Moleküls,
- Tertiärstruktur: räumliche Anordnung der Teilbereiche eines Moleküls zueinander und
- Quartärstruktur: räumliche Anordnung unterschiedlicher Peptidstränge zueinander (in oligomeren Proteinen).

Durch den polymeren Charakter von Polypeptiden herrschen bestimmte, charakteristische Muster der Sekundär- und Tertiärstruktur vor. So treten folgende Sekundärstrukturmerkmale in Peptiden und Proteinen besonders oft auf:

- α -Helix,
- β -Faltblatt paralleler oder antiparalleler Peptidstränge und
- β -turn.

Derartige Sekundärstrukturen ordnen sich in Proteinen und größeren Peptiden zu charakteristischen Tertiärstrukturmotiven, z.B. Helix-Turn-Helix, EF-Hand, β -Haarnadel, Grey Key oder β - α - β . Da die typischen Sekundärsturelementen jeweils mehrere Aminosäuren einbeziehen, können sich Tertiärstrukturen jedoch erst in größeren Peptiden mit mehr als 15 Aminosäuren ausbilden.

Zur einfacheren Beschreibung der Sekundärstrukturen in Polypeptiden werden die Diederwinkel der rotierbaren Bindungen im Rückgrat der Peptidketten mit ϕ und ψ bezeichnet, während die Peptidbindung ϖ wegen ihres partiellen Doppelbindungscharakters als planar und in trans-Konfiguration angenommen wird [Lehninger 1987]:

- ϕ : Diederwinkel der N-C-Bindung in der Orientierung C-N-C_{i+1}-C_{i+1},
- ψ : Diederwinkel der C-C-Bindung in der Orientierung N-C-C-N_{i+1} und
- ϖ : Peptidbindung C-N in der Orientierung C-C-N-C_{i+1}.

Tabelle 4: Diederwinkel der häufigsten β -turns in einem Tetra-Gly-Fragment [Yang et al. 1996]

β -Turn-Typ	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
I	-60°	-40°	-110°	30°
I'	-60°	100°	100°	10°
II	70°	30°	80°	10°
II'	60°	-100°	-100°	-10°

Besondere Variabilität erhält die Konformation von Peptiden durch β -turns. Typischerweise werden diese Sekundärstrukturelemente als Peptidsegmente aus 4 Aminosäuren beschrieben und die Positionen mit i , $i+1$, $i+2$, $i+3$, vom N- zum C-Terminus laufend, bezeichnet. Die endständigen Positionen i und $i+3$ sind meist mit β -Faltblättern von Peptid- oder Proteinhauptsträngen verbunden, deren Peptidbindungen jedoch antiparallel zueinander ausgerichtet sind [Yan et al. 1995]. Die zentralen Positionen $i+1$ und $i+2$ kehren die Richtung der Peptidketten um und besitzen typische Diederwinkel ϕ und φ in den verschiedenen Typen der β -turns. Mit ihrer Raumstruktur sind β -turns eine wesentliche Voraussetzung für kompakte, z.B. globuläre Proteine. Ebenso wird ihnen eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Proteinfaltung zugeschrieben [Yan et al. 1995]. LEWIS et al. führten 1973 insgesamt 10 Typen von β -turns ein: I, I', II, II', III, III', IV, V, VI, VII [Lewis et al. 1973], welche 1981 durch RICHARDSON auf 7 reduziert wurden: I, I', II, II', IV, VIa, VIb [Richardson 1981]. Meist werden jedoch mit I, I', II und II' nur 4 Typen dieses Strukturelements betrachtet (Tab. 4 und Abb. 8), die etwa 60% aller gefundenen Turnstrukturen ausmachen [Hutchinson & Thornton 1994].

Die biologische Wirkung von Pharmaka ist in enger Weise mit deren chemischen und physikochemischen Eigenschaften verknüpft. Die Beziehungen zwischen Eigenschaften pharmakologisch wirksamer Moleküle und der Selektivität und Sensitivität ihrer Wirkung auf einen Organismus werden mit Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) beschrieben. Die quantitative Analyse dieser Beziehungen (QSAR) besitzt für die Entwicklung neuartiger Pharmaka eine stetig wachsende Bedeutung. Reines Screening potenzieller Wirkstoffe auf gewünschte Wirkungen kann trotz moderner Hochleistungsanalyseverfahren immer nur ein vorzuziehendes Spektrum von Wirkstoffen an meist stark vereinfachten Modellsystemen charakterisieren. Das Ziel von QSAR-Untersuchungen besteht dabei in der Wirkungsoptimierung bereits bekannter Pharmaka, der Auffindung neuer Leitverbindungen sowie der Aufklärung von Wirkungsmechanismen. Auf der Basis so gewonnener Erkenntnisse lassen sich Ansätze zur Gewinnung neuartiger Wirkstoffe ableiten.

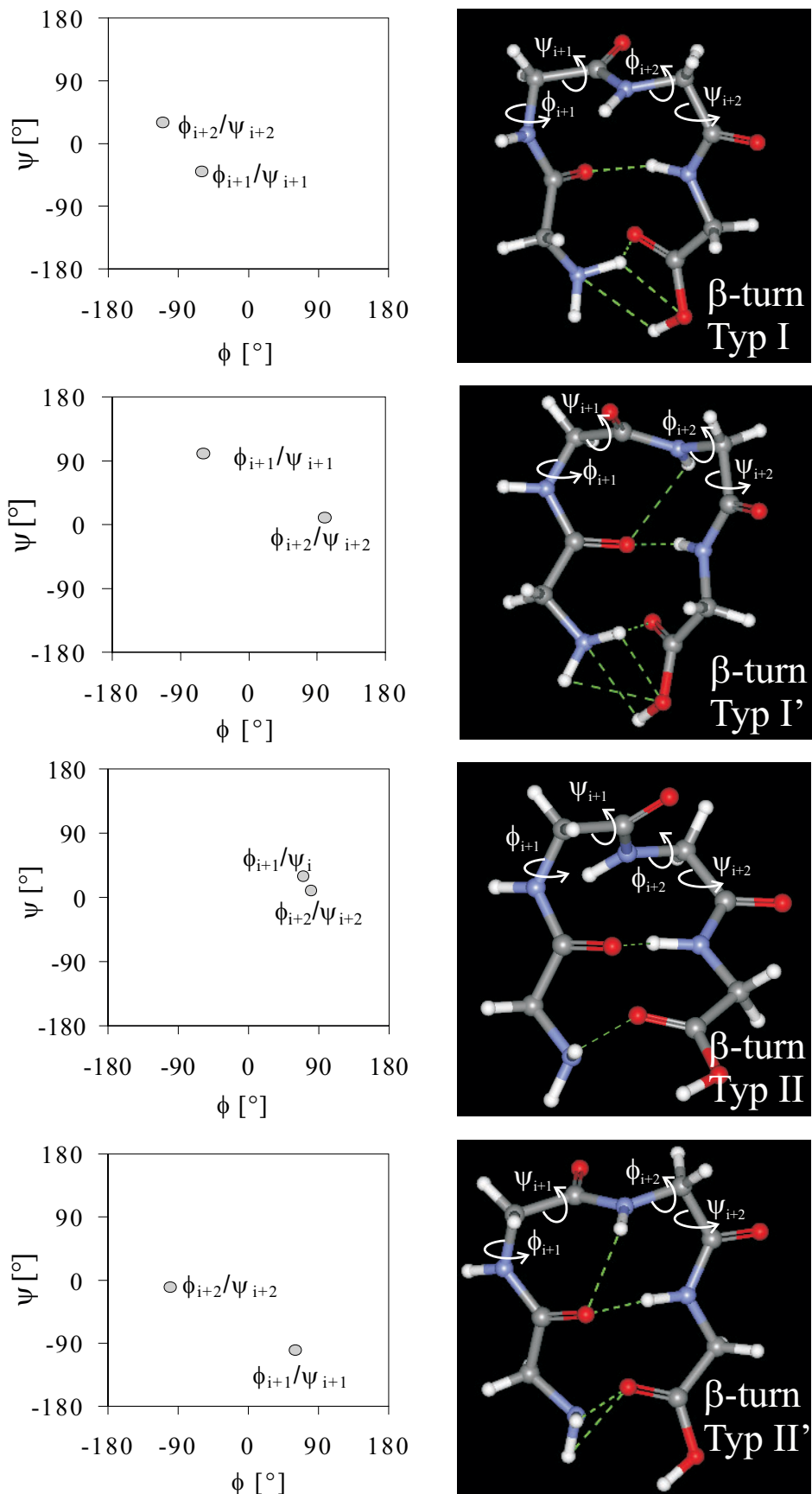


Abbildung 8: Raumstrukturen und Ramachandran-Plots der 4 häufigsten β -turns in einem Tetra-Gly-Fragment [Yang et al. 1996]

2.2.2 Experimentelle Methoden zur Sekundärstrukturanalyse von Peptiden

Die Infrarotspektroskopie ist eine leistungsfähige Methode zur Strukturaufklärung von Makromolekülen. Sie analysiert den Frequenzbereich des infraroten Lichtes von ca. 10^2 bis 10^{14} Hz und misst dadurch Energieunterschiede zwischen verschiedenen Schwingungszuständen von Molekülen [Galla & Müller 1988, Dluhy & Mendelsohn 1988, Haris & Chapman 1988, Fabian et al. 1994, Didi et al. 1991, Haris & Chapman 1995, Smith & Garry J. Die Vibrationen eines Moleküls sind direkt von dessen Primär- und Sekundärstruktur abhängig und lassen somit Rückschlüsse auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zu. Dabei lassen sich mit Hilfe der Infrarotspektroskopie, bedingt durch deren Messprinzip, all jene Schwingungen in Molekülen analysieren, bei denen sich deren Dipolmoment verändert. Die RAMAN-Spektroskopie als eine weitere Form der Schwingungsspektroskopie kann als Komplementärmethode zur FTIR-Spektroskopie eingesetzt werden, da sich mit ihrer Hilfe die Schwingungszustände messen lassen, die mit Veränderungen der Polarisierbarkeit eines Moleküls verbunden sind. Die Infrarotspektroskopie gilt seit langem als zuverlässiges und unkompliziertes Werkzeug der biochemischen Analytik. Dagegen wurde die RAMAN-Spektroskopie erst in den letzten Jahren durch die Entwicklung von Fourier Transform- (FT-) Geräten mit Laserwellenlängen im nahen Infrarot (z.B. Nd:YAG mit Primäremission bei 1064 nm) zu einer derartigen Standardmethode. Erst durch den Einsatz dieser neuartigen Geräte konnten die Hauptprobleme beim Einsatz der RAMAN-Technik, deren starke Störung durch Fluoreszenz der Proben, Lösungsmittel und Aufnahmebehältnisse sowie die Erhitzung der Proben durch den Laser, eliminiert werden. Für die Strukturuntersuchungen von Cetrorelix im Rahmen dieser Arbeit konzentrierten wir uns dennoch auf den Einsatz der FTIR-Spektroskopie, da mit ihr im Gegensatz zur RAMAN-Spektroskopie die Proben in allen Aggregatzuständen sowie mit Hilfe spezieller Aufnahmetechniken auch in Mengen von wenigen Mikrogramm untersucht werden können. Eines der bedeutendsten Probleme bei der Aufnahme und Analyse von FTIR-Spektren ist die Störung durch Wasser, welches starke Eigenabsorptionen in wesentlichen Bereichen des IR-Spektrums besitzt. Für die Untersuchung wässriger Lösungen werden daher entweder spezielle Aufnahmetechniken, wie z.B. Abgeschwächte Totalreflexion (ATR) oder bei Transmissionsmessungen die Lösung in D_2O statt Wasser, verwendet. Die Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen in Lösung kann darüber hinaus mit guter Genauigkeit auch durch eine Zerlegung von deren Circular-Dichroismus-Spektren zwischen 190 nm und 230 nm in eine Linearkombination dreier Grundtypen (Abb. 55 links) ermittelt werden [Galla & Müller 1988, Woody 1996, Yang et al. 1986].

Bei der Auswertung der FTIR-Spektren werden die in Abb. 9 verdeutlichten N-H-Streckschwingungen (Amid A-Bande), C=O-Streckschwingungen (Amid I-Bande) sowie C-NH-C-Beugeschwingungen (Amid II-Bande) analysiert und somit die Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente an der Konformation des Peptides bestimmt. Die Zusammenhänge zwischen der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen und der Intensität und Breite der beschriebenen IR-Banden wurden in den vergangenen Jahren von zahlreichen Arbeitsgruppen eingehend untersucht.

Für die Interpretation unserer Spektren bezogen wir uns auf die in den Tabellen 5 und 6 zusammengestellten Parameter. Dabei ist zu bemerken, dass mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie die ungeordneten und α -helikalen Strukturen praktisch nicht unterschieden werden können und gemeinsam zu betrachten sind. Durch die Differenzen zwischen den Spektrenbereichen, die in den Tabellen 5 und 6 für gleiche Sekundärstrukturanteile angegeben werden, ergaben sich in der Praxis oft unterschiedliche Möglichkeiten zur Interpretation der aufgenommenen Spektren. Aus diesem Grund wurden ausgewählte Spektren von in KBr aufgenommenen Proben zusätzlich einer datenbankgestützten Analyse nach SARVER und KRUEGER unterzogen (siehe S. 65). Dabei wird der gesamte Spektrenverlauf von

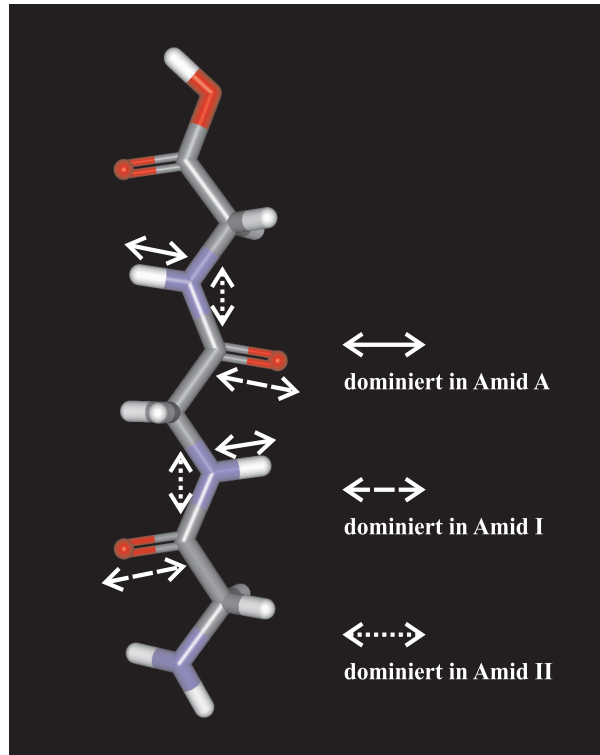


Abbildung 9: Dominierende Schwingungszustände im Rückgrat von Peptiden und Proteinen [Galla & Müller 1988]

Tabelle 5: Abhängigkeit der Lage und Halbwertsbreite der Amid A-Bande in IR-Spektren von der Sekundärstruktur in Polyaminosäuren und Proteinen [Kristof 1979]

Konformation	Amid A-Bande	
	Lage des Maximums	Halbwertsbreite
α -Helix	um 3300 cm^{-1}	56 cm^{-1} bis 90 cm^{-1}
antiparalleles β -Faltblatt	3266 cm^{-1} bis 3300 cm^{-1}	56 cm^{-1} bis 90 cm^{-1}
Zufallsknäuel	3250 cm^{-1} bis 3300 cm^{-1}	150 cm^{-1} bis 200 cm^{-1}

Tabelle 6: Lage der Amid I-Bandenmaxima und *Amid II-Bandenmaxima* in Abhängigkeit von der Sekundärstruktur nach GALLA [Galla & Müller 1988], MANTSCH [Mantsch 1991] und MIYAZAWA [Miyazawa & Blout 1961], Angaben in cm^{-1}

Autor	Zufallsknäuel	α -Helix	β -Faltblatt		
			parallel	antiparallel	β -turn
GALLA [Galla & Müller 1988]	1675-1640	1675-1640	1700-1675		
	1520-1545	1520-1545	1640-1620		
	1545-1550	1545-1550	1520-1530		
MANTSCH [Mantsch 1991]	1645-1638	1662-1645	1638-1615	1695-1662	
				1688-1682	
MIYAZAWA [Miyazawa & Blout 1961]	1660	1660-1650	1640-1630	1690-1670	
	1545-1520	1550-1540	1530-1520	1640-1630	
				1530-1520	

1600 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} normalisiert und mit den Spektren von 17 Referenzproteinen verglichen, deren Sekundärstruktur durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt ist [Dousseau & Pezolet 1990, Sarver Jr. & Krueger 1991a, Sarver Jr. & Krueger 1991b]. Eine ausführliche Darstellung und Diskussion dieses Verfahrens sowie weitere Einzelheiten und Erklärungen zur Interpretation von Amid-Banden in IR-Spektren können der Diplomarbeit von RATTEI [Rattei 1995] entnommen werden.

2.2.3 Bisheriger Stand der Sekundärstrukturanalyse von Cetrorelix

Die Untersuchungen der Beziehung von Primärstruktur und Wirkung verschiedener GnRH-Analoga sowie die Aufklärung der Sequenz und Struktur des GnRH-Rezeptors haben zur Entwicklung zahlreicher GnRH-Agonisten und -Antagonisten entscheidend beigetragen [Asta Medica 1996, Asta Medica and Nippon Kayaku Shionogi 1997, Eidne & Anderson 1996, Sealfon & Millar 1995]. Nicht immer zeigen diese meist durch gezielte Sequenzabwandlung abgeleiteten Moleküle jedoch die erwartete Affinität zum GnRH-Rezeptor. Insbesondere Polymere wie Peptide und Proteine besitzen mit ihren Sekundär- und Tertiärstrukturen zusätzliche stabile strukturelle Merkmale, die entscheidend für die Art und Stärke ihrer Wirksamkeit im Organismus sein können. Wichtige Beispiele dafür sind die in der Veterinär- und Humanmedizin bekannten Prionenerkrankungen, bei deren Entstehung Proteine mit korrekter Primärstruktur, jedoch fehlerhafter Faltung, eine wesentliche Rolle spielen [Billeter et al. 1997].

Im Rahmen von Struktur-Wirkungs-Untersuchungen mit Hilfe von Rezeptorbindungsstudien und Molekulardynamik(MD)-Simulationen konnte auch für GnRH und GnRH-Analoga ein Zusammenhang zwischen biologischer Aktivität und Sekundärstruktur gefunden werden [Momany 1976a, Marshall 1993a, Momany 1976b, Momany 1978, Marshall et al. 1995, Nikiforovich 1994, Olma et al. 1994, Freidinger et al. 1980]. Die Bezeichnung „biologisch aktive Konformation“ kennzeichnet diejenige Konformation eines Peptidhormons, die bei der Bindung an den Rezeptor zum Zeitpunkt von dessen spezifischer Reaktion festgestellt wird [Freidinger et al. 1980]. Jedoch liegen Peptide mit flexibler räumlicher Struktur in Lösung oft im Gleichgewicht verschiedener energetisch äquivalenter Konformationen vor und eine Konformationsanalyse der an den Rezeptor gebundenen Peptide war mangels geeigneter Analysemethoden anfangs nicht möglich. Daher wurden für diese Untersuchungen räumlich fixierte GnRH-Analoga synthetisiert. Zur Festlegung bestimmter Raumstrukturen wurden sowohl

sterische Hinderungen [Geiger 1984, Marshall 1993b, Struthers et al. 1990] als auch verschiedene Cyclisierungen [Dutta et al. 1989, Dutta et al. 1993, Rivier et al. 1984, Rivier et al. 1988, Rivier et al. 1990, Seprodi et al. 1978] in die Peptidketten eingeführt. Im Ergebnis dieser Strukturuntersuchungen wurde für biologisch aktive Konformationen ein β -turn zwischen Position 6 und 7 als charakteristisches Merkmal gefunden [Momany 1976a, Freidinger et al. 1980].

Die für GnRH und verschiedene GnRH-Analoga mit Hilfe von NMR-Untersuchungen und MD-Simulationen gefundenen Sekundärstrukturen enthalten zwischen den Positionen 5 und 8 eine β -Haarnadelstruktur, die an 6 und 7 einen β -turn vom Typ II' einschließt [Rizo et al. 1992]. In Abhängigkeit von der Primärstruktur des NH_2 -Terminus wurden in einigen Rechnungen weitere β -turns zwischen den Positionen 1 und 2 sowie zwischen 3 und 4 gefunden [Paul et al. 1989].

Arbeiten von HAVIV et al. mit NMeTyr⁵-substituierten GnRH-Antagonisten [Haviv et al. 1993] führten auf Grund von in vitro- und in vivo-Wirkungsanalysen zu der Vorstellung, dass sich die bioaktiven Konformationen der Peptidketten von Position 5 bis 8 bei GnRH-Antagonisten von dem β -turn der GnRH-Agonisten unterscheiden.

Insgesamt ist festzustellen, dass bislang zwar zahlreiche Modellvorstellungen zur Konformation von GnRH-Analoga in Lösung sowie an den Rezeptor gebunden entwickelt werden konnten, exakte experimentelle Daten zu deren Verifizierung jedoch derzeit nur in geringem Maße zur Verfügung stehen.

Das von uns untersuchte und mittels Komplexbildung zu modifizierende Cetorelix kann als Dekapeptid Merkmale einer Sekundärstruktur, aufgrund seiner zu geringen Größe jedoch keine ausgeprägte Tertiärstruktur ausbilden. Erste Strukturanalysen wurden zu Beginn der 90er Jahre durch die ASTA MEDICA AG durchgeführt [Müller et al. 1994]. Zur Aufklärung der Sekundärstruktur wurden ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von Cetorelix, gelöst in DMSO-d₆, H₂O, H₂O/TFE (Trifluorethanol) und H₂O/SDS (Natriumdodecylsulfat), aufgenommen und analysiert. Dabei konnten die Signale in DMSO-d₆ komplett interpretiert und den entsprechenden Cetorelix-Atomen und -Wechselwirkungen zugeordnet werden. Die Auswertung der Konformationsparameter in den verschiedenen Lösungsmitteln lieferte keine Hinweise auf eine bevorzugte Sekundärstruktur von Cetorelix. Es konnten jedoch für die Peptidbindung zwischen Arg⁸ und Pro⁹ eine trans-Konfiguration sowie in mizellarer Lösung für Leu⁷ eine räumliche Nähe zu den Seitenketten mit aromatischen Ringen Tyr⁵, Phe(4Cl)² und Pal³ festgestellt werden. Dieser Befund wurde als partielle Faltung des Moleküls zwischen den Aminosäuren Tyr⁵ und Arg⁸ interpretiert. Bei den Messungen in wässriger Lösung, die für den Vergleich mit nativen Bedingungen besonders wichtig sind, konnten jedoch wegen der raschen Aggregation zu einer gallertartigen Masse keine Langzeituntersuchungen vorgenommen werden. Trotz der Suche nach einer, durch HAVIV et al. diskutierten [Haviv et al. 1993], Type II' β -turn-Konformation des GnRH-Antagonisten konnten für Cetorelix keine Hinweise auf derartige Strukturelemente gefunden werden. Die Faltung von Cetorelix in andersartige, geordnete Konformationen ließ sich jedoch durch die NMR-Untersuchungen nicht ausschließen.

Da für die Entwicklung und Charakterisierung von Cetorelixkomplexen die Kenntnis der Sekundärstruktur des Pharmakons sehr wesentlich ist, waren eigene Untersuchungen zur Ergänzung dieser bisherigen Sekundärstrukturanalysen erforderlich. Diese wurden von uns mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie und MC-Simulationen durchgeführt.

2.2.4 Aggregation von Cetrorelix

Cetrorelix zeigt als Acetat in wässrigen Lösungen deutliche Aggregationserscheinungen mit sich selbst oder angrenzenden Flächen, die sich makroskopisch als Gelierung der Lösung oder analytisch als Konzentrationsabnahme der Lösung darstellen. Dieser Effekt wird seit Beginn der Untersuchungen an Cetrorelix beobachtet und behinderte u.a. die NMR-Analysen des Peptides in wässriger Lösung erheblich [Müller et al. 1994]. Da derartige Aggregationseffekte durch ihre Existenz und Dynamik nicht nur ein Problem der Cetrorelix-Analytik darstellen, sondern durch Aggregation des Peptides auch Herstellung und therapeutische Anwendung behindert werden, waren Untersuchungen zu Charakterisierung und Quantifizierung der Cetrorelix-Aggregation sowie die Entwicklung von Gegenmaßnahmen unerlässlich.

Besonders die Charakterisierung der Cetrorelix-Aggregate stellte jedoch eine Herausforderung dar. Unsere Untersuchungen mit Hilfe der Kapillarviskosimetrie zeigten, dass die Viskosität aggregierter Lösungen bereits durch den Messvorgang so stark verändert wird, dass eine Auswertung der Messungen nur sehr eingeschränkt möglich ist. Auch die in der biochemischen Analytik oft eingesetzte Flüssigkeitschromatografie erwies sich in Vorversuchen als ungeeignet, da die Cetrorelix-Aggregate irreversibel an die Säule gebunden wurden oder bei ausreichender Elutionsstärke des Laufmittels wieder zerfielen und bei nachfolgender UV-Detektion nur Monomere des Peptides nachgewiesen werden konnten.

Die Aggregation von Peptiden und Proteinen wird auch in vielen anderen Arbeitsgruppen intensiv untersucht [Jaenicke 1995, Holtzer & Hawkins 1996]. Für die Charakterisierung und Verfolgung der Aggregationsprozesse haben sich insbesondere spektroskopische Verfahren, wie Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie [Diem 1995, Xie et al. 1995, Greenfield 1996, Juban et al. 1997], FTIR-Spektroskopie [Torres et al. 1995, Bauer et al. 1994, Swamy et al. 1996] und Fluoreszenz-Spektroskopie [Kanaoka 1977, Steinberg 1971, Ugarova et al. 1995, Jayakumar et al. 1997] bewährt, da sie Strukturveränderungen in Peptiden und Proteinen zerstörungsfrei und mit Messzeiten im Minuten- bis Sekundenbereich detektieren. Diese Fluoreszenz-Spektroskopie erweist sich dabei als wesentlich empfindlicher als die FTIR-Spektroskopie. Es wurden mit dieser Methode bis zu 10^{-8} M, wässrige Lösungen reproduzierbar untersucht. Wie LANG darstellte, ist für die Sensitivität der Fluoreszenzspektroskopie auf Konformationsveränderungen im Cetrorelix die intrinsische Fluoreszenz des aromatischen Ringsystems in der Naphthylalanyl-Seitenkette bestimmend.

Für die Untersuchungen zur Aggregation von Cetrorelix kamen im Rahmen dieser Arbeit FTIR-Spektroskopie sowie Fluoreszenz-Spektroskopie im Vergleich mit CD-spektroskopischen Messungen zur Anwendung.

2.3 Charakterisierung und Entwicklung von Cetrorelixkomplexen

Die Untersuchung der Struktur und Zusammensetzung von bekannten Cetrorelix-Komplexen stand neben der Entwicklung neuartiger Komplexe im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Bislang erfolgte die Charakterisierung derartiger Komplexe hauptsächlich durch Analyse ihrer Zusammensetzung und der Freisetzungsprofile des Wirkstoffes. Darüber hinaus wurden die Beziehung von Hydrophobizität und Freisetzungsverhalten, der Schutz des Wirkstoffes vor enzymatischem Abbau sowie die Morphologie der Komplexe durch MURGAS eingehend untersucht [Murgas 1998]. Die Optimierung des Screenings nach neuen Komplexpartnern und die Vertiefung des Verständnisses der Peptidkomplexe erforderte die Entwicklung neuer Methoden zur Charakterisierung von Komplexeigenschaften mit nachfolgenden Zielstellungen:

- Entwicklung eines pharmakokinetischen Modells für die Freisetzung des Wirkstoffes aus Komplexen,
- Untersuchungen zum Einfluss des stöchiometrischen Verhältnisses zwischen Peptid und Komplexpartner auf die Freisetzungseigenschaften des Komplexes,
- Untersuchung des Ionisationsgrades des komplexgebundenen Partners und
- Untersuchung der Sekundärstruktur des komplexgebundenen Peptides.

Zusätzlich zu diesen Arbeiten war die Technik der bislang am Institut für Biochemie der TU Dresden eingesetzten Liberationsanalyse für eine detailliertere Erfassung des Freisetzungsverlaufes zu verfeinern sowie um ein *in vivo*-angepasstes Freisetzungsmedium zu ergänzen.

2.3.1 Komplexcharakterisierung durch *in vitro*-Liberationssysteme

Für die *in vitro*-Freisetzungsanalyse von Cetrorelix-Komplexen kamen in bisherigen Untersuchungen statische und zunehmend dynamische Liberationssysteme in folgenden Freisetzungsmedien zum Einsatz [Murgas 1998]:

- statische Liberation in 0,01 M Ammoniumacetat, pH=7,0 und
- dynamische Liberation in 0,01 M Ammoniumacetat, 0,1% Tween 80, 0,01% Natriumazid, pH=7,4.

Während bei statischer Liberation die Gleichgewichtskonzentrationen von gelöstem und komplexiertem Wirkstoff beobachtet werden, lässt die dynamische Liberation Aussagen über die Freisetzungskinetik im fließenden System zu. Um dabei die Einflüsse durch den Lösungsvorgang im Freisetzungsmedium möglichst gering zu halten, wird unter Sink-Bedingungen gearbeitet. Dies bedeutet, dass die Konzentration des freigesetzten Wirkstoffes im Medium maximal 20% der Sättigungskonzentration des Wirkstoffes in diesem Medium erreichen darf [Voigt 1993].

Beide Freisetzungssysteme arbeiteten in den bisherigen Liberationen mit Freisetzungsmedien, welche die „Salzfracht“ des Serums *in vivo* nicht berücksichtigten. Da durch eigene Untersuchungen zur Aggregation jedoch der erhebliche Einfluss des Elektrolytes auf die Solubilisierung des Cetrorelix belegt

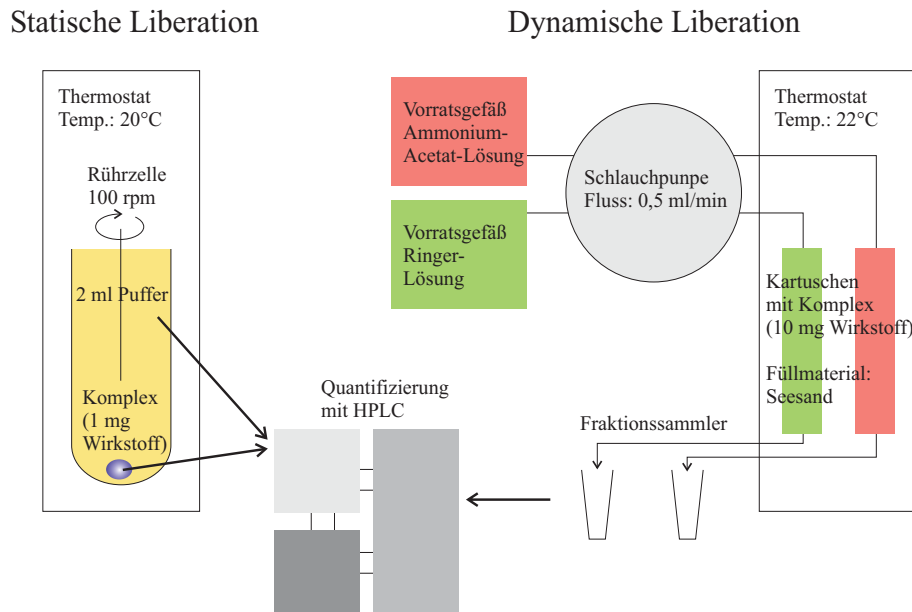


Abbildung 10: Schematischer Aufbau von statischen und dynamischen Liberationssystemen

werden konnte, wurde die Einbeziehung eines in vivo-nahen Elektrolytmodells für das dynamische Liberationssystem erforderlich. In der medizinischen Praxis sind für vergleichbare Anwendungen verschiedenartige Ringerlösungen im Einsatz, die durch ihren Salz- und Proteinanteil die physiologischen Bedingungen modellieren. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, entschieden wir uns für die bei der ASTA MEDICA AG eingesetzte, peptonfreie Ringerlösung aus 8,3 g NaCl, 0,3 g KCl und 0,25 g CaCl₂ pro Liter dest. Wasser (nachfolgend als Ringerlösung bezeichnet).

Tabelle 7: Schema der Sammlung und Quantifizierung der Fraktionen in dynamischen Liberationen

Fraktion Nr.	Fraktionswechselfrequenz	Fraktionsvolumen
Elution mit Ammoniumacetat- bzw. Ringerlösung		
1-12	5 min.	2,5 ml
13-61	1 h	30 ml
Abschlusselution mit 1N HCl		
62-64	10 min.	5 ml

Der prinzipielle Aufbau der eingesetzten statischen und dynamischen Liberationssysteme wird in Abbildung 10 dargestellt. Wegen der höheren Aussagekraft für die Beurteilung des Freisetzungsverhaltens wurden in allen nachfolgenden Untersuchungen keine statischen, sondern durchgehend dynamische Liberationen in Acetatpuffer sowie Ringerlösung durchgeführt. Die Trennung von Cetrorelix und Komplexpartner in den Fraktionen des Eluates sowie die Bestimmung des Cetrorelixgehaltes erfolgten mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie (HPLC). Da in allen vorangegangenen Untersuchungen nur während der ersten 60 Minuten der dynamischen Liberation deutliche Veränderungen des Cetrorelixgehaltes im Freisetzungsmittel beobachtet worden waren, erfolgte die Probenahme nach dem Fraktionierungsschema in Tabelle 7.

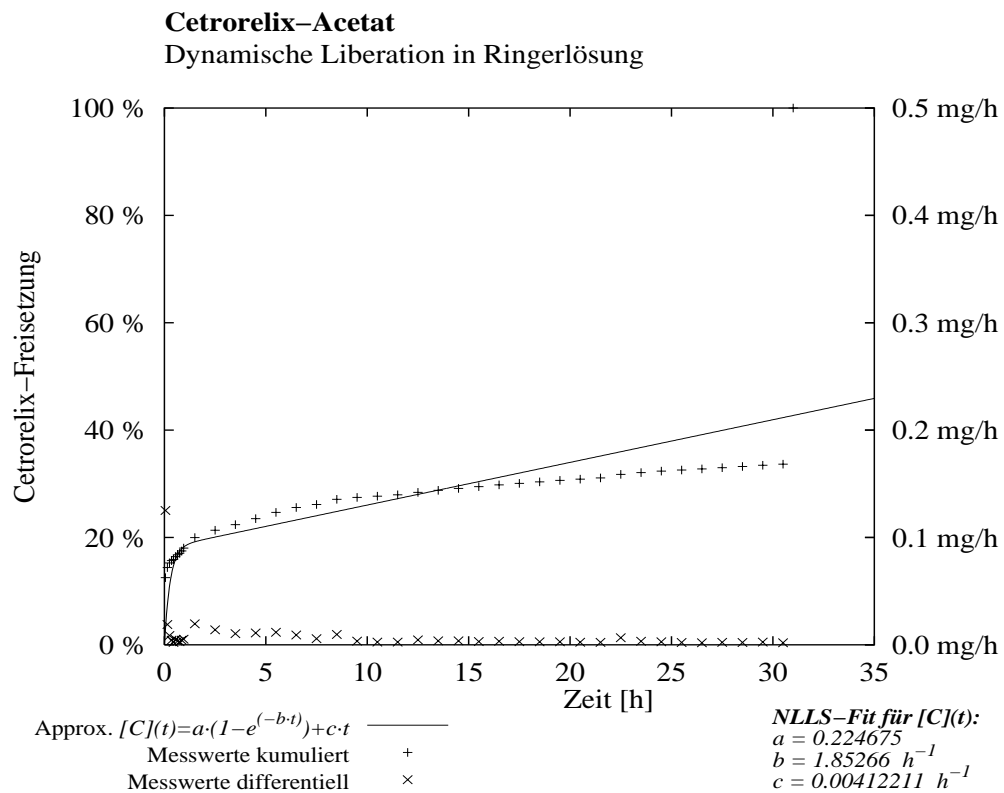
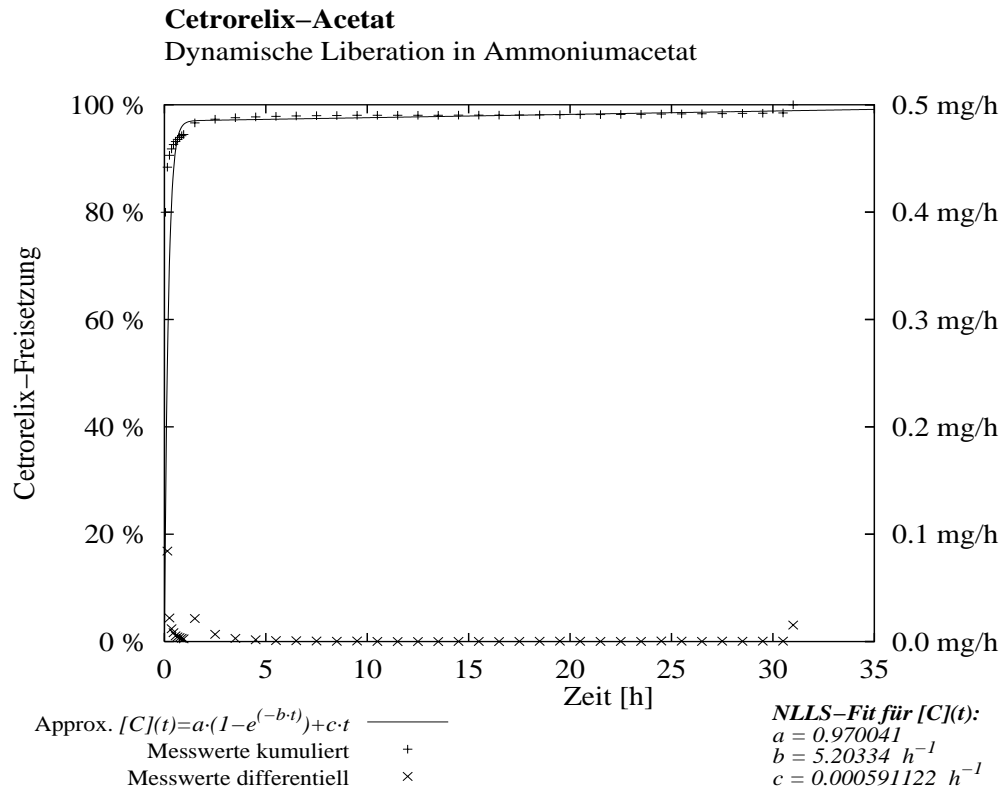


Abbildung 11: Dynamische Liberation von Cetorexil-Acetat in Ammoniumacetat und Ringerlösung

Die Freisetzungsprofile des reinen Wirkstoffes Cetrorelix bei der dynamischen Liberation in Ammoniumacetat und Ringerlösung lassen deutlich den Einfluss des Mediums erkennen (Abb. 11). Während durch das Ammoniumacetat-Medium der Wirkstoff umgehend gelöst und aus der Liberationskartusche gespült wird, verbleibt bei Liberation mit Ringerlösung der Wirkstoff zunächst in der Kartusche und wird stark verzögert sowie in geringen Dosen freigesetzt. Als Ursache für diesen Effekt kommt nach unserem derzeitigen Verständnis nur die starke Aggregation von Cetrorelix, ausgelöst durch die Kationen- und Chloridaktivität der Ringerlösung, in Betracht. Gestützt wird diese Hypothese durch die retardierende Wirkung dieser Ionen in statischen Liberationsversuchen.

2.3.2 Entwicklung eines kinetischen Modells zur Auswertung dynamischer Liberationsanalysen

Die Auswertung der dynamischen Liberationen wurde in bisherigen Untersuchungen [Murgas 1998] durch direkten Vergleich der Freisetzungsprofile verschiedener Cetrorelixkomplexe oder die Diskussion der Halbwertszeiten t_{50} vorgenommen. Mit der Etablierung des Liberationsverfahrens in zwei Freisetzungsmedien als Standardmethode für die Charakterisierung der Komplexe war diese Auswertungstechnik durch ein pharmakokinetisches Modell zur Beschreibung des Freisetzungsverlaufes zu ergänzen. Generell ist der wichtigste Parameter für die Freisetzung fester Wirkstoffe in flüssigen Medien die Oberfläche des Festkörpers. Zwischen ihrer Größe und der Rate des pro Zeiteinheit freigesetzten Wirkstoffes besteht nach HIXSON und CROWELL ein Zusammenhang der Form [Scheler 1989]:

$$-\frac{d[C]}{dt} = k \cdot S \cdot (c_S - c)$$

Hierbei sind $[C]$ der gelöste Anteil des Wirkstoffes, t die Zeit, k die Geschwindigkeitskonstante des Transportprozesses, S die Oberfläche des Festkörpers, c_S die Konzentration der sich lösenden Substanz auf der Feststoffseite der Diffusionsschicht und c die Konzentration des Wirkstoffes im Solvens. Derartige Zusammenhänge sind typisch für alle chemischen Prozesse, in denen Transportvorgänge dominieren, so z.B. heterogene Reaktionen oder Phasenbildung und -auflösung [Schwabe 1975]. Im Falle der dynamischen Liberation können wegen des konstanten Flusses des Eluenten und der sofortigen Elution des gelösten Wirkstoffes $c = 0$ sowie $c_S = const.$ gesetzt werden. Man erhält somit eine lineare Abhängigkeit der Wirkstoffliberation $d[C]$ von der Festkörperoberfläche S :

$$-\frac{d[C]}{dt} \sim S$$

Damit ist das Zeitgesetz einer dynamischen Liberation einzig von einer geometrischen Größe abhängig, die in unseren Untersuchungen nicht direkt zugänglich ist. Nur durch Konstanz der Herstellungs-, Probenvorbereitungs- und Analysebedingungen ist die Reproduzierbarkeit der Liberationsergebnisse überhaupt erreichbar.

Die Formulierung eines exakten Zeitgesetzes für die dynamische Liberation ist wegen der fehlenden Daten über die Oberfläche der Komplexe derzeit noch nicht möglich. Selbst bei Annahme einer exakten Kugelform und einer gleichzeitigen Solubilisierung von Wirkstoff und Komplexpartner führt die Berücksichtigung der Aggregatbildung und -auflösung sowie der Transportprozesse zu einem komplexen Mechanismus, dessen Zeitgesetz als komplizierte Differentialgleichung nicht mehr geschlossen integrierbar ist. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Cetrorelix-Komplexen vor und nach Liberationen durch MURGAS [Murgas 1998] zeigten je nach Komplexpartner Oberflächenveränderungen unterschiedlicher Art. Beobachtet wurden sowohl flächige Ablösung als auch skelettartige Gerüste, aus deren Matrix der Wirkstoff herausgelöst wurde.

Um dennoch mit den vorliegenden experimentellen Daten ein pharmakokinetisches Modell formulieren zu können, sind daher in starker Vereinfachung zwei mögliche und je nach Komplexpartner und Aggregationsgrad konkurrierende Elementarzusammenhänge anzunehmen:

- $S = const.$: Unabhängigkeit der Komplexoberfläche vom Auflösungsgrad in skelettartigen Gerüsten, aus denen Cetrorelix herausgelöst wird, und
- $S \sim [C]$: Abhängigkeit der Komplexoberfläche vom Auflösungsgrad in amorphen Komplexen, die sich flächig auflösen und dabei verkleinern.

Diese Annahmen über die elementaren Zusammenhänge der dynamischen Liberation von Komplexen lassen sich analog chemischen Reaktionen 0. Ordnung (unter Annahme unbegrenzter Menge $[C]$) und 1. Ordnung sehr einfach formulieren [Schwetlick et al. 1982]:

$$-\frac{d[C]}{dt} = k, \text{ differentielles Zeitgesetz für Reaktionen 0. Ordnung,}$$

$$-\frac{d[C]}{dt} = k \cdot [C], \text{ differentielles Zeitgesetz für Reaktionen 1. Ordnung.}$$

Die Addition und Integration dieser Zeitgesetze führt zu einem einfachen Zusammenhang, mit dem die freigesetzte Wirkstoffmenge in dynamischen Liberationen approximiert werden kann:

$$-\frac{d[C]}{dt} = k_1 \cdot [C] + k_2$$

$$[C] = \int_{t=0}^{t=\infty} k_1 \cdot [C] \cdot dt + \int_{t=0}^{t=\infty} k_2 \cdot dt$$

$$[C] = a \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) + c \cdot t \quad (1)$$

Gleichung 1: Kombiniertes Zeitgesetz für dynamische Liberationen von Cetrorelix-Komplexen

Hierbei sind a , b und c versuchs- und substanzabhängige Parameter, die sich aus Anfangsparametern, Geschwindigkeits- und Integrationskonstanten zusammensetzen. In Analogie zu den integrierten Zeitgesetzen chemischer Elementarreaktionen lassen sich jedoch folgende Beziehungen zur Anfangsoberfläche S_0 sowie den beiden Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 feststellen [Schwetlick et al. 1982]:

$$a \sim S_0$$

$$b \sim k_1$$

$$c \sim k_2$$

Somit lassen sich bei konstanten Bedingungen für die Komplexpräparation und -liberation das Verhältnis x_F flächenabhängiger und flächenunabhängiger Freisetzung als x_F :

$$x_F = \frac{b}{c}$$

sowie im Vergleich verschiedener Liberationsversuche (a_1 , a_2) mit flächenabhängigem Freisetzungprofil die Verhältnisse x_S der Anfangsoberflächen S_0 als x_S abschätzen:

$$x_S = \frac{a_1}{a_2}$$

Tabelle 8: Freisetzungstypen in dynamischen Liberationen und Beispiele ihrer Parameter a , b und c ihrer kombinierten Zeitgesetze (t_{50} lässt sich für den kombinierten Freisetzungstyp nur mit numerischen Modellen ermitteln)

Freisetzungstyp	Parameter a	Parameter b [h^{-1}]	Parameter c [h^{-1}]	Halbwertszeit t_{50}
flächenabhängig	$a \sim 1$	$b \sim 1$	$c \sim 0,001$	$\frac{\ln 2}{b}$
kombiniert	$a \sim 0,3$	$b \sim 1$	$c \sim 0,01$	
linear	$a \sim 0,1$	$b \sim 0,1$	$c \sim 0,015$	$\frac{1}{2c}$

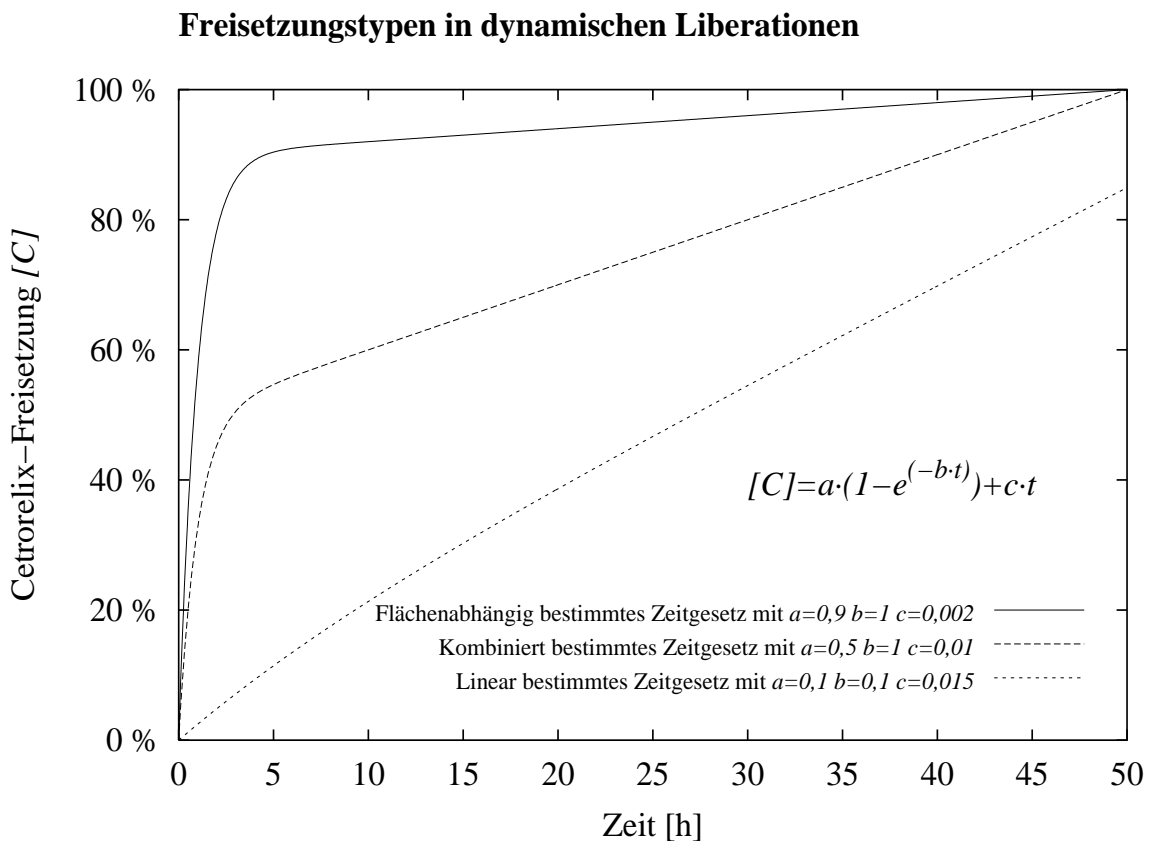


Abbildung 12: Beispiele für Freisetzungstypen in dynamischen Liberationen

Anhand der variablen Wertebereiche für die Parameter a , b und c lassen sich darüber hinaus drei verschiedene Freisetzungstypen postulieren: flächenabhängig, kombiniert sowie linear dominierte Freisetzungen (Tab. 8 und Abb. 12). Die Ermittlung von a , b und c erfolgte für alle Liberationen wegen dessen guter Konvergenz auch bei nicht optimalen Startwerten durch nichtlineares Least-Square-Fitting (NLLS) der gemessenen Cetorelixkonzentrationen gegen Gleichung 1 (S. 33) mit Hilfe der Verfahrens nach MARQUARDT-LEVENBERG [Marquardt 1963, Thevenaz & Unser 1998] mit den Startwerten $a = b = c = 0, 1$. Hierbei ist zu beachten, dass der Parameter c nur für jene Liberationen mit Relevanz zu bestimmen ist, die über den gesamten Liberationsverlauf eine Freisetzung von Wirkstoff zeigen. Wird wie bei Cetorelix-Acetat in Ammoniumacetat bereits während der Liberation die vollständige Freisetzung von 100% erreicht, lässt sich wegen der fehlenden Differenzierbarkeit der realen Zeitfunktion bei 100% der linear verlaufende Term nicht approximieren. In diesen Fällen muss daher die obere Grenze des Zeitintervalls auf den Zeitpunkt der vollständigen Freisetzung verkleinert werden.

2.3.3 FTIR-Untersuchungen zu Struktur und Stöchiometrie von Cetorelix-Komplexen

Bereits 1995 wurde durch die ASTA MEDICA AG die Komplexierung von Cetorelix mit Embonsäure in einer internen Analyse untersucht [Müller & Knaack]. Man verstand den Vorgang als Salzbildung, konnte jedoch wegen des damals extrem teuren Peptides und den in wässrigen Medien schwer löslichen Peptidbase und Embonsäure keine Titrationsanalysen durchführen. Man entschied sich vielmehr für NMR-spektroskopische Untersuchungen in DMSO- d_6 , indem die freie Peptidbase mit zunehmenden Konzentrationen Embonsäure versetzt und NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Aus der relativen Veränderung der ^1H -, ^{13}C - und H,C-COSY-Spektren wurden Schlüsse auf den Bindungszustand gezogen. Die untersuchten molaren Verhältnisse Cetorelix:Embonsäure betragen 4,2:1 bis 1:2. Zusammenfassend wurden folgende Einsichten in die Bindungsverhältnisse der Komplexe erhalten [Müller & Knaack]:

- Die ersten Anreicherungen mit Embonsäure führten zu Veränderungen bei Tyr, Arg, Cit und durch Nachbarschaftseffekte bei Leu. Dabei schienen pH-Änderungen die Hauptursache zu sein. Eine bevorzugte Bindungsregion der Embonsäure wurde nicht ausgeschlossen.
- Das 2:1-Verhältnis zeigt die schärfsten Signale in den NMR-Spektren. Die Signale der aromatischen und aciden Protonen im ^1H -NMR-Spektrum wiesen auf geringen oder keinen Austausch hin.
- Bei den Verhältnissen 2:1, 1:1 und 1:2 wurden große Veränderungen der Embonsäure- und Pyridylalaninsignale registriert. Dies könnte Hinweise auf eine Komplexierung mit Embonsäure geben.

Diese NMR-Untersuchungen bildeten den Ausgangspunkt für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zur Komplexzusammensetzung.

2.4 Molecular Modeling

2.4.1 Grundlagen des Molecular Modeling

Ziel des Molecular Modeling ist die Simulation chemischer Zustände, Prozesse und die Beschreibung von deren Eigenschaften mit Hilfe mathematischer Modelle. Zu diesem Zweck existieren heute zahlreiche Konzepte, Verfahren und Softwareprodukte. Diese reichen von allgemein einsetzbaren und sehr verbreiteten Programmen bis hin zu spezialisierten Techniken zur Lösung eng begrenzter Fragestellungen.

Eine Gemeinsamkeit sehr vieler Verfahren des Molecular Modeling ist die Berechnung von Energien. Deren Analyse ermöglicht die Vorhersage molekularer Prozesse, die in einem bestimmten System ablaufen können oder werden. In der Regel wird dabei der Zustand mit der niedrigsten Energie als der stabilste angesehen. Da die Energie eines Moleküls eng mit dessen Konformation verknüpft ist, bedeutet die Suche nach der Vorzugskonformation das Identifizieren derjenigen Molekülkonformation mit der niedrigsten Energie [Young 2001].

Die Energie eines molekularen Systems wird meist in kinetische und potentielle Energie geteilt. Zur kinetischen Energie tragen z. B. Vibrations-, Translations- und Rotationsbewegungen bei, während die potentielle Energie durch die Energie u.a. durch chemischer Bindungen, van der Waals-, Coulomb- und Wasserstoffbrückenwechselwirkungen gebildet wird. Die Berechnung der Energieanteile eines molekularen Systems beruht meist auf einem der grundlegenden Verfahren der Computerchemie:

- ab initio-Methoden und density functional theory (DFT),
- semiempirisch-quantenmechanische Methoden und
- molecular mechanics.

Diese Verfahren beschreiben ein molekulares System sehr unterschiedlich. Während ab initio- und DFT-Verfahren alle Elektronen eines Atoms explizit modellieren, beschränken sich semiempirische und molecular mechanics-Verfahren auf vereinfachte Atommodelle und vereinfachen damit den Berechnungsaufwand erheblich. Da die Vereinfachungen jedoch nicht universell, sondern stets nur für bestimmte Rahmenbedingungen vorgenommen werden können, existieren mittlerweile zahlreiche semiempirische und molecular mechanics-Verfahren für unterschiedlichste Einsatzgebiete.

2.4.2 Energieberechnung von Biomolekülen mit Kraftfeldverfahren

Aufgrund ihrer Größe kann die Energie von Biomoleküle nur selten mit ab initio- und DFT-Verfahren, und meist auch nicht mit semiempirisch-quantenmechanischen Verfahren berechnet werden. Daher kommen für die Simulation von Biomolekülen und deren Umgebung oft Methoden der molecular mechanics auf der Basis von Kraftfeldern zum Einsatz.

Die Energie eines Moleküls wird durch Kraftfeldverfahren auf der Basis einfacher algebraischer Gleichungen berechnet. Die Konstanten in diesen Gleichungen stammen aus ab initio-Berechnungen oder spektroskopische Untersuchungen. Ein Satz derartiger Gleichungen und die dazugehörigen Konstanten werden als Kraftfeld bezeichnet. In Kraftfeldern werden einige grundsätzliche Annahmen zur Beschreibung der molekularen Energie gemacht:

- Atome sind als Punktmassen verschiedener chemischer Elemente mit einer partiellen elektrischen Ladung beschreibbar,
- chemische Bindungen sind gerichtete Kräfte zwischen Atomen, die durch Potenzialfunktionen beschrieben werden,
- nichtbindende Wechselwirkungen existieren nur zwischen Atomen und werden durch Potenzialfunktionen beschrieben,
- die Parameter der Potenzialfunktionen sind zwischen verschiedenen Molekülen im Rahmen der Gültigkeit des Kraftfelds übertragbar und
- die unterschiedlichen molekularen Umgebungen und Bindungszustände der Atome eines Elements lassen sich durch Definition von Atomtypen mit unterschiedlichen Potenzialparametern abstrahieren.

Die Ausgangsgröße für eine Kraftfeldberechnung ist eine molekulare Struktur, in der Ort und Ladung der Atome sowie die chemischen Bindungen zwischen diesen Atomen beschrieben werden. Nach den Regeln des Kraftfeldes sind allen Atomen zunächst Atomtypen zuzuordnen. Dabei werden für die jeweiligen chemischen Elemente Oxidationsstufe, Hybridisierung, die Bindungen des Atoms sowie die Bindungspartner in Form verschiedener Atomtypen berücksichtigt. Danach werden mit den Kraftfeldparametern für diese Atomtypen und deren Kombinationen folgende Potenzialfunktionen berechnet [Young 2001]:

1. bindende Wechselwirkungen (intramolekulare Wechselwirkungen entlang chemischer Bindungen):

- Bindungslängendeformation (bond stretching),
- Bindungswinkeldeformation (bond angle bending),
- Diederwinkeldeformation (dihedrals),
- Inversion,
- Kreuzterme mit bindenden Wechselwirkungen,

2. nichtbindende Wechselwirkungen (intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zwischen nicht chemisch gebundenen Atomen):

- van der Waals-Wechselwirkungen (Dispersion zwischen permanenten, induzierten, fluktuierenden Dipolen),
- Coulomb-Wechselwirkungen zwischen elektrisch geladenen Teilchen und
- spezielle Wechselwirkungen, wie z. B. Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Summe aller Wechselwirkungen im gesamten molekularen System ergibt die Kraftfeldenergie dieses Systems.

Die Voraussetzung für die Anwendung eines Kraftfeldes bei der Energieberechnung eines molekularen Systems ist neben der Gültigkeit des Kraftfeldes (Existenz von Atomtypen des Kraftfeldes für alle

Atome des Systems) für dieses System die Vollständigkeit der Kraftfeldparameter für alle Potenziale des Systems. Insbesondere bei substituierten Molekülen ist dies jedoch nicht immer gewährleistet. Als Variablen eines molekularen Systems in einem definierten Bindungszustand verbleiben die Partialladungen der Atome und die Konformation der Moleküle sowie deren Lage zueinander.

Für die Simulation von Biomolekülen wurden zahlreiche Kraftfelder entwickelt, z. B.:

- AMBER (Assisted model building with energy refinement) für Proteine und Nukleinsäuren [Weiner & Kollman 1981],
- CHARMM (Chemistry at Harvard macromolecular mechanics) für Proteine, Nukleinsäuren und weitere Biomoleküle [Brooks et al. 1983],
- CHEAT (Carbohydrate hydroxyls represented by external atoms) für Kohlehydrate [Kouwijzer & Grootenhuys 1995],
- DREIDING für bioorganische Moleküle [Mayo et al. 1990],
- ECEPP (Empirical conformational energy program for peptides) für Peptide [Momany et al. 1975],
- EFF (Empirical force field) für Kohlehydrate [Bixon & Lifson 1967],
- GROMOS (Groningen molecular simulation) für Biomoleküle und Solvents [van Gunsteren et al. 1998],
- MM1, MM2, MM3, MM4 für organische Moleküle [Allinger et al. 1989],
- MMFF (Merck molecular force field) für organische Moleküle [Halgren 1992],
- MOMEK für Übergangsmetall-Koordinationsverbindungen [Bernhardt & Comba 1992],
- OPLS (Optimized potentials for liquid simulation) für Biomoleküle und Solvents [Jorgensen & Tirado-Rives 1988],
- TRIPOS für organische und bioorganische Moleküle [Clark et al. 1989],
- UFF (Universal Force Field) für universelle Anwendung mit Parametern für alle Elemente [Rappe' et al. 1992] und
- YETI für Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen und kleinen Substratmolekülen [Vedani 1988].

Die Auswahl eines Kraftfeldes für die Lösung einer Simulationsaufgabe stellt stets einen Kompromiss zwischen optimalem Anwendungsbereich und kompletter Parametrisierung dar. Daher dienen als Ausgangspunkt der Auswahl meist publizierte Simulationen von vergleichbaren Molekülen. Zur Bestätigung werden Validierungen von Testrechnungen mit experimentellen Ergebnissen oder Resultaten anderer Berechnungsverfahren durchgeführt.

2.4.3 Werkzeuge für die Modellierung isolierter Moleküle

In der praktischen Anwendung von Verfahren des Molecular Modeling werden oft Rückschlüsse auf makroskopische Eigenschaften bezweckt. Dazu ist es erforderlich, nicht nur die Energie einer bestimmten Molekülgeometrie, sondern die Eigenschaften vieler Moleküle in vielen Konformationen zu berechnen. Bei der Simulation derartiger Ensembles stellt jedoch nicht die statistische Mechanik das Hauptproblem dar, sondern die Gewinnung der Informationen über alle möglichen Energiestufen, Konformationen, Ladungsverteilungen usw. Für diese Aufgabe existieren drei verbreitete Lösungsansätze: Systematische Konformationssuche, Molecular dynamics (MD)- und Monte Carlo (MC)-Simulationen:

1. Die systematische Konformationssuche tastet den gesamten Konformationsraum eines molekularen Systems durch Rotation der Bindungstorsionswinkel in einem vorzugebenden Raster ab. Da die Anzahl der Konformere mit der Potenz der rotierbaren Bindungen ansteigt, ist dieses Verfahren für größere Moleküle nur mit wenigen Torsionswinkeln realisierbar.
2. MC-Simulationen basieren auf dem Prinzip des random sampling, d. h. der Durchführung von Zufallsexperimenten. Mathematisch wird dies durch Algorithmen zur Generierung von Zufallszahlen ermöglicht. Zur Konformationssuche wird wie bei MD-Simulationen ein Ausgangszustand aus Anfangspositionen und -partialladungen definiert und die Energie dieses Zustandes berechnet. Danach wird die Geometrie des Systems in zufälliger Weise geändert, meist durch Rotation der Bindungstorsionswinkel um einen zufälligen Wert. Nach erneuter Berechnung der Energie dieses Zustandes kann durch Akzeptanzkriterien (Energieschranke, Metropolis-kriterium) der neue Zustand gespeichert oder verworfen werden. Nach vielfacher Wiederholung von Geometrieänderung, Energieberechnung und Akzeptanztest entsteht ein Ensemble von Konformationen und deren Kraftfeldenergien zur späteren Analyse.
3. Die stochastisch gesteuerte Konformationssuche berechnet das zeitabhängige Verhalten eines molekularen Systems, wie Vibrationen oder Brownsche Bewegungen, durch numerische Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen. Ausgehend von einem Anfangszustand, bestehend aus Anfangspositionen, -partialladungen und -geschwindigkeiten der Atome, werden meist durch Kraftfeldverfahren die Kräfte zwischen den Atomen sowie die Gesamtenergie des Systems berechnet und in neue Positionen und Geschwindigkeiten umgesetzt. Dieser Zeitschritt wird dann vielmals wiederholt, wobei die Koordinaten und Energien des Systems in Abhängigkeit von der Zeit als Trajektorien für die spätere Analyse gespeichert werden.

Alle in den beschriebenen Verfahren erzeugten Konformationen können mit Hilfe von Optimierungsalgorithmen zu energieärmeren Konformation transformiert werden. Ziel kann dabei das Erreichen eines energetischen Minimums oder lediglich das Verbessern sehr energiereicher Konformationen sein. Für die Optimierung existieren zahlreiche mathematische Verfahren mit unterschiedlichen Konvergenz- und Geschwindigkeitsverhalten. Nur vom Ergebnis der Energiefunktion selbst gehen die einfachen, aber rechenaufwändigen und langsam konvergierenden Simplex-Verfahren aus, indem sie die ersten Ableitungen der Energie nach den zu optimierenden Variablen minimieren. Wegen ihrer Robustheit kommen sie meist als erster Schritt einer Energieoptimierung zum Einsatz, wenn die Struktur noch weit vom Optimum entfernt ist. Bessere Konvergenz und schnellere Ergebnisse bei geringerer Robustheit liefern die Gradientenmethoden, z. B. conjugate gradient, welche die Energiefunktion und Listen von deren Gradienten für die Minimierung nutzen. Die schnellste Konvergenz kann mit

Newton-Methoden erreicht werden, indem die Energiefunktionen mit deren erster und approximierter (quasi-Newton-Methoden, z. B. Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno-, kurz BFGS-Methode) oder exakter (Newton-Methoden) zweiter Ableitung berechnet werden. Wegen des bei zunehmender Variablenzahl quadratisch ansteigenden Rechenaufwandes werden Newton-Methoden oft nur für die letzten Minimierungsschritte nahe der Minimumsstruktur verwendet.

Neben der Konformation der zu berechnenden Moleküle sind die partiellen Ladungen der Atome eine weitere wichtige Ausgangsgröße für die Berechnung der Kraftfeldenergie. Die Zuordnung der Partiaalladungen zu den Atomen kann auf zwei Wegen erfolgen:

- Zuordnung einer partiellen Ladung in Abhängigkeit von Atomtyp und molekularer Umgebung anhand von Ladungstemplates (analog der Zuordnung von Kraftfeldtypen) und
- explizite Berechnung der partiellen Ladungen für alle Atome mit einem mathematischen Algorithmus.

Während die Zuordnung von tabellierten Ladungen z. B. der Aminosäuren oder Nukleotide bei Polymeren wie Proteinen und Polynukleotiden gute Ergebnisse liefert, weichen in substituierten oder solvatisierten Molekülen die Partiaalladungen teilweise erheblich von denen in Vergleichsmolekülen ab. Quantenchemische Berechnungen können zwar die Ladungsverteilung im Molekül liefern, bei sehr großen Molekülen werden jedoch alle orbitalbasierenden Berechnungsverfahren sehr rechenintensiv. Eine orbitalbasierende Methode zur Berechnung der Partiaalladungen für große molekulare Systeme mit definierter Konformation und Moleküllage ist die charge equilibration nach [Rappe' & Goddard 1991]. Hierbei werden die Ladungen durch einen Elektronegativitätsausgleich bestimmt. Alternativen zur charge equilibration sind die Verfahren nach GASTEIGER, PULLMANN oder DEL RE.

2.4.4 Modellierung molekularer Umgebungen

Neben der intramolekularen Stabilisierung von Molekülen tragen intermolekulare Wechselwirkungen entscheidend zur Gesamtenergiebilanz bei. Für die Berechnung von molekularen Aggregaten oder Solvationseffekten ist daher deren Betrachtung unerlässlich. So kann z.B. für Peptide die Solvation durch ihre selektive Ausprägung in Abhängigkeit von der Raumstruktur des solvatisierten Peptides für dessen Bevorzugung bestimmter Konformationen verantwortlich sein. Die Berechnung von Solvationseffekten und molekularen Aggregaten stellt jedoch schon aufgrund der Vielzahl der so wechselwirkenden Moleküle eine besondere Herausforderung dar, die spezialisierte Berechnungsmethoden erforderlich macht.

Für die Simulation molekularer Umgebungen wurden je nach Anwendungsziel zahlreiche Verfahren entwickelt. Für die in dieser Arbeit wesentliche Beschreibung molekularer Aggregate und deren Solvation sind jedoch zwei Ansätze besonders interessant:

- explizite Simulation molekularer Aggregate durch Generierung molekularer Packungen aus beliebigen Molekülen und
- implizite Solvation mit Hilfe von Kontinuumsverfahren.

Während die Generierung molekularer Packungen aus beliebigen Molekülen für die Simulation der Komplexe von Cetrorelix und Partnermolekülen benötigt wird, verspricht die Nutzung von Kontinuumsverfahren zur Solvation eine wenig rechenzeitintensive Aussage zur Solvatisierbarkeit von Cetrorelixkomplexen.

2.4.4.1 Generierung molekularer Packungen mit EVOCAP

Als Basis für den Aufbau molekularer Packungen auf atomistischem Niveau mit EVOCAP dient der Positionierungsalgorithmus von BLANCO [Blanco 1991]. Dieses Verfahren beschreibt Moleküle und Molekülcluster als geometrische Körper mit starrem Volumen. Die Oberfläche dieser Körper wird durch die van der Waals-Radien der an der Oberfläche positionierten Atome gebildet. Der Aufbau eines Molekülclusters aus zwei Ausgangsmolekülen oder -clustern wird in mehreren Schritten durchgeführt:

1. Positionierung beider Moleküle oder -cluster im Zentrum eines kartesischen Koordinatensystems, wobei je ein Atom beider im Koordinatenursprung liegt,
2. zufallsgesteuerte Orientierung des zweiten Moleküls oder -clusters in den drei Raumachsen,
3. zufällige Wahl eines Bewegungsvektors vom Koordinatenursprung aus und
4. Bewegung des zweiten Moleküls oder -clusters entlang des Bewegungsvektors, bis die beiden Oberflächen sich nur noch in einem Punkt berühren.

Werden nach dem Aufbau eines Molekülclusters mit Hilfe eines Kraftfeldverfahrens die intra- und intermolekulare Energien des Clusters berechnet, erhält man die Zielgröße eines Optimierungsprozesses, der analog dem random sampling bei der Konformationssuche durchgeführt werden kann. Als Variablen des random sampling können neben der Lage der Ausgangsmoleküle sowie dem Translationsvektor auch die Konformation der Einzelmoleküle dienen. Somit lässt sich der Nachteil der Nutzung starrer Moleküle durch Einsatz von repräsentativen Konformationssets dieser Moleküle zu einem großen Teil ausgleichen.

Das EVOCAP-Verfahren und seine Anwendung für die Simulation molekularer Aggregate in Form der Software EVOCAP wurden in den vergangenen Jahren durch DRACHE et al. an der TU Clausthal intensiv entwickelt [Schmidt-Naake et al. 1998] und finden sich u.a. in [Reichel 2001] detailliert dokumentiert. EVOCAP ist derzeit eine stapelorientierte Software mit TCL-Schnittstelle für die Erzeugung von Packungen mit konstanter, durch Restriktionen determinierter oder variabler Molekülanzahl. Eine universelle Kraftfeldimplementierung ermöglicht die Berechnung intra- und intermolekularer Wechselwirkungsenergien auf der Basis externer Parametersätze. Durch integrierte Optimierungsverfahren ist eine lokale und globale Optimierung der Molekülcluster möglich. Zur Berechnung von Partialladungen im gesamten Molekülcluster besitzt EVOCAP eine erweiterte Implementierung des charge equilibration-Verfahrens nach RAPPÉ und GODDARD [Rappe' & Goddard 1991].

2.4.4.2 Implizite Solvatation mit dem GB/SA-Verfahren

Kontinuumsverfahren beschreiben die Wechselwirkung eines molekularen Systems mit einem Solvent durch Einbettung in ein kontinuierliches Medium, das den Eigenschaften des Solvents möglichst nahekommt. Diese Verfahren erlauben sehr kurze Berechnungszeiten, stellen jedoch nur eine grobe Annäherung an die Realität dar. Differenzierte Wechselwirkungen des Solut mit dem Solvent im Nahbereich, wie die winkelabhängige Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, lassen sich mit Kontinuumsverfahren nicht berücksichtigen. Jedoch stellen sie bei größeren Modellsystemen oft die einzige Möglichkeit dar, überhaupt eine Solvatation zu simulieren.

Ein schnelles und für Biomoleküle mit Erfolg erprobtes Verfahren für die Berechnung der absoluten freien Hydratationsenergie aller Konformere ist das 1990 von STILL et al. erstmals vorgestellte GB/SA-Verfahren [Still et al. 1990], welches die Solvatationsenthalpie organischer Moleküle in Wasser mit guter Genauigkeit beschreibt [Carlson et al. 1993, Schrödinger 1999, Carlsson 1998]. Das GB/SA-Verfahren ermittelt die Solvatationsenthalpie G_{sol} aus einem Term für das Ausschlussvolumen Solvent-Solvent G_{cav} , einem van der Waals-Term Solute-Solvent G_{vdW} und einem elektrostatischen Polarisations-term Solute-Solvent G_{pol} :

$$G_{sol} = G_{cav} + G_{vdW} + G_{pol}$$

Unter Berücksichtigung der linearen Abhängigkeit der Solvatationsenthalpie G_{sol} von der für das Solvent zugänglichen Oberfläche SA , werden G_{cav} und G_{vdW} gemäß folgender Gleichung berechnet:

$$G_{cav} + G_{vdW} = \sum \sigma_k SA_k$$

Hierbei ist σ_k ein empirischer atomarer Solvatationsparameter der Atome von Typ k mit einem Wert von $+7.2 \text{ cal}/(\text{mol}\text{\AA}^2)$ bzw. $+3014 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{nm}^2)$ für alle Atomtypen. Die für das Solvens zugängliche Oberfläche SA wird durch eine über die Moleküloberfläche gerollte Kugel definiert, die mit ihrem Radius als Modell für das Lösungsmittel dient. Die Bestimmung von SA basiert auf dem klassischen CONOLLI-Algorithmus [Hasel et al. 1988]. Der Term G_{pol} wird aus den Partikelabständen r , Partialladungen q sowie BORN-Radien α im Medium mit der Dielektrizitätskonstante ϵ über einen Abstandsterm f_{GB} und Exponenten D berechnet:

$$G_{pol} = -166 \left(1 - \frac{1}{\epsilon} \right) \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{q_i q_j}{f_{GB}}$$

$$f_{GB} = \sqrt{r_{ij}^2 + \alpha_{ij}^2} e^{-D}$$

$$\alpha_{ij} = \sqrt{\alpha_i \alpha_j}$$

$$D = \frac{r_{ij}^2}{(2\alpha_{ij})^2}$$

Der BORN-Radius α_i eines geladenen Atoms i wird numerisch durch die Bestimmung von $G_{pol(i)}$ in einem kontinuierlichen, dielektrischen Medium unter der Annahme aller anderen Atome als neutral für jedes Atom einzeln berechnet.

2.4.5 Sekundärstrukturanalyse von Cetreorelix mit MC-Simulationen

Für die Untersuchung der Raumstruktur sowie zahlreicher weiterer Eigenschaften von Polypeptiden besitzen Modellrechnungen eine lange Tradition und stetig zunehmende Bedeutung. Im Rahmen der Diplomarbeit von RATTEI [Rattei 1995] wurden die für die Konformationsanalyse von Cetreorelix geeigneten Modellierungsverfahren eingehend untersucht und erste Berechnungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass für Cetreorelix sowohl die Moleküldynamik als auch die Konformationsuche mit Raster- oder stochastischer Variation der Torsionswinkel im Molekül Informationen über die verschiedenen, möglichen Raumstrukturen des Moleküls liefern. Die Berechnung des energetischen Zustands

der Moleküle kann aufgrund der Größe von Cetrorelix und dessen Komplexen jedoch nur mit Hilfe von Kraftfeldverfahren durchgeführt werden. Semiempirische und ab initio-Verfahren sind aufgrund des mit steigender Atomanzahl drastisch zunehmenden Rechenaufwandes derzeit für diese Modellgröße nur auf Hochleistungsrechnern für ausgewählte Berechnungen einsetzbar.

Für die Weiterführung der in [Rattei 1995] begonnenen Arbeiten und die Untersuchung der Sekundärstruktur von Cetrorelix auch in wässriger Lösung war zunächst ein geeignetes Verfahren der Konformationssuche auszuwählen. Die Technik der Konformationssuche mit stochastischer Variation der Torsionswinkel („Random Sampling“) bot gegenüber der Moleküldynamik den entscheidenden Vorteil, dass wegen der entfallenden Kraftberechnungen bei gleichem numerischen Aufwand wesentlich mehr Konformere erhalten werden. Das Random Sampling wurde daher gegenüber systematischer Suche und Boltzmann-Jump ausgewählt, weil so der Konformationsraum des Peptidmoleküls mit einer Vollständigkeit erfasst und analysiert werden kann, die nur von der Anzahl der generierten Strukturen sowie dem verwendeten Kraftfeld und Optimierungsverfahren abhängig ist. Dies ist mit anderen Verfahren, wie der Variation der Torsionen im Raster oder dem Boltzmann-Jump, schwieriger sicherzustellen. Diese gehen entweder von einer vorher zu definierenden Rastergröße aus bzw. wurden vor allem für die schnelle Suche nach einem globalen Minimum der Konformationsenergie entwickelt [Weber 1997].

Wegen der großen Datenmengen werden die Ergebnisse der Konformationssuchen meist kompakt als Binärdateien gespeichert. Sollen sie mit Hilfe unterschiedlicher Rechnerarchitekturen bearbeitet werden, ist eine Konvertierung dieser Dateien (z. B. csr-files von Cerius²) in ein plattformunabhängiges Format wie das portable Binärformat NetCDF (Unidata Program Center, Boulder, Colorado) erforderlich.

Für die Solvataion von Cetrorelixkonformeren kamen zwei unterschiedliche Verfahren zum Einsatz:

- explizite Solvataion ausgewählter Konformere mit Wassermolekülen [Drache et al. 1999] und
- implizite Solvataion durch Berechnung der absoluten freien Hydratationsenergie aller Konformere mit dem GB/SA-Verfahren [Still et al. 1990].

Die explizite Solvataion ausgewählter Konformere eines Polymers mit Solvensmolekülen hat sich bei der Analyse von Solvataionseinflüssen auf die Konformation von Makromolekülen als sehr erfolgreich erwiesen [Drache et al. 1999]. Zur Modellierung der Solvathülle wurde dabei ein atomistisches Monte Carlo-Verfahren eingesetzt. Mit Hilfe des Programmes EVOCAP wurde das Solut vollständig mit Molekülen des Solvens umhüllt und die Partialladungen mittels Charge-Equilibration unter Einbeziehung des vollständigen Peptid-Solvens-Clusters berechnet. So konnten der Einfluss der Solvathülle auf die Elektronegativität der Atome der Peptidkette berücksichtigt und nachfolgend korrekte Werte der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen berechnet werden.

Aufgrund des großen Rechenaufwandes bei der expliziten Solvataion mit EVOCAP und der Notwendigkeit, für jedes zu solvatisierende Konformer zahlreiche Ensembles zu berechnen, können für größere Polymere nur wenige, ausgewählte Konformationen auf diese Weise untersucht werden. Um trotzdem für alle generierten Sekundärstrukturen eine Abschätzung der Stabilisierung in wässriger Lösung vornehmen zu können, musste mit dem GB/SA-Verfahren eine wesentlich einfachere Methode eingesetzt werden.

2.5 Entwicklung neuer Cetrotorelix-Komplexe

2.5.1 Einführung

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war neben den vorgestellten Untersuchungen zur Struktur von Cetrotorelix sowie dessen Aggregaten und Komplexen die Entwicklung neuartiger, maßgeschneiderter Komplexe anhand der gewonnenen Erkenntnisse. Dabei wurden im Resultat der eigenen Strukturuntersuchungen sowie der Erfahrungen aus in vivo-Tests der ASTA MEDICA AG gegenüber bisherigen Arbeiten an der TU Dresden zusätzliche Schwerpunkte gesetzt:

- Charakterisierung der Wirkstoffliberation auch unter aggregationsfördernden, in vivo-nahen Bedingungen,
- Pharmakokinetische Charakterisierung der Liberationsprofile und Bestimmung des Freisetzungstyps der Komplexe und
- Entwicklung von Modellrechnungen zu Simulation und Vergleich der Komplexwechselwirkungen.

Ausschlaggebend dafür waren insbesondere die Erkenntnisse aus dynamischen Liberationsanalysen von unkomplexiertem Cetrotorelix-Acetat (Abb. 11) und Cetrotorelix-Embonsäure-Komplexen (Abb. 30), wonach unter den aggregationsfördernden Bedingungen der Ringerlösung der Wirkstoff aus Komplexen erheblich rascher freigesetzt wurde als aus dem Acetat. Dieses unerwartete Verhalten des Peptides ließ eine vollkommen neue Einsatzmöglichkeit schnell liberierender Komplexe als Aggregationschutz für Cetrotorelix erwarten. Die Zielsetzung bei der Entwicklung neuartiger Komplexe bestand daher nicht nur in der Realisierung langanhaltender, möglichst linearer Freisetzung des Wirkstoffs, sondern in einer maximalen Breite unterschiedlicher Depotwirkungen mit kurzfristiger bis zu langanhaltender Freisetzungsdauer.

Aufgrund des hohen Aufwandes für die Herstellung und Charakterisierung der Komplexe lassen sich traditionelle Screening-Verfahren für die Entwicklung neuer Komplexe bislang nicht einsetzen. Die potenziellen Komplexpartner müssen daher weiterhin aufgrund zu postulierender Wechselwirkungen gezielt selektiert und getestet werden. Dieser Prozess kann derzeit durch die dargestellte Folge von Screening-Schritten beschrieben werden:

1. Identifizierung möglicher intermolekularer Wechselwirkungen des zu komplexierenden Peptides anhand funktioneller Gruppen an dessen Seitenketten, Sekundärstruktur und Löslichkeits-eigenschaften,
2. Abschätzung der möglichen Stärke dieser Wechselwirkungen anhand der Anzahl von Donoren und Akzeptoren im Peptidmolekül,
3. Design eines in Molekülgröße und Funktionalität idealen Komplexpartners nach dem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip,
4. Auswahl von potenziellen Komplexpartnern anhand ihrer Nähe zu diesem idealen Komplexpartner sowie deren pharmakologischen Eigenschaften, Toxizität, Cancerogenität, Stabilität und Preis,

5. Erarbeitung eines Herstellungsverfahrens für Komplexe des Peptides mit den potenziellen Komplexpartnern, z.B. Fällung oder Lyophilisierung, und
6. Herstellung und Charakterisierung der Freisetzungseigenschaften der so entwickelten Komplexe.

Eine Rationalisierung dieses Prozesses erscheint an verschiedenen Stellen möglich. So lassen sich Komplexe mit Partnern einer chemisch homologen Reihe wegen deren Ähnlichkeit im Löslichkeits- und Komplexierungsverhalten meist nach demselben Herstellungsverfahren darstellen. Dieser Vorteil wurde in bisherigen Untersuchungen z.B. bei der Analyse von Cetrorelix-Carbonsäure-Komplexen genutzt. Darüber hinaus konnte durch die Automatisierung der dynamischen Liberationsanalyse der Aufwand für die Komplexcharakterisierung bei gleichzeitiger Erhöhung der Datenausbeute erheblich gesenkt werden.

Ein neuer Ansatz für die Rationalisierung des Screenings sollte mit Hilfe von Modellrechnungen erschlossen werden. Dieses Verfahren zielt auf eine Vorauswahl von Komplexpartnern. Dabei werden wesentliche intermolekulare Wechselwirkungen von potenziellen Komplexpartnern mit dem Peptid berechnet und anhand ihrer Größe eine Vorauswahl getroffen: Wenn diese Wechselwirkungen in den dargestellten Komplexen dominieren, sollten sich so auch Komplexstabilitäten im Modell ermitteln lassen.

2.5.2 Entwicklung eines Simulationsverfahrens als Pre-Screening-Methode

Trotz der Vielzahl etablierter Modellierungsverfahren und -programme besteht für die Simulation nichtbindender Wechselwirkungen zwischen Molekülen derzeit noch kein universell einsetzbarer Modellierungsansatz. Daher wurden für spezielle Aufgaben angepasste Lösungen entwickelt, z.B. für die Simulation von Liganden an Rezeptorproteinen [Rarey et al. 1997, Clark & Murray 1995], das de-novo-Design neuer Pharmaka [Roe & Kuntz 1995, Waszkowycz et al. 1994] oder die Solvation von Molekülen [Zauhar 1995, You & Bashford 1995, Hermann 1997]. Für die Komplexierung von Peptiden existiert kein derartiger Ansatz, daher war im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neuartiges, für Peptide unbekannter Raumstruktur und mit variablen Bindungsregionen für Komplexpartner einsetzbares Modellierungsverfahren zu erstellen. Dafür war es erforderlich, die Komplexierung von Peptiden in einzelne Phasen zu abstrahieren, die sich mit Hilfe bestehender Modelle beschreiben lassen. Darüber hinaus waren die Erkenntnisse aus der Sekundärstrukturanalyse von Cetrorelix (vgl. S. 83) über die intramolekularen Wechselwirkungen im Cetrorelix sowie die Fluktuation von dessen partiellen Atomladungen in das Modell einzubeziehen.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde ein Verfahren entwickelt, welches in 3 aufeinanderfolgenden Phasen ein Komplexmodell erstellt und dessen wesentliche Eigenschaften bestimmt:

1. Aufbau von Clustern des Peptidmoleküls und der Komplexpartnermoleküle mit Hilfe des Positionierungsalgorithmus für starre Moleküle nach BLANCO [Blanco 1991] und Optimierung der Molekülpositionen mit Random Sampling [Fleischhauer 1997, Weber 1997],
2. Berechnung der partiellen Atomladungen im gesamten Cluster durch Elektronegativitätsausgleich nach einem modifizierten Verfahren nach RAPPE und GODDARD [Rappe' & Goddard 1991] mit Unterdrückung des intermolekularen Ladungstransfers sowie Ermittlung der inter- und intramolekularen Wechselwirkungen U von Cetrorelix mit Hilfe des Kraftfelds MM3 [Allinger et al. 1989],

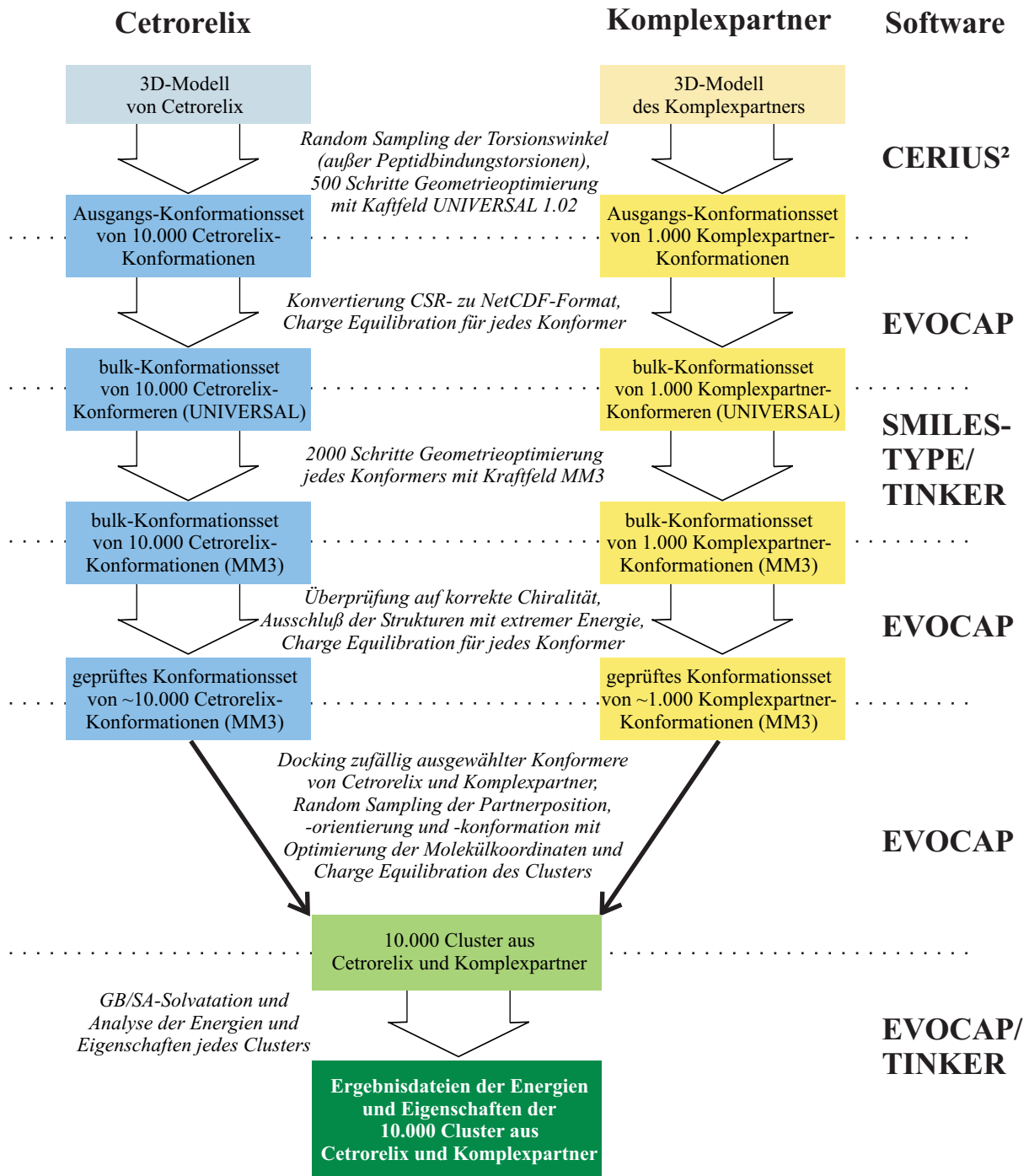


Abbildung 13: Schematische Darstellung des angewandten Modellierungsverfahrens für Peptidkomplexe (Details zur eingesetzten Rechentechnik und Software siehe S.56)

3. Berechnung von Mittelwert μ und Standardabweichung σ für die Normalverteilung $g(U)$ der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen von Cetorelix in den berechneten Clustern,
4. Berechnung der temperaturabhängigen Stabilisierungsenergie $\langle U \rangle$ von Cetorelix durch $\langle U \rangle = \mu - \frac{\sigma^2}{R \cdot T}$ [Schmidt-Naake et al. 1998] und
5. Solvation des Clusters durch implizite GB/SA-Solvation [Still et al. 1990] oder explizite Solvation mit Wassermolekülen [Drache et al. 1999].

Mit Hilfe dieses Verfahrens (Abb. 13 und S. 66) ist es möglich, auf Hochleistungsrechnern oder Compute-Clustern Ensembles von Komplexen mit verschiedenen Partnern zu erstellen sowie deren energetische Eigenschaften zu berechnen und zu vergleichen. Da die explizite Solvation der Cluster mit Wassermolekülen jedoch ein Vielfaches der für den Clusteraufbau und GB/SA-Solvation benötigten Rechenzeit erfordert, wurde die Solvation vorerst auf das GB/SA-Verfahren beschränkt. Dies gestattet neben der Bewertung der Wechselwirkungen im Komplex einen ersten Einblick in das Solvationsverhalten der Cluster, der im Rahmen späterer Arbeiten vertieft werden kann.

Eine wesentliche Voraussetzung für realitätsnahe Modelle der Molekülcluster ist die Berücksichtigung möglicher Konformationsänderungen der Moleküle durch intermolekulare Wechselwirkungen sowie der variablen Stöchiometrie der Komplexe. Da der rechnerische Aufwand für die Optimierung aller geometrischen Freiheitsgrade flexibler Moleküle im Cluster mit den derzeit verfügbaren Rechenkapazitäten nicht zu bewältigen ist, wurde das Docking mit Konformationssets starrer Moleküle durchgeführt. Aus diesen wurden die beim Clusteraufbau verwendeten Konformere nach dem Zufallsverfahren ausgewählt und somit eine Vielzahl möglicher Molekülstrukturen berücksichtigt. Auch bei der Variation der Clusterstöchiometrie wurde zur Begrenzung des Berechnungsaufwandes eine Beschränkung auf vorerst zwei molekulare Zusammensetzungen von 1:1 und 1:2 vorgenommen. Diese Peptid:Partner-Verhältnisse sind typisch für Cetorelix-Embonsäure-Komplexe (vgl. Abb. 33) und erscheinen daher auch für andere Komplexpartner wahrscheinlich.

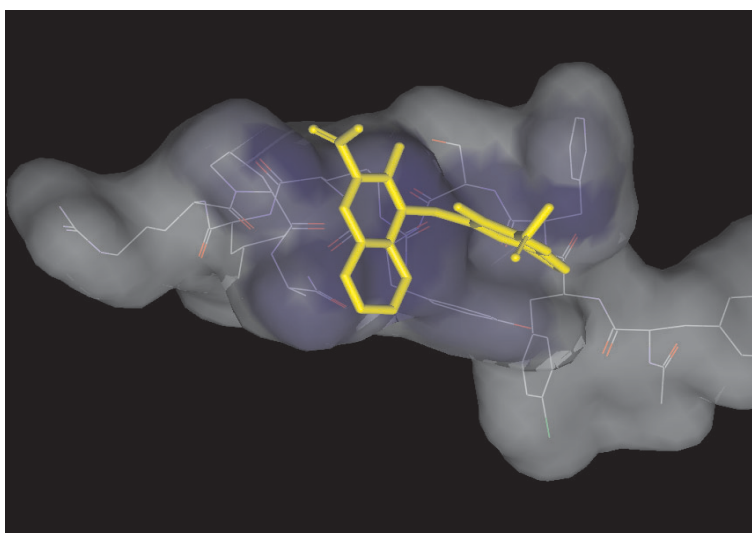


Abbildung 14: Visualisierung der spezifisch mit dem Komplexpartner wechselwirkenden Cetorelix-Atome durch farbliche Kennzeichnung (Komplex Cetorelix-Embonsäure im molaren Verhältnis 1:1), dargestellt mit MSI WebLabViewer

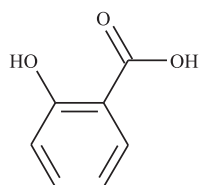
Da in 1:1- und 1:2-Modellen nicht alle Cetorelix-Bereiche an der Bindung des Komplexpartners teilnehmen können, werden große Teile des Moleküls nicht intermolekular stabilisiert. In realen Komplexen interagieren diese Bereiche mit weiteren Cetorelix-Molekülen oder dem Solvens. Für die Berechnung der intermolekularen Wechselwirkungen war daher ein angepasstes Verfahren zu entwickeln, welches die Abstraktion des Modells berücksichtigt. Dieses Ziel konnte durch die Identifizierung der spezifisch mit dem Komplexpartner wechselwirkenden Atome erreicht werden (Abb. 14). Als Selektionskriterium kam wegen der Beschränkung auf den Nahbereich ein Abstandskriterium von 0,5 nm zur Anwendung. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei größerem Abstand des Komplexpartners von einem Cetorelix-Atom intramolekulare oder intermolekulare Interaktionen mit anderen Molekülen deutlich überwiegen. Für die Berechnung der spezifischen Wechselwirkung im Komplex wurden nur die so identifizierten, an der Bindung des Komplexpartners beteiligten Atome herangezogen. Ähnlich der GB/SA-Solvatation spielt hierbei die für intermolekulare Wechselwirkungen zugängliche Moleküloberfläche eine wichtige Rolle.

Für jeden Komplexpartner wurden je 10000 Cluster der Stöchiometrien 1:1 und 1:2 berechnet und aus den Verteilungen der berechneten Wechselwirkungen folgende charakteristische Parameter bestimmt:

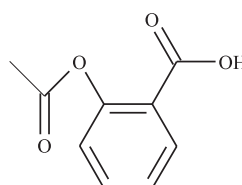
- μ_{Cetro} : Mittelwert der inter- und intramolekularen Wechselwirkungsenergien von Cetorelix,
- σ_{Cetro} : Standardabweichung der inter- und intramolekularen Wechselwirkungsenergien von Cetorelix,
- $\langle U_{Cetro} \rangle$: temperaturabhängige inter- und intramolekulare Wechselwirkungsenergie von Cetorelix bei $T = 300K$,
- $\mu_{spec-ec}$: Mittelwert der spezifischen Coulomb-Wechselwirkungsenergie von Cetorelix,
- $\sigma_{spec-ec}$: Standardabweichung der spezifischen Coulomb-Wechselwirkungsenergie von Cetorelix,
- $\langle U_{spec-ec} \rangle$: temperaturabhängige spezifische Coulomb-Wechselwirkungsenergie von Cetorelix bei $T = 300K$,
- $\mu_{spec-ev}$: Mittelwert der spezifischen van der Waals-Wechselwirkungsenergie von Cetorelix,
- $\sigma_{spec-ev}$: Standardabweichung der spezifischen van der Waals-Wechselwirkungsenergie von Cetorelix,
- $\langle U_{spec-ev} \rangle$: temperaturabhängige spezifische van der Waals-Wechselwirkungsenergie von Cetorelix bei $T = 300K$,
- $\mu_{spec-et}$: Mittelwert der spezifischen Gesamtwechselwirkungsenergie von Cetorelix,
- $\sigma_{spec-et}$: Standardabweichung der spezifischen Gesamtwechselwirkungsenergie von Cetorelix,
- $\langle U_{spec-et} \rangle$: temperaturabhängige spezifische Gesamtwechselwirkungsenergie von Cetorelix bei $T = 300K$,
- μ_{GBSA} : Mittelwert der GB/SA-Solvatationsenthalpie der Cluster und
- σ_{GBSA} : Standardabweichung der GB/SA-Solvatationsenthalpie der Cluster.

2.5.3 Anwendung der Modellrechnungen auf Komplexe mit neuartigen Komplexpartnern

Die Entwicklung neuartiger Cetrorelixkomplexe bildete aufgrund der vielfältigen, für die Applikation des Peptides erwünschten Wirkprofile sowie des postulierten Aggregationsschutzes der Komplexe eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Dabei kam dem Einsatz möglichst biophiler und pharmakologisch gut charakterisierter Komplexpartner eine besondere Bedeutung zu.



Salicylsäure



Acetylsalicylsäure

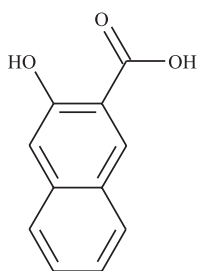
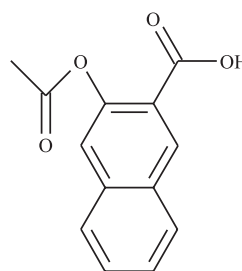
 β -Hydroxynaphthoesäure β -Acetoxynaphthoesäure

Abbildung 15: Als neue Komplexpartner ausgewählte aromatische Carbonsäuren

In Analogie zur als Komplexpartner bekannten, jedoch über einen bislang nicht aufgeklärten Mechanismus metabolisierten Embonsäure, wurden vier aromatische Carbonsäuren als neue Komplexpartner ausgewählt (Abb. 15). Vor allem Salicylsäure und Acetylsalicylsäure wurden als synthetische Arzneimittel in zahlreichen Studien bei parenteraler Anwendung eingehend charakterisiert [Mascres & Bonner 1976] und bereits in Konjugaten mit Peptiden oder Proteinen *in vivo* untersucht [Nuhn & Strecker 1974, Nishida et al. 1994].

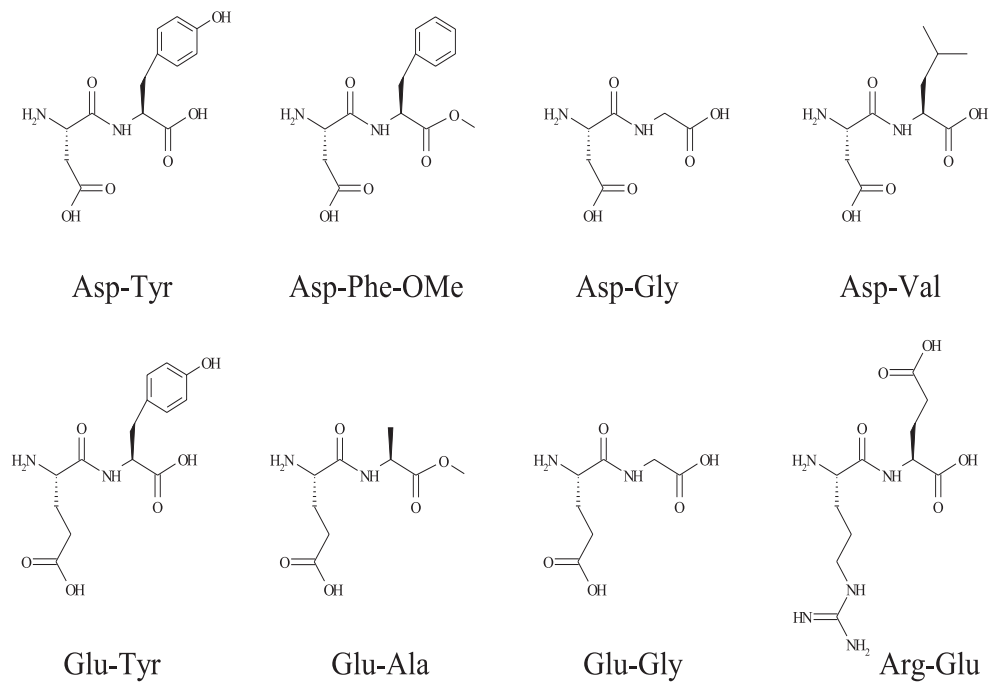


Abbildung 16: Als neue Komplexpartner ausgewählte Dipeptide

Für weitere neue Cetrorelix-Komplexe wurde in Analogie zu den als Komplexpartner ausgezeichnet geeigneten, jedoch teuren und schwer charakterisierbaren Polyaminosäuren eine Reihe synthetischer Dipeptide ausgewählt. Neben für die Ernährung eingesetzten oder als Metabolite bekannten Dipeptiden, wie Asp-Phe-OMe (Aspartam) und Asp-Tyr (Cholecystokinin Oktapeptid 1-2), kamen zusätzlich einige weitere, preisgünstige, synthetische Dipeptide zum Einsatz (Abb. 16).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Cetrorelix-Acetat

Das für Strukturuntersuchungen und Komplexherstellung eingesetzte Cetrorelix wurde durch die ASTA MEDICA AG zur Verfügung gestellt und umfasst folgende Herstellungschargen:

- D-20761 Ber443 und
- D-20761 Ber836.

Aromatische Carbonsäuren

Für die Herstellung von Komplexen wurden folgende aromatische Carbonsäuren eingesetzt:

- Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure), DAB, VEB Berlin-Chemie, reinst,
- Acetylsalicylsäure (2-Acetoxybenzoesäure), DAB, VEB Berlin-Chemie, reinst,
- β -Hydroxynaphthoesäure (3-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure), Fluka, reinst,
- β -Acetoxynaphthoesäure (3-Acetoxynaphthalin-2-carbonsäure), hergestellt in Versuch RA140 aus β -Hydroxynaphthoesäure durch Acetylierung mit Acetanhydrid gemäß GNADENWITZ, Chem. Ber. 27, 1894, 2624; Fp:174-176°C (Literatur: 176-177°C; β -Hydroxynaphthoesäure: 216°C) und
- Embonsäure (4,4'-Methylenbis-[3-hydroxynaphthalin-carbonsäure-(2)]), Merck-Schuchardt, zur Synthese.

Polyaminosäuren

Für die Herstellung von Komplexen wurden folgende Polyaminosäuren eingesetzt:

- Poly-L-Asparaginsäure 14.400 g/mol Sigma P-5387 LOT 41H5541 und
- Poly-L-Glutaminsäure 46.200 g/mol Sigma P-4761 LOT 107F-50541.

Dipeptide

Für die Herstellung von Cetorelix-Komplexen wurden folgende Dipeptide eingesetzt:

- H-Asp-Val-OH, Bachem G-1635, LOT No. 504231, Reinheit >99%,
- H-Glu-Gly-OH, Bachem G-1935, LOT No. 505744, Reinheit >99%,
- H-Arg-Glu-OH, Bachem G-1475, LOT No. 114552, Reinheit 89,5%,
- H-Asp-Phe-OMe, Bachem G-1545, LOT No. 511183, Reinheit >99%,
- H-Glu-Ala-OH, Bachem G-1900, LOT No. 122291,
- H-Asp-Tyr-OH, Bachem G-1630, LOT No. 501984, Reinheit >98%,
- H-Glu-Tyr-OH, Bachem G-2000, LOT No. 117975 und
- H-Asp-Gly-OH, Bachem G-1580, LOT No. 121256.

Hilfsstoffe

Für die Herstellung und Charakterisierung der Cetorelix-Komplexe wurden folgende Hilfsstoffe eingesetzt:

- Ammoniumacetat, Riedel-de Häen AG, zur Analyse,
- Natriumazid, Riedel-de Häen AG, zur Analyse,
- Natriumchlorid, J. T. Baker, zur Analyse,
- Kalziumchlorid, J. T. Baker, zur Analyse,
- Kaliumchlorid, J. T. Baker, zur Analyse,
- Tween^(R) 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat), Merck-Schuchardt,
- Seesand, gegläht und mit Säure gereinigt, Merck-Schuchardt, zur Analyse,
- Acetonitril, PCK Schwedt als Redestillat sowie Merck-Schuchardt, LiChrosolv ,
- Trifluoressigsäure, 1 M Essigsäure, 1 M Salzsäure und
- deionisiertes Wasser.

Puffersysteme

Für die dynamische Liberation kamen nachfolgende Puffersysteme zum Einsatz. Beide Puffer wurden als Stammlösung in 20-facher Konzentration der nachfolgend aufgeführten Inhaltsstoffe hergestellt und vor Gebrauch mit dest. Wasser im Volumenverhältnis 1:100 verdünnt.

Ammoniumacetatlösung für die dynamische Liberationsanalyse (pH: 7,5):

- dest. Wasser,
- 0,01 M Ammoniumacetat,
- 0,1% Tween^(R) 80 und
- 0,01% Natriumazid.

Ringerlösung für die dynamische Liberationsanalyse:

- 8,6 g/l Natriumchlorid,
- 0,3 g/l Kaliumchlorid und
- 0,25 g/l Kalziumchlorid.

3.1.2 Analytische Geräte und Messbedingungen

FTIR-Spektroskopie

Für die Aufnahme aller FTIR-Spektren wurde das FTIR-Spektrometer Nicolet^(R) IMPACT 400 mit dem Baseline-Kit für Diffuse Reflexion und Mahlwerkzeug eigener Fertigung [Rattei 1995] sowie der GoldenGate-Diamant-HATR eingesetzt. Der Spektrometerraum wurde 30 Minuten vor und während der Messungen mit getrocknetem Stickstoff aus einem Whatman^(R) FTIR Purge Gas Generator gespült. Pro Spektrum wurden 256 Scans durchgeführt; analysiert wurde der spektrale Bereich von 800 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} . Vor den Messungen wurde ein Hintergrundspektrum aufgenommen. Die DRIFT-Spektren wurden einer Kubelka-Munk-Korrektur, die ATR-Spektren einer vereinfachten ATR-Korrektur mit konstanten Brechungsindizes unterzogen. Die Festsubstanzen wurden zur Aufnahme mit der HATR-Einheit mit einer Saphirscheibe unter Druck an den ATR-Kristall gepresst. Der Druck wurde mit Hilfe eines Drehmomentschlüssels und 80 cNm Moment reproduzierbar eingestellt. Nach jeder Messung wurde der ATR-Kristall mit dest. Wasser und abs. Ethanol gereinigt.

Alle Spektren wurden mit Hilfe der Nicolet-Software OMNIC in den Versionen 1.20a und 4.0 ESP aufgenommen und ausgewertet. Die quantitativen Analysen von FTIR-Spektren wurden mit OMNIC QUANT IR 1.00 und QUANT IR 4.0 ESP durchgeführt.

UV/VIS-Spektroskopie

Alle UV-Spektren wurden in UV-Küvetten von Pharmacia mit einem UV/VIS-Spektrometer Spekol 1200 von Analytik Jena GmbH gegen einen Blindwert aus dest. Wasser aufgenommen.

CD-Spektroskopie

Alle CD-Spektren wurden durch MURGAS [Murgas 1998] am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie im Forschungsverbund Berlin e.V. am Gerät J720 von JASCO, Japan aufgenommen.

Fluoreszenz-Spektroskopie

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden durch LANG [Lang 1998] am Forschungszentrum Rossendorf, Institut für Bioanorganische und Radiopharmazeutische Chemie aufgenommen. Es kam ein Fluoreszenzspektrometer HITACHI F-4500 einschließlich der Software F-4500 Fluorescence Spectrophotometer Program mit Fluoreszenz-Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke, versehen mit einem Kryostaten Lauda RM6, zum Einsatz.

HPLC

Die Konzentrationsbestimmungen sowie die Identifizierung von Cetrorelix wurden mit einer GAT-HPLC-Anlage durchgeführt, bestehend aus folgenden Komponenten:

- Kryostat WK100 der Colora Messtechnik GmbH für Thermostatierung der Laufmittel und Proben,
- HPLC-Pumpe ICI Instruments LC1110,
- HPLC-Degaser DEGASYS DG-1210, Gamma Analystechnik GmbH,
- HPLC-Säule RP18, 5 μm , ES30 (5x250 mm²), Nr. 4,5/250-355/93, Batch 2850, Gamma Analystechnik GmbH,
- UV-Detektor LCD 500, Gamma Analystechnik GmbH und
- Autosampler LC 1600, Gamma Analystechnik GmbH.

Für die Durchführung der Analysen wurden folgende Bedingungen eingestellt:

- Laufmittel Acetonitril:Wasser:TFA=35:65:0,1 (v/v),
- Fluss des Laufmittels: 1 ml/min,
- Druck des Laufmittels: ca. 10 MPa,
- Temperatur der Säule: Raumtemperatur,
- Temperatur des Laufmittelvorrats und der Proben im Autosampler: 10°C,
- Detektion: UV-Extinktion bei 217 nm, Range 0,02,
- Injektionsvolumen: 20 μl und
- Laufzeit pro Probe: 13 min.

Die Kalibrierung für die quantitative Cetorelixbestimmung wurde mit einer Verdünnungsreihe von Cetorelix in 10 mM Ammoniumacetatlösung bzw. 1 M Salzsäure durchgeführt. Die Verdünnungsreihe wurde aus Stammlösungen von 0,1 mg/ml Cetorelixgehalt durch Verdünnung mit dem Lösungsmittel in den Verhältnissen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128 hergestellt und mit den Proben geringer Konzentration beginnend gemessen. Für die Kalibrationsfunktion wurden die Software GAT DP800 und deren lineare Regressionsfunktion der Peakflächen und Cetorelixkonzentration ohne Nullstelle im Koordinatenursprung verwendet.

Alle Proben unbekannter Konzentration wurden ggf. vor der Bestimmung verdünnt, um deren Cetorelixgehalt in den Konzentrationsbereich der Kalibrierung zu überführen.

Dynamische Liberationsanalyse

Für die dynamischen Liberationsanalysen wurde eine Anordnung folgender Geräte und Komponenten eingesetzt:

- LC-Schläuche- und Ventile Biorad,
- Schlauchpumpe Ismatec MS-REGLO,
- Column-Thermostat Jetstream 2 Plus, Gamma Analystechnik GmbH,
- zur Liberation modifizierte HPLC-Kartuschen MERCK 16851 Hibar^(R), LiChroCart^(R), Manufix^(R) mit Edelstahlsieben,
- Fraktionssammler Biorad 2128 mit Rack 2 und
- Fraktionssammellerröhrchen 20 ml, Greiner Polycarbonat RR Natur, 16.0/152 mm.

Bei der Durchführung der Liberationen wurden folgende Parameter eingestellt:

- Fluss der Eluenten: 30 ml/h und
- Temperatur des Thermostaten: 22° C.

Sonstiges

Alle Einwaagen wurden mit einer Feinwaage Sartorius MC1 (Genauigkeit 0,01 mg) durchgeführt. Für Zentrifugationen wurden eine Beckmann-Zentrifuge GS-15R sowie Eppendorf-Zentrifugen 5415C eingesetzt. Für die Komplexhomogenisierung wurde ein Ultraschallbad Unitra UM-2 von Unima Olsztyn, für die Komplextrocknung ein Lyophilisator CHRIST Alpha 2-4 mit Ölschieber-Vakuumpumpe verwendet.

3.1.3 Rechentechnik

Hardwareressourcen, Betriebssysteme

Für die molekülmechanischen Berechnungen kamen verschiedene Unix-Workstations und Compute-Cluster zum Einsatz:

- IBM RS/6000-Cluster der TU Dresden, Fachrichtung Chemie, mit 11 IBM Power I, IBM Power II und IBM Power-PC-Prozessoren und RAM pro Knoten von 128 MB bis 1024 MB unter IBM AIX 4.2 (für die Entwicklung der Modellierungsverfahren sowie die Konformationsuche der Peptid- und Partnermoleküle),
- Sun E4500 der TU Clausthal-Zellerfeld, Rechenzentrum, mit 12 Sun Sparc-Prozessoren (250 MHz, 4MB Cache) und 2 GB shared RAM unter Sun Solaris (für die Entwicklung der Modellierungsverfahren),
- IBM RS/6000-Cluster der TU Clausthal-Zellerfeld, Fachrichtung Chemie, mit 18 IBM Power II und IBM Power-PC-Prozessoren und RAM pro Knoten von 64 MB bis 512 MB unter IBM AIX 4.2 (für die Entwicklung der Modellierungsverfahren),
- SGI Origin 2000 der TU Dresden, Rechenzentrum, mit 48 MIPS R10000-Prozessoren (195 MHz, 4MB Cache) und 17 GB RAM unter SGI IRIX 6.5 (für die Entwicklung der Modellierungsverfahren) und
- Compute-Cluster der TU Dresden, Institut für Biochemie, mit 13 AMD Athlon-Prozessoren (4x1400, 9x1200 MHz) und 256 MB bzw. 512 MB RAM pro Knoten unter Linux/MOSIX 2.4.5 (für die Erstellung und Charakterisierung der Cluster).

Chemische Software

Folgende, wesentliche Programme wurden für die Durchführung der Berechnungen eingesetzt:

- Molecular Simulations Cerius² 3.5 für IBM AIX,
- EVOCAP Revision 4/2001 der Arbeitsgruppe DRACHE, TU Clausthal-Zellerfeld, Institut für Technische Chemie,
- SMILESTYPE Revision 1/2001 der Arbeitsgruppe DRACHE, TU Clausthal-Zellerfeld, Institut für Technische Chemie,
- TINKER 3.8 von JAY PONDER, Dept. of Biochemistry & Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine St. Louis, Missouri,
- TCL 8.0 und 8.3 und
- MSI WebLabViewer.

Die Programme EVOCAP, SMILESTYPE, TINKER wurden mit Hilfe der auf den jeweiligen Betriebssystemen installierten C- und Fortran-Compiler und -Bibliotheken mit der und den zu den Programmen gehörigen Makefiles compiliert. Für EVOCAP und SMILESTYPE wurde beim Linken die NetCDF-Bibliothek in der Version 3.4 verwendet.

Die Energieberechnungen in Cerius² wurden mit dem mitgelieferten, unveränderten Kraftfeld UNIVERSAL 1.02 unter Berücksichtigung der 1-3-Coulomb- und -van der Waals-Wechselwirkungen durchgeführt. Für die Berechnung der Partialladungen diente das in Cerius² integrierte Charge Equilibration-Modul einschließlich der mitgelieferten Parameter.

Die Energieberechnungen in TINKER wurden auf den zu TINKER gehörenden MM3- und MM3-Protein-Parametern basierend durchgeführt. Diese wurden durch DRACHE und LANG [Veröffentlichung in Vorbereitung] kombiniert und um fehlende Parameter ergänzt.

Die Energieberechnungen in EVOCAP wurden mit folgenden Kraftfelddefinitionen für UNIVERSAL und MM3 durchgeführt:

```
ec_forcefield new universal
universal type H_ H
universal type C_2 C
universal type C_3 C
universal type C_R C
universal type O_3 O
universal type O_R O
universal type O_2 O
universal type N_R N
universal type N_2 N
universal type N_3 N
universal type Cl Cl
universal vdw potential lj_12_6 -combination geometric
universal vdw cutoff_distance 10.00000
universal vdw cutoff on
universal vdw cutoff_1_3 off
universal vdw cutoff_1_4 off
universal vdw parameter H_ 1.4430 0.04400
universal vdw parameter C_2 1.9255 0.10500
universal vdw parameter C_3 1.9255 0.10500
universal vdw parameter C_R 1.9255 0.10500
universal vdw parameter O_3 1.7500 0.06000
universal vdw parameter O_R 1.7500 0.06000
universal vdw parameter O_2 1.7500 0.06000
universal vdw parameter N_R 1.8300 0.06900
universal vdw parameter N_2 1.8300 0.06900
universal vdw parameter N_3 1.8300 0.06900
universal vdw parameter Cl 1.9735 0.22700
universal coulomb potential 1_R
universal coulomb dk 1.00000
universal coulomb cutoff_distance 20.00000
universal coulomb cutoff off
universal coulomb cutoff_1_3 on
universal coulomb cutoff_1_4 on

ec_forcefield new mm3
mm3 type 50 C
```

mm3 type 1 C
mm3 type 2 C
mm3 type 180 C
mm3 type 181 C
mm3 type 3 C
mm3 type 4 C
mm3 type 68 C
mm3 type 106 C
mm3 type 182 C
mm3 type 183 C
mm3 type 184 C
mm3 type 124 H
mm3 type 73 H
mm3 type 48 H
mm3 type 28 H
mm3 type 188 H
mm3 type 23 H
mm3 type 24 H
mm3 type 21 H
mm3 type 44 H
mm3 type 187 H
mm3 type 189 H
mm3 type 190 H
mm3 type 5 H
mm3 type 46 N
mm3 type 146 N
mm3 type 150 N
mm3 type 151 N
mm3 type 155 N
mm3 type 185 N
mm3 type 8 N
mm3 type 37 N
mm3 type 72 N
mm3 type 40 N
mm3 type 43 N
mm3 type 109 N
mm3 type 107 N
mm3 type 108 N
mm3 type 9 N
mm3 type 45 N
mm3 type 10 N
mm3 type 39 N
mm3 type 186 N
mm3 type 159 O
mm3 type 148 O
mm3 type 75 O
mm3 type 49 O
mm3 type 6 O
mm3 type 77 O
mm3 type 78 O
mm3 type 79 O
mm3 type 80 O
mm3 type 7 O

```
mm3 type 41 O
mm3 type 145 O
mm3 type 47 O
mm3 type 149 O
mm3 type 11 F
mm3 type 12 Cl
mm3 type 13 Br
mm3 type 14 I
mm3 type 154 S
mm3 type 18 S
mm3 type 17 S
mm3 type 105 S
mm3 type 104 S
mm3 type 15 S
mm3 type 42 S
mm3 type 74 S
mm3 type 19 Si
mm3 type 153 P
mm3 type 60 P
mm3 type 25 P
mm3 vdw potential lj_12_6 -combination geometric
mm3 vdw parameter 50 1.960 0.056
mm3 vdw parameter 1 2.040 0.027
mm3 vdw parameter 2 1.960 0.056
mm3 vdw parameter 180 1.940 0.056
mm3 vdw parameter 181 1.940 0.056
mm3 vdw parameter 3 1.940 0.056
mm3 vdw parameter 4 1.940 0.056
mm3 vdw parameter 68 1.940 0.056
mm3 vdw parameter 106 1.940 0.056
mm3 vdw parameter 182 1.940 0.056
mm3 vdw parameter 183 1.960 0.056
mm3 vdw parameter 184 1.940 0.056
mm3 vdw parameter 124 1.620 0.020
mm3 vdw parameter 73 1.600 0.015
mm3 vdw parameter 48 1.600 0.034
mm3 vdw parameter 28 1.600 0.015
mm3 vdw parameter 188 1.600 0.015
mm3 vdw parameter 23 1.600 0.018
mm3 vdw parameter 24 0.900 0.015
mm3 vdw parameter 21 1.600 0.016
mm3 vdw parameter 44 1.620 0.020
mm3 vdw parameter 187 1.620 0.020
mm3 vdw parameter 189 1.600 0.018
mm3 vdw parameter 190 1.600 0.034
mm3 vdw parameter 5 1.620 0.020
mm3 vdw parameter 46 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 146 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 150 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 151 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 155 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 185 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 8 1.930 0.043
```

```
mm3 vdw parameter 37 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 72 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 40 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 43 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 109 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 107 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 108 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 9 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 45 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 10 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 39 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 186 1.930 0.043
mm3 vdw parameter 159 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 148 1.820 0.060
mm3 vdw parameter 75 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 49 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 6 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 77 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 78 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 79 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 80 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 7 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 41 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 145 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 47 1.820 0.059
mm3 vdw parameter 149 1.820 0.060
mm3 vdw parameter 11 1.710 0.075
mm3 vdw parameter 12 2.070 0.240
mm3 vdw parameter 13 2.220 0.320
mm3 vdw parameter 14 2.360 0.424
mm3 vdw parameter 154 2.150 0.202
mm3 vdw parameter 18 2.150 0.202
mm3 vdw parameter 17 2.150 0.202
mm3 vdw parameter 105 2.150 0.202
mm3 vdw parameter 104 2.150 0.202
mm3 vdw parameter 15 2.150 0.202
mm3 vdw parameter 42 2.150 0.202
mm3 vdw parameter 74 2.150 0.202
mm3 vdw parameter 19 2.290 0.140
mm3 vdw parameter 153 2.220 0.168
mm3 vdw parameter 60 2.200 0.168
mm3 vdw parameter 25 2.220 0.168
mm3 vdw cutoff_distance 10.00000
mm3 vdw cutoff on
mm3 vdw exclude_1_3 no
mm3 vdw exclude_1_4 no
mm3 vdw cutoff_1_3 off
mm3 vdw cutoff_1_4 off
mm3 vdw scale_1_4 no
mm3 coulomb potential 1_R
mm3 coulomb dk 1.00000
mm3 coulomb cutoff_distance 20.00000
mm3 coulomb cutoff off
```

```
mm3 coulomb exclude_1_3 no
mm3 coulomb exclude_1_4 no
```

Die Energieberechnungen in TINKER für Konformationssets zur Konformationsanalyse wurden mit folgenden Kraftfeldeinstellungen für MM3 durchgeführt (mit MM3-HBOND-Potenzial):

```
#####
##                               ##
## Force Field Definition      ##
##                               ##
#####

forcefield          MM3-2000

bondunit            71.94
bond-cubic          -2.55
bond-quartic        3.793125      !! (7/12)*bond-cubic^2
angleunit           0.02191418
angle-cubic         -0.014
angle-quartic       0.000056
angle-pentic        -0.0000007
angle-sextic        0.000000022
strbndunit          2.51118
angangunit          -0.02191418
opbndunit           0.02191418
torsionunit         0.5
strtorunit          -5.9975
vdwtype             MM3-HBOND
radiusrule          ARITHMETIC
radiustype          R-MIN
radiussize          RADIUS
epsilon            GEOMETRIC
a-expterm           184000.0
b-expterm           12.0
c-expterm           2.25
chg-13-use
vdw-13-use
chg-14-use
vdw-14-use
dielectric          4.0
```

Die Energieberechnungen in TINKER für Cetrorelixcluster und die Konformationssets von deren Ausgangsmolekülen wurden mit folgenden Kraftfeldeinstellungen für MM3 durchgeführt (ohne MM3-HBOND-Potenzial):

```
#####
##                               ##
## Force Field Definition      ##
##                               ##
#####

forcefield          MM3-2000

bondunit            71.94
```

```

bond-cubic          -2.55
bond-quartic        3.793125    !! (7/12)*bond-cubic^2
angleunit           0.02191418
angle-cubic         -0.014
angle-quartic       0.000056
angle-pentic        -0.0000007
angle-sextic        0.000000022
strbndunit         2.51118
angangunit          -0.02191418
opbendunit          0.02191418
torsionunit         0.5
strtorunit         -5.9975
vdwtype             LENNARD-JONES
radiusrule          ARITHMETIC
radiustype          R-MIN
radiussize          RADIUS
epsilon             GEOMETRIC
a-expterm           184000.0
b-expterm           12.0
c-expterm           2.25
chg-13-use
vdw-13-use
chg-14-use
vdw-14-use
dielectric          1.5

```

Die Ladungsberechnung durch Charge Equilibration in EVOCAP wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

```

ec_qeq method new qeq_noct_conhcl
qeq_noct_conhcl parameter C 5.34300 10.1260 0.75900
qeq_noct_conhcl parameter O 8.74100 13.3640 0.66900
qeq_noct_conhcl parameter N 6.89900 11.7600 0.71500
qeq_noct_conhcl parameter H 4.52800 12.9850 0.37100
qeq_noct_conhcl parameter Cl 8.56400 9.8900 0.99400
qeq_noct_conhcl charge_transfer off
qeq_noct_conhcl cutoff 6.0
qeq_noct_conhcl scf max_steps 1000
qeq_noct_conhcl scf tolerance 0.001

```

Für das Docking in EVOCAP wurden folgende Atomgrößenparameter verwendet:

```

#Docking-Methode mit 10 Rotations fuer Universal-Kraftfeld anlegen
ec_docking new dock_universal_rot_conhcl
dock_universal_rot_conhcl move_center on
dock_universal_rot_conhcl rotations 10
dock_universal_rot_conhcl parameter C 1.9255
dock_universal_rot_conhcl parameter O 1.7500
dock_universal_rot_conhcl parameter N 1.8300
dock_universal_rot_conhcl parameter H 1.4430
dock_universal_rot_conhcl parameter Cl 1.9735

#Docking-Methode mit 10 Rotations fuer MM3-Kraftfeld anlegen
ec_docking new dock_mm3_rot_conhcl
dock_mm3_rot_conhcl move_center on

```

```
dock_mm3_rot_conhcl rotations 10
dock_mm3_rot_conhcl parameter C 1.9400
dock_mm3_rot_conhcl parameter O 1.8200
dock_mm3_rot_conhcl parameter N 1.9300
dock_mm3_rot_conhcl parameter H 1.6000
dock_mm3_rot_conhcl parameter Cl 2.0700
```

3.2 Darstellung der Komplexe

3.2.1 Allgemeines

Für alle präparativen Arbeiten mit Cetrorelixlösungen sind wegen der Aggregations- und Adsorptionsneigung des Peptides die verwendeten Glasgeräte vor jeder Benutzung durch Füllung mit gesättigter Natronlauge und eintägige Einwirkungsdauer zu inaktivieren. Kunststoffgefäße sind für deren Einsatz auf ihr Aggregationsvermögen zu testen. Generell sind die Lagerungszeiten für Cetrorelixlösungen zu minimieren.

3.2.2 Darstellung der Cetrorelix-Embonsäure-Komplexe durch Fällung aus Cetrorelix-Acetat

Für die Herstellung von Lösung A werden 60,17 mg Embonsäure in 1 ml Dimethylacetamid (DMA) gelöst. Lösung B wird durch Lösen von 45,24 mg Cetrorelix-Acetat in 270 μl DMA und 30 μl dest. Wasser hergestellt.

Anteile beider Lösungen werden im gewünschten molaren Verhältnis vereinigt und durch Rühren oder Schütteln vermischt. Mit der raschen Zugabe der 30fachen Menge dest. Wasser unter intensivem Rühren oder Schütteln wird der Komplex gefällt. Nach 10minütiger Behandlung im Ultraschallbad wird der Komplex 10 min. bei 9000 min^{-1} abzentrifugiert und nach Dekantieren der überstehenden Flüssigkeit 3 Tage im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Der Cetrorelixgehalt der überstehenden Lösung ist mittels HPLC zu bestimmen.

3.2.3 Darstellung der Cetrorelix-Embonsäure-Komplexe durch Fällung aus der Cetrorelix-Base

Für die Herstellung von Lösung A werden 100 mg Embonsäure in einer Mischung aus 5 ml Dimethylacetamid (DMA) und 5 ml abs. Ethanol gelöst. Für Lösung B werden 100 mg Cetrorelix-Acetat in 4,2 ml dest. Wasser gelöst. Dazu werden 11 ml abs. Ethanol und unter Rühren 1,16 mg Ionenaustauscher Amberlite MB3 gegeben. Die Lösung wird bis zur pH-Konstanz, mindestens jedoch 15 Minuten gerührt. Danach wird der Ionenaustauscher dekantiert und mit wenig abs. Ethanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird mit einem Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert. Der Kolben mit der Cetrorelix-Base ist im Vakuum über P_2O_5 zu trocknen. Anschließend werden der Rückstand als Lösung B in 5 ml Dimethylacetamid (DMA) und 5 ml abs. Ethanol aufgenommen und der Kolben bis zur vollständigen Auflösung geschüttelt.

Anteile der Lösungen A und B werden im gewünschten molaren Verhältnis vereinigt und durch Rühren oder Schütteln vermischt. Mit der raschen Zugabe der 30fachen Menge dest. Wasser unter intensivem Rühren oder Schütteln wird der Komplex gefällt. Nach 10minütiger Behandlung im Ultraschallbad wird der Komplex 10 min. bei 9000 min^{-1} abzentrifugiert und nach Dekantieren der überste-

henden Flüssigkeit 3 Tage im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Der Cetorelixgehalt der überstehenden Lösung ist mittels HPLC zu bestimmen.

3.2.4 Darstellung der Cetorelix-Polyaminosäure-Komplexe

150 mg der Polyaminosäure werden in einem Becherglas unter Rühren in 10 ml dest. Wasser gelöst. 150 mg Cetorelix werden separat in 15 ml dest. Wasser unter Rühren gelöst und nach vollständiger Auflösung kontinuierlich in die Mitte der gerührten Polyaminosäurelösung gegeben. Das Cetorelix-Gefäß wird zweimal mit wenig dest. Wasser nachgespült. Nach 2-3 Minuten Nachrühren der Lösung wird das Becherglas mit einer Textilhaube verschlossen und die Lösung bei $-20^\circ C$ für 3 Stunden unter Normaldruck eingefroren. Danach wird bei $-15^\circ C$ und 0,05 mbar gefriergetrocknet und der Komplex im Vakuum über P_2O_5 nachgetrocknet.

3.2.5 Darstellung der Cetorelix-Carbonsäure-Komplexe

30 mg Cetorelix-Acetat und die gewünschte Menge Komplexpartner werden gemeinsam eingewogen und in 390 μl Dimethylacetamid (DMA) und 18 μl dest. Wasser gelöst. Nach der raschen Zugabe von 5 ml dest. Wasser unter intensivem Rühren oder Schütteln wird die Lösung 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird das Becherglas mit einer Textilhaube verschlossen und die Lösung bei $-20^\circ C$ für 3 Stunden unter Normaldruck eingefroren. Anschließend wird bei $-15^\circ C$ und 0,05 mbar gefriergetrocknet und der Komplex im Vakuum über P_2O_5 nachgetrocknet.

3.2.6 Darstellung der Cetorelix-Dipeptid-Komplexe

35 mg Cetorelix-Acetat werden unter Schütteln in 2 ml dest. Wasser gelöst und die Lösung 15 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Die gewünschte Menge Komplexpartner wird in 1 ml dest. Wasser unter Schütteln gelöst und unter intensivem Rühren oder Schütteln zur Cetorelixlösung gegeben. Nach Nachspülen des Komplexpartner-Gefäßes mit 1 ml dest. Wasser wird nach 10 Minuten Wartezeit die Lösung 1 Minute im Ultraschallbad behandelt und in eine flache Glasschale überführt. Danach wird die Schale mit einer Textilhaube verschlossen und die Lösung bei $-20^\circ C$ für 3 Stunden unter Normaldruck eingefroren. Anschließend wird bei $-15^\circ C$ und 0,05 mbar gefriergetrocknet und der Komplex im Vakuum über P_2O_5 nachgetrocknet.

3.3 Charakterisierung der Cetorelix-Komplexe

3.3.1 Bestimmung des Cetorelixgehaltes

Zur Bestimmung des Cetorelixgehaltes in dessen Komplexen wurde eine Komplexmenge mit theoretischem Cetorelixgehalt von 1 mg in einem Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 1 ml 1 M Salzsäure oder 33%iger Essigsäure versetzt. Nach 10minütiger Ultraschallbehandlung wurde der Rückstand durch Zentrifugation abgetrennt und die Cetorelix-Konzentration der überstehenden Lösung mittels HPLC quantitativ bestimmt.

Der Cetorelixgehalt des Überstandes bei Komplexherstellung durch Fällung wurde quantitativ mittels HPLC bestimmt.

3.3.2 Dynamische Liberationsanalyse

Für die dynamische Freisetzungsanalyse wurde pro Liberationsmedium eine Komplexmenge mit theoretischem Cetrorelixgehalt von 10 mg eingewogen und ggf. mit einem Spatel homogenisiert. Danach wurden die Böden der Liberationskartuschen jeweils mit einer ca. 3 mm starken Schicht Seesand bedeckt. Mit einer weiteren Portion Seesand von etwa des halben Kartuschenvolumens wurde die eingewogene Komplexmenge aufgenommen, intensiv mit einem Spatel vermengt und in die Liberationskartusche gefüllt. Mit dem restlichen, zur Füllung der Kartusche benötigten Seesand wurden die Restpartikel des Komplexes vom Wägeschiffchen aufgenommen und in die Kartusche gefüllt. Nach vollständiger Füllung wurden die Kartuschen mit den Edelstahlsieben verschlossen, verschraubt und im Thermostat in das Liberationssystem integriert.

Nach Temperierung der Kartuschen wurde die Liberation zeitgleich mit beiden Liberationsmedien gestartet. Mit Hilfe des Fraktionssammlers wurden in der ersten Stunde aller 5 Minuten, danach einmal stündlich die Fraktionen gewechselt. Nach 50 Stunden Elution wurde 30 Minuten mit 1 M Salzsäure eluiert, dabei wurden im Abstand von 10 Minuten die Fraktionen gewechselt.

Von den Proben aller Fraktionen wurden ggf. Verdünnungen hergestellt. Bis zur quantitativen Cetrorelixbestimmung mit der HPLC wurden alle Proben bei 4°C in Autosampler-Vials gelagert.

3.4 Ermittlung der Sekundärstruktur von Cetrorelix aus FT-IR- und CD-Spektren

Literatur: Ronald W. Sarver, Jr. and William C. Krueger, *Analytical Biochemistry* **194**, 89-100 (1991)

Vorbereitung des Spektrums

Das auszuwertende Spektrum wird mit Hilfe des Programms OMNIC in Extinktion dargestellt und einer Basislinienkorrektur unterzogen. Dabei ist die Basislinie so zu verschieben, dass sie das Spektrum bei 1750 cm⁻¹ schneidet. Mit Hilfe der Integrator-Funktion wird die Gesamtfläche $A_{1700-1600}$ des Spektrums im Bereich von 1700 cm⁻¹ bis 1600 cm⁻¹ bestimmt. Danach wird das Spektrum als Textdatei (CSV-Format) gespeichert.

Analyse des Spektrums

Die Extinktionen E_λ des Spektrums werden im Bereich von 1700 cm⁻¹ bis 1600 cm⁻¹ gemäß folgender Gleichung normalisiert und bilden danach die IR-Matrix R :

$$R = \begin{pmatrix} E_{1700} \\ E_{1698} \\ \dots \\ E_{1602} \\ E_{1600} \end{pmatrix} \cdot \frac{A_{1700-1600}}{100}$$

Die Sekundärstrukturmatrix F besteht aus den Sekundärstrukturanteilen für Helix, β -sheet, β -turn und andere (other) und errechnet sich aus der IR-Matrix R und der Transformationsmatrix X nach folgender Beziehung:

$$F = XR$$

5. Durchführen einer Geometrieoptimierung mit dem Smart Minimizer über 500 Schritte, anschließend Charge Equilibration, ggf. Wiederholung dieser Schritte, bis keine wesentliche Geometrieänderung mehr stattfindet,
6. Laden des Konformationsuche-Moduls, Auswahl der Methode „Random Sampling“,
7. Ermitteln aller variablen Torsionen, Löschen der nicht zu verändernden Torsionen (z.B. Torsionen der Peptidbindung in Polypeptiden),
8. Einstellen der random-sampling-Parameter:
 - 1.000 Konformere (Komplexbpartner) bzw. 10.000 Konformere (Cetrorelix) erzeugen,
 - stets von der Referenzkonformation ausgehen,
 - Konformere minimieren (Standardeinstellung bei 500 Schritten belassen),
 - Variation der Torsionen über 360° ,
9. Einstellen der Optionen für das Konformationsset:
 - keine Energiebegrenzung für das Speichern der Konformere anwenden,
10. Durchführen des random sampling (Konformationsset wird unter dem gewählten Dateinamen als .msi und .csr-file gespeichert).

Das so erstellte, nicht portable .csr-Konformationsset ist nachfolgend auf der gleichen Hardware in ein plattformunabhängiges, portables binäres .NetCDF-File umzuwandeln. Dabei wird gleichzeitig eine Charge Equilibration aller Konformere durchgeführt. Für diesen Schritt mit EVOCAP wurde das TCL-Skript `csr2netcdf.tcl` entwickelt.

Das so erstellte NetCDF-File (bezeichnet als `*_universal_bulk.NetCDF` und `*_universal_bulk.msi`) dient als Basis für die Geometrieoptimierung mit MM3 und den Selektionsschritt, nachfolgend als shell-Skript für das Batchsystem Codine zusammengestellt:

```
#!/bin/csh
# Vorbereiten und Analysieren des Konformationssets eines Moleküls
#
# Achtung: codine führt das Skript in der csh aus, entsprechende
# shell-Kommandos verwenden!

# Voreinstellungen
setenv MOL $1
setenv NAME $2
cd ~/modeling/molecules

# Minimierung mit MM3
../tools/minimize_netcdf_mol.tcl $MOL/$MOL\_universal_bulk
mv $MOL/$MOL\_universal_bulk_tinker_1.msi $MOL/$MOL\_mm3_bulk.msi
mv $MOL/$MOL\_universal_bulk_tinker.NetCDF $MOL/$MOL\_mm3_bulk.NetCDF

# Selektieren der Konformere, QEQ
../tools/selectgoodconformers_netcdf_mol.tcl $MOL/$MOL\_mm3_bulk $MOL >$MOL/select.log
rm $MOL/$MOL\_mm3_bulk_DLselected.NetCDF
mv $MOL/$MOL\_mm3_bulk_DLselected_qeq.NetCDF $MOL/$MOL\_mm3_verified.NetCDF
cp $MOL/$MOL\_mm3_bulk.msi $MOL/$MOL\_mm3_verified.msi
```

```
# Auswerten der Konformationen
../tools/auswertung_mol.tcl $MOL/$MOL\_mm3_bulk
../tools/auswertung_mol.tcl $MOL/$MOL\_mm3_verified
../tools/histogramme_mol.tcl $MOL/$MOL\_mm3_bulk "$NAME (Konformationsset aus ...)"
../tools/histogramme_mol.tcl $MOL/$MOL\_mm3_verified "$NAME (Konformationsset aus ...)"
#../tools/make_am.tcl $MOL/$MOL\_mm3_verified
```

Hierfür wurden die TCL-Skripte `minimize_netcdf_mol.tcl`, `selectgoodconformers_netcdf_mol.tcl` sowie `auswertung_mol.tcl`, `histogramme_mol.tcl` und `make_am.tcl` entwickelt. Sehr große Konformationssets können mit `minimize_netcdf_mol.tcl` auch verteilt auf Teilbereiche des Konformationsbereiches bearbeitet werden, wodurch auf Compute-Clustern eine raschere Fertigstellung der Geometrieoptimierung zu erreichen ist. Für die Auswertung der Konformationssets von Peptiden wurden darüber hinaus die TCL-Skripte `atomdistanz_mol.tcl`, `classify_peptidebonds_mol.tcl`, `ladungsvarianz_mol.tcl`, `ramachandran.tcl` und `torsion_mol.tcl` entwickelt.

3.5.2 Erstellung und Charakterisierung der Molekülcluster

Das Docking von Cetrorelix und Komplexpartner wird mit Hilfe eines entsprechend angepassten TCL-Skriptes `dock_cluster.tcl` für `evocap` durchgeführt, welches als Template zur Verfügung steht und in einem Verzeichnis für die gedockten Cluster plaziert wird:

```
#!../bin/evocap
# Durchführung eines EVOCAP-Dockings mit Auswertung der Ergebnisse
# TUD/TUC 07/2001

if { [lsearch -exact {-h --help} [lindex $argv 0]] >=0 } {
puts ""
puts "----- TCL-Skript fuer EVOCAP -----"
puts "Funktion: Erzeugung von evocap-Clustern"
puts "Zu übergebende Parameter: keine"
puts "Zu setzende Variablen: keine"
puts "Benötigte Dateien: div. Bibliotheken, Moleküle als NetCDF-Files"
puts "Erzeugte Dateien: Cluster als NetCDF-Files in Verzeichnissen"
puts " cluster_X"
puts ""
exit
}

#####
# Festlegung der Versuchsparameter #
#####
# Einstellungen für das Peptid
set peptid cetro
set peptidfile cetro
set n_peptid 1
set peptid_conf random

# Einstellungen für den Partner
set partner embo
set partnerfile embo
set n_partner 1
```

```
set partner_conf random

# Einstellungen für Pfade
set molpath ../molecules
set binpath ../bin
set parpath ../parameter
set libpath ../lib
set incpath ../include

# Einstellungen für die Ablage der Cluster
set ablage cluster

# Einstellungen für die zu verwendenden Parameter und Methoden
set n_cluster 10000
set dockmethod dock_mm3_rot_conhcl
set ff mm3
set optmethod opt_20bfgs
set qeqmethod qeq_noct_conhcl
set randomsamplingmethod rs_noopt
set n_randomsampling 20

# Einstellungen für den Ausgabemodus
# 0: keinerlei Bildschirmausgaben
# 1: Fortschrittsanzeige# 2: Clusterinformationen und -Energien
set debug 0

#####
# Einbinden der benötigten Methoden und Prozeduren                                     #
#####

source $libpath/inout.tcl
source $libpath/docktools.tcl
source $incpath/defs_docking.tcl
source $incpath/defs_ff_mm3.tcl
source $incpath/defs_optimize.tcl
source $incpath/defs_qeq.tcl

#####
# Durchführen des Versuches                                                         #
#####

# Vorbereiten des Ablageverzeichnis
set resdir [mk_resdir $ablage]

# Laden der Moleküle
moleculeload_netcdf $peptid $molpath/$peptidfile.NetCDF
moleculeload_netcdf $partner $molpath/$partnerfile.NetCDF

# Für alle vorgesehenen Cluster:
for {set n 1} {$n<=$n_cluster} {incr n} {
```

```

set cluster cl

# Docken des Clusters
dock_rs $cluster $n_peptid $peptid $peptid_conf $n_partner $partner $partner_conf $dock-
method $seqmethod $randomsamplingmethod $n_randomsampling $optmethod

# Speichern des Clusters
set clfile [format "%s/nosolv_cl_%05d" $resdir $n]
clustersave_netcdf $cluster $clfile.NetCDF
clustersave_msi $cluster $clfile.msi

# Löschen des Clusters
$cluster delete

}

exit

```

Die Anzahl von 10000 Clustern wurde anhand von Vorversuchen als geeignet ermittelt, da sich bei Erhöhung der Clusteranzahl keine Veränderungen in der für die Auswertung der Berechnungen wesentlichen Energieverteilung ergaben. Diese Anzahl kann jedoch ohne weiteres auf geringere oder größere Werte festgelegt werden. Die Parallelisierung des Dockings ist durch Verteilung der Anzahl auf einzelne Rechenjobs möglich.

Zur Auswertung der Cluster wurden ebenfalls TCL-Skripte für EVOCAP und SMILESTYPE entwickelt, nachfolgend als shell-Skript für das Batchssystem Codine zusammengestellt:

```

#!/bin/bash
set dir $1
set name $2
cd /home/thomas/$dir
../tools/auswertung_cluster.tcl
../tools/histogramme_cluster_allg.tcl ./ '$name'
../tools/histogramme_cluster_spezww.tcl ./ '$name'

```

Für diese Auswertungen wurden die TCL-Skripte `auswertung_cluster.tcl`, `histogramme_cluster_allg.tcl` und `histogramme_cluster_spezww.tcl` erarbeitet. Zur Visualisierung der in spezifische Wechselwirkungen einbezogenen Cetorelix-Atome wurde zusätzlich das Skript `patchmsi_spezwwatoms.tcl` entwickelt.

3.5.3 Dateiformat der Ergebnisdateien von EVOCAP- und SMILESTYPE-Rechnungen

Die Ergebnisse der Auswertungen für Moleküle und Cluster werden durch die TCL-Skripte in einem standardisierten Ergebnis-Fileformat abgelegt, was deren automatisierte Auswertung und Visualisierung ermöglicht.

Dateiformate der durch \$libpath/analyze.tcl erzeugten Ergebnisse für Cluster, Moleküle und Atome, TUC/TUD 08/2001

clusterresults

0 clusterfile	string	Pfad/Dateiname des Clusters
1 cluster_charge	float	Ladung des Clusters
2 cluster_dipole	float	Dipolmoment des Clusters
3 cluster_ec_inter	float	Intermolekulare Coulomb-Energie des Clusters
4 cluster_ev_inter	float	Intermolekulare van der Waals-Energie des Clusters
5 cluster_et_inter	float	Intermolekulare Gesamtenergie des Clusters
6 cluster_ec_intra	float	Intramolekulare Coulomb-Energie des Clusters
7 cluster_ev_intra	float	Intramolekulare van der Waals-Energie des Clusters
8 cluster_et_intra	float	Intramolekulare Gesamtenergie des Clusters
9 cluster_gbsa	float	GBSA-Solvatationsenergie des Clusters

molresults

0 clusterfile	string	Pfad/Dateiname des Clusters
1 i	integer	Nummer des Moleküls im Cluster
2 mol_type	string	Molekültyp des Moleküls i im Cluster
3 mol_conf	integer	Konformationsnummer im NetCDF-Molekülfile
4 mol_rg	float	Gyrationsradius des Moleküls i um Cluster des Moleküls i im Cluster
5 mol_charge	float	Ladung des Moleküls i im Cluster
6 mol_dipole	float	Dipolmoment des Moleküls i im Cluster
7 mol_ec_inter	float	Intermolekulare Coulomb-Energie des Moleküls i im Cluster
8 mol_ev_inter	float	Intermolekulare van der Waals-Energie des Moleküls i im Cluster
9 mol_et_inter	float	Intermolekulare Gesamtenergie des Moleküls i im Cluster
10 mol_ec_intra	float	Intramolekulare Coulomb-Energie des Moleküls i im Cluster
11 mol_ev_intra	float	Intramolekulare van der Waals-Energie des Moleküls i im Cluster
12 mol_et_intra	float	Intramolekulare Gesamtenergie des Moleküls i im Cluster

atomresults

0 clusterfile	string	Pfad/Dateiname des Clusters
1 i	integer	Nummers des Moleküls im Cluster
2 atom_id	integer	Nummern des Atoms im Molekül i des Clusters
3 atom_charge	float	Ladung des Atoms atom_id im Molekül i des Clusters
4 atom_ec	float	Intermolekulare Coulomb-Energie des Atoms atom_id im Molekül i des Clusters (bezogen auf Molekültyp 2 des Clusters)
5 atom_ev	float	Intermolekulare van der Waals-Energie des Atoms atom_id im Molekül i des Clusters (bezogen auf Molekültyp 2 des Clusters)
6 atom_et	float	Intermolekulare Gesamtenergie des Atoms atom_id im Molekül i des Clusters (bezogen auf Molekültyp 2 des Clusters)
7 atom_dist	float	Abstand des Atoms atom_id im Molekül i des Clusters zum nächsten Atom im Molekültyp 2 des Clusters

tinkerresults

0	clusterfile	string	Pfad/Dateiname des Clusters
1	bond-stretching	float	Bond Stretching
2	angle-bending	float	Angle Bending
3	stretch-bend	float	Stretch-Bend
4	angle-angle	float	Angle-Angle
5	oop-bend	float	Out-of-Plane Bend
6	torsion-angle	float	Torsional Angle
7	stretch-torsion	float	Stretch-Torsion
8	1-4-vdw	float	1-4 van der Waals
9	other-vdw	float	Other van der Waals
10	charge-charge	float	Charge-Charge
11	charge-dipole	float	Charge-Dipole
12	dipole-dipole	float	Dipole-Dipole
13	total	float	Gesamtkonformationsenergie

3.5.4 Simulationsumgebung für die Steuerung von EVOCAP und SMILESTYPE

Da sowohl EVOCAP als auch SMILEYSTYPE mit TCL-Skripten gesteuert werden, wurde für eine effiziente Arbeit mit diesen Programmen eine TCL-Simulationsumgebung geschaffen, bestehend aus TCL-Skripten und -Bibliotheken. Durch deren modularen Aufbau konnten Redundanzen weitgehend vermieden und eine transparente Struktur der Berechnungsabläufe geschaffen werden.

3.5.4.1 TCL-Skripte zur Steuerung von EVOCAP und SMILESTYPE

Skriptname	Funktion	Ergebnis	Ausführung
csr2netcdf.tcl	Konvertierung eines csr-Searchfiles	NetCDF-File des Moleküls	EVOCAP
minimize_netcdf_mol.tcl	Minimierung eines NetCDF-Molekülfiles mit TINKER	Molekülfile_tinker.NetCDF (gesamt), Einzelfiles .xyz, .key, .energy, .msi	SMILESTYPE
selectgoodconformers_netcdf_mol.tcl	Selektion der Konformere eines NetCDF-Files anhand von Konfiguration/Energie, danach QEQ	Molekülname_DLselected.NetCDF, Molekülname_DLselected_qeq.NetCDF	EVOCAP
auswertung_mol.tcl	Komplette Auswertung von Molekülfiles	Ergebnisdateien im Standard-Textformat	EVOCAP
histogramme_mol.tcl	Komplette Auswertung von Molekülfiles	Histogramme als postscript-Files	TCLSH
make_am.tcl	Erzeugung der Analogiematrix eines NetCDF-Molekülfiles sowie einer Liste von Gruppen analoger Konformere	Molekülfile_am.txt, Molekülfile_grp.txt	SMILESTYPE
atomdistanz_mol.tcl	Analyse des Abstandes zweier Atome in den Konformeren eines Molekülfiles	Histogramm als postscript-File	EVOCAP
classify_peptidebonds_mol.tcl	Analyse der phi/psi-Winkel in Peptidketten und Zuordnung zu Sekundärstrukturtypen	Zuordnungen als Text-File mol_pb.txt	EVOCAP
ladungsvarianz_mol.tcl	Visualisierung der Ladungsvarianz in Molekülfiles	Moleküldatei_qvar.msi mit Ladungsvarianz als Partialladung	EVOCAP
ramachandran.tcl	Analyse der phi/psi-Winkel in Peptidketten und Darstellung in einem Ramachandran-Plot	Ramachandran-Plot als postscript-File	EVOCAP
torsion_mol.tcl	Analyse eines Torsionswinkels in den Konformeren eines Molekülfiles	Histogramm als postscript-File	EVOCAP
auswertung_cluster.tcl	Komplette Auswertung von evocap-Clustern	Ergebnisdateien im Standard-Textformat	EVOCAP
histogramme_cluster_allg.tcl	Komplette Auswertung von evocap-Clustern	Histogramme als postscript-Files	TCLSH
histogramme_cluster_spezww.tcl	Energetische Auswertung von evocap-Clustern anhand spezifischer Wechselwirkungen von Molekültyp 1 und 2 im Cluster	Histogramme als postscript-Files	TCLSH
patchmsi_spezwwatoms.tcl	Erzeugen von modifizierten evocap-Clustern, als Ladung wird bei Molekültyp 2 der Abstand zu Molekültyp 1 im Verhältnis zum cutoff spezifischer Wechselwirkungen eingesetzt, sonst 0	Modifizierte Cluster als msi-Files patched_clusterfile.msi	TCLSH

3.5.4.2 TCL-Bibliotheken und deren Prozeduren für EVOCAP- und SMILESTYPE-Rechnungen

files_tinker_analyze.tcl

- analyze_tinker_etotal {mol etotal n_components ecomponent}
- analyze_tinker { component }
- write_tinker_energy {filename etotal n_components ecomponent}
- read_tinker_energy_total {filename etotal }

docktools.tcl

- writeoutput {cluster text}
- dock_rs {cluster n1 mol1 conf1 n2 mol2 conf2 dmethod qmethod rsmethod nrsomethod}
- solv_conf_rs {cluster n1 mol1 conf1 r2 mol2 fail2 dmethod qmethod rsmethodnrs omethod}
- rs_noopt {cluster dmethod n_steps qmethod}
- rs_noopt_solv {cluster dmethod n_steps qmethod}

files_netcdf.tcl

- read_netcdf_mol {filename cnf_nr n_atoms n_bonds x y z fft atsym chargebonds bond_order}
- read_netcdf_mol_1cnf {filename cnf_nr n_atoms n_bonds x y z fft atsym chargebonds bond_order}
- netcdf_cluster_mol_info {filename n_moltypes moltypename n_mols molt xy z q}
- netcdf_cluster_write_xyzq {filename x y z q}
- netcdf_NetCDF_mol_info {filename moltypename n_cnf}
- read_netcdf_cluster_mol {filename cnf_nr n_atoms n_bonds x y z fft atsymcharge bonds bond_order}
- write_netcdf_mol {filename n_atoms n_bonds n_cnf etotal x y z fft atsymcharge bonds bond_order
ffname molname}
- join_netcdfmol_cluster {atomofs bondofs m_natoms m_nbonds m_fft m_ats m_bondm_bondorder
clm_natoms clm_nbonds clm_fft clm_ats clm_bond clm_bondorder}

inout.tcl

- mk_filelist {searchpath pattern}
- moleculeload_netcdf {mol filename}
- moleculeload_msi {mol filename ff}

- mk_conflist {molname filename}
- load_cluster_molecules {clusterfile}
- mk_resdir {dirname}
- clustersave_netcdf {cluster filename}
- clustersave_msi {cluster filename}

files_tinker.tcl

- read_tinker_xyz {filename n_atoms n_bonds x y z fft atsym charge bonds}
- read_tinker_xyz_coordinates {filename n_atoms x y z }
- read_tinker_q {filename q }
- write_tinker_xyz {filename n_atoms n_bonds x y z fft atsym charge bonds}
- write_tinker_key_header {filename}
- write_tinker_key_charges {filename n_atoms charge }
- write_tinker_key_minimize {filename}
- write_tinker_key_solvonly {filename}
- read_tinker_key {filename n_atoms charge }

files_msi.tcl

- read_msi {filename n_atoms n_bonds x y z fft atsym charge bonds bond_order}
- write_msi {filename n_atoms n_bonds x y z fft atsym charge bonds bond_order}

visualize.tcl

- patchmsi {wert atomnumber filename}
- histogramm {wertliste n_class title axis type histogrammfile}
- diagramm {wertliste title x_axis y_axis type histogrammfile}
- ramachandran {wertliste title type histogrammfile}

prep_tinkerfiles.tcl

- write_tinker_prmfiles_mol {filename}
- write_tinker_prmfiles_cluster {filename}

- write_tinker_controlfiles_cluster {filename write_tinker_key_procedure}
- write_tinker_controlfiles_cluster_solvonly {filename}
- write_tinker_controlfiles_cluster_minimize {filename}

analyze.tcl

- torsion {a1 a2 a3 a4}
- secondarystruct {phi psi}
- param_normaldist {wertliste}
- analyze_tinker_energies {clusterfile}
- analyze_cluster {clusterfile mode solv}

files_tinker_prm.tcl

- smile_bond_possible {index1 index2}
- read_tinker_mm3prm {filename}
- write_tinker_mm3prm_atom_bond_opbend_vdw { }
- write_tinker_mm3prm_sel_torsion {typenr}
- write_tinker_mm3prm_sel_angle {typenr}
- tinker_generate_parameterfile {prmfilestr n_types pptype}

element.tcl

- ele_ozs {sym}

util.tcl

- ldelnull {dlist}

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Cetrorelix

4.1.1 FTIR-Spektroskopische Untersuchungen der Sekundärstruktur von Cetrorelix

Die Sekundärstruktur von Cetrorelix wurde von uns in festen und gelösten Proben des Dekapeptid-Acetatsalzes untersucht. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in diffuser Reflexion (DRIFT) in KBr für den festen Zustand sowie mittels Horizontaler Abgeschwächter Totalreflexion (HATR) für feste und gelöste Zustände. Bei der HATR-Analyse flüssiger Proben in Mengen von mindestens 1 ml wurde der verbreitet eingesetzte ZnSE-Kristall verwendet. Für die Analyse fester und flüssiger Proben in μg -Mengen in HATR kam ein Diamantkristall mit Anpressvorrichtung zum Einsatz. Durch Voruntersuchungen wurde die Vergleichbarkeit der mit beiden Kristallen erhaltenen ATR-Spektren sichergestellt.

Die Untersuchung von FTIR-Spektren des mit KBr vermischten, festen Cetrorelix-Acetates (Abb. 17) erfolgte durch Bandenseparation der Amid I- und Amid II-Banden sowie durch die datenbankgestützte Analyse nach SARVER und KRUEGER. Die Bandenseparation durch Fourier-Selbstentfaltung (FSD mit Parametern $K=2,2$ und $\lambda=20,2\text{ cm}^{-1}$, Abb. 18) lieferte folgende Einzelmaxima, die gemäß Tabelle 6 den verschiedenen Sekundärstrukturelementen zugeordnet wurden:

- $1689,2\text{ cm}^{-1}$ mit Extinktion 3,0 Einheiten, entspricht β -Faltblatt/ β -turn,
- $1670,9\text{ cm}^{-1}$ mit Extinktion 3,5 Einheiten, nicht eindeutig zuzuordnen,
- $1652,6\text{ cm}^{-1}$ mit Extinktion 3,7 Einheiten, entspricht α -helikalen und ungeordneten Strukturen,
- $1633,8\text{ cm}^{-1}$ mit Extinktion 3,3 Einheiten, entspricht β -Faltblatt,
- $1556,0\text{ cm}^{-1}$ mit Extinktion 2,6 Einheiten, nicht eindeutig zuzuordnen,
- $1539,8\text{ cm}^{-1}$ mit Extinktion 2,9 Einheiten, entspricht α -helikalen und ungeordneten Strukturen und
- $1514,7\text{ cm}^{-1}$ mit Extinktion 3,6 Einheiten, nicht eindeutig zuzuordnen.

Diese Zuordnung ist als Fehlen einer einheitlichen Sekundärstruktur in Cetrorelix-Acetat zu interpretieren und entspricht damit dem Resultat der NMR-Analysen der ASTA MEDICA AG [Müller et al. 1994]. Die Amid A-Bande wurde zur Auswertung nicht herangezogen, da die Halbwertsbreiten von Banden in Feststoffspektren und in Lösung gewonnenen Spektren nicht vergleichbar sind.

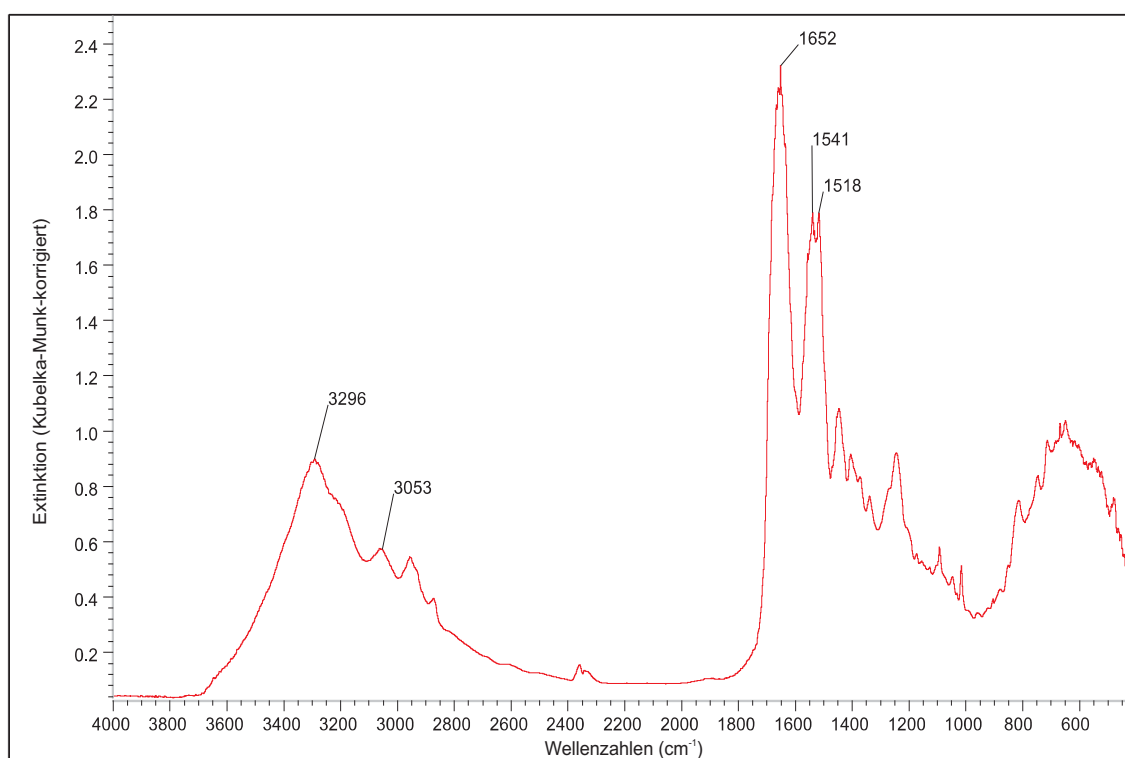


Abbildung 17: Spektrum von festem Cetorelix-Acetat in KBr mit Diffuser Reflexion (DRIFT) als Gesamtspektrum

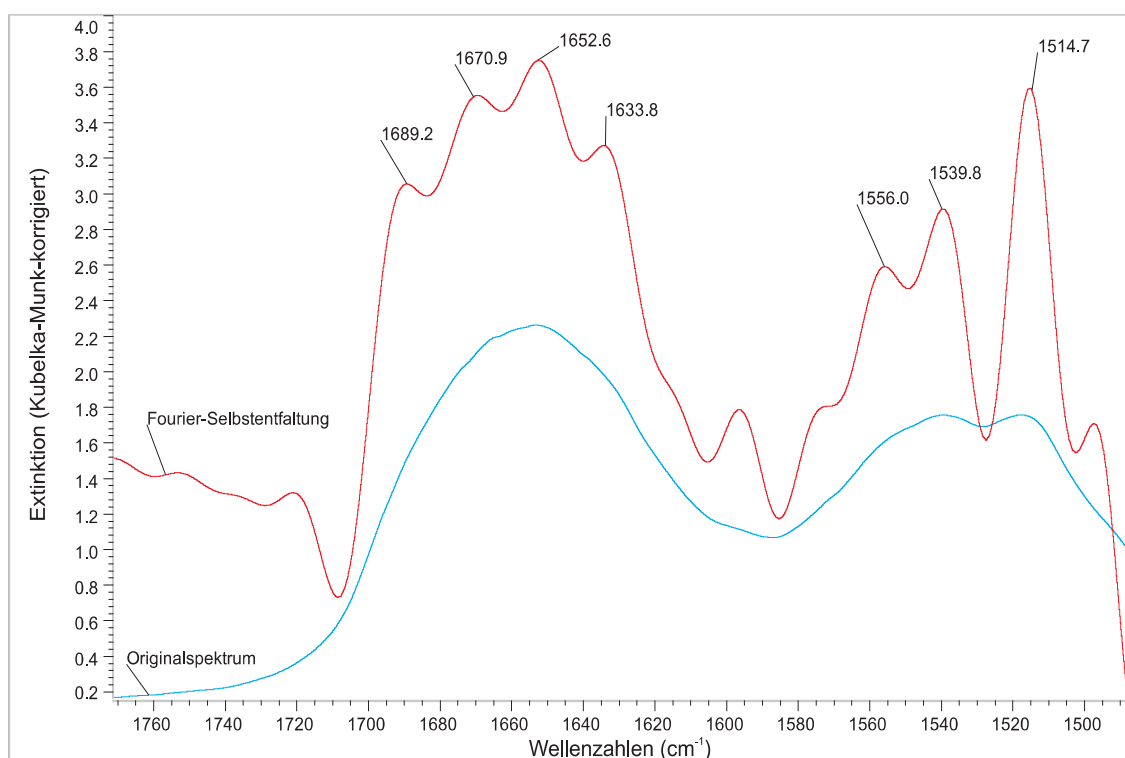


Abbildung 18: Fourier-Selbstentfaltung der Amid I- und II-Banden (FSD mit Parametern $K=2,2$ und $\lambda=20,2 \text{ cm}^{-1}$) des Spektrums von festem Cetorelix-Acetat in KBr

Zur Bestätigung der Interpretation der FSD-Bandenmaxima wurden die Sekundärstrukturanteile mit Hilfe der datenbankgestützten Analyse nach SARVER und KRUEGER (vgl. S. 65) wie folgt ermittelt:

- 30% β -Faltblatt,
- 29% ungeordnete Strukturen,
- 11% α -helikale Strukturen und
- 30% β -turn.

Damit konnte ebenfalls das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Sekundärstrukturelemente im mit KBr vermischten Cetorelix belegt werden.

Die FTIR-Spektren des reinen, festen Cetorelix-Acetates sowie der konzentrierten, wässrigen Lösung des Peptides wurden mit Hilfe der HATR-Aufnahmetechnik mit Diamantkristall gewonnen (Abb. 19 und 20) und konnten aufgrund ihrer hohen Auflösung direkt ausgewertet werden, ohne dass Bandenseparationstechniken anzuwenden waren. Die Einzelmaxima wurden wiederum gemäß Tabelle 6 den verschiedenen Sekundärstrukturelementen wie folgt zugeordnet:

- 1626 cm^{-1} , entspricht β -Faltblatt,
- 1559 cm^{-1} , nicht eindeutig zuzuordnen,
- $1541/1545\text{ cm}^{-1}$, entspricht α -helikalen und ungeordneten Strukturen und
- 1514 cm^{-1} , nicht eindeutig zuzuordnen.

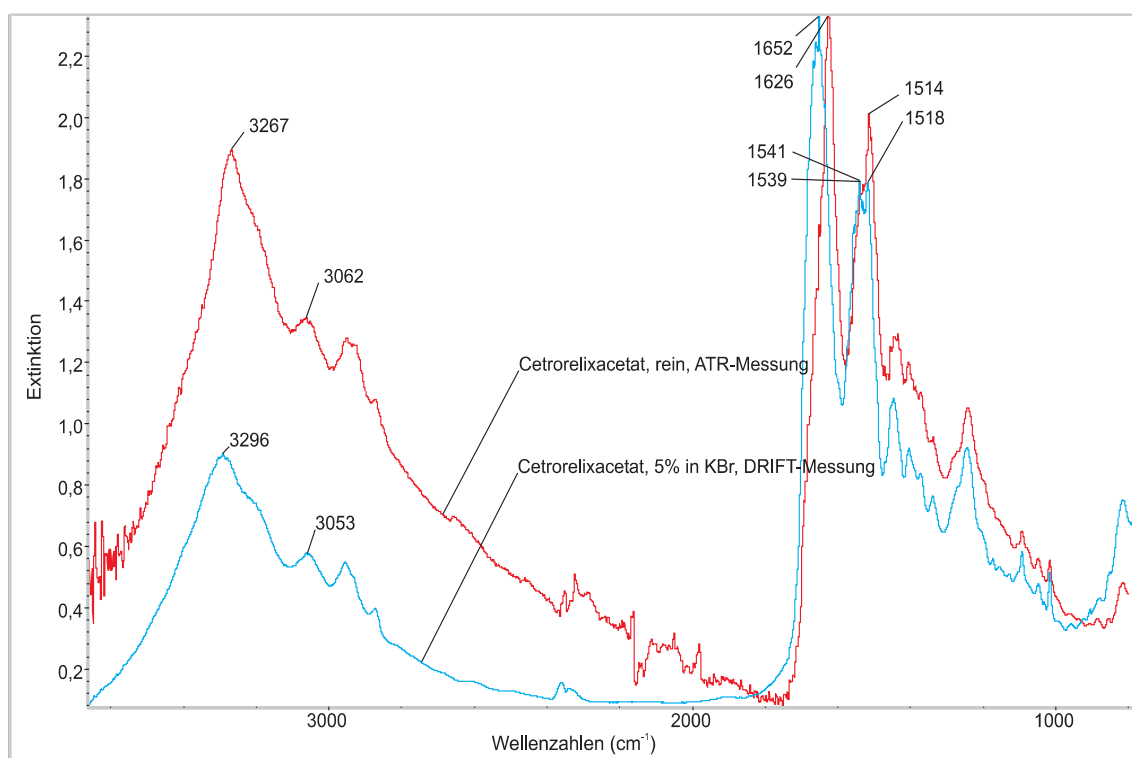


Abbildung 19: Vergleich der Spektren von Cetorelix-Acetat in KBr in Diffuser Reflexion (DRIFT) sowie rein in Abgeschwächter Totalreflexion (Diamant-HATR) als Gesamtspektren

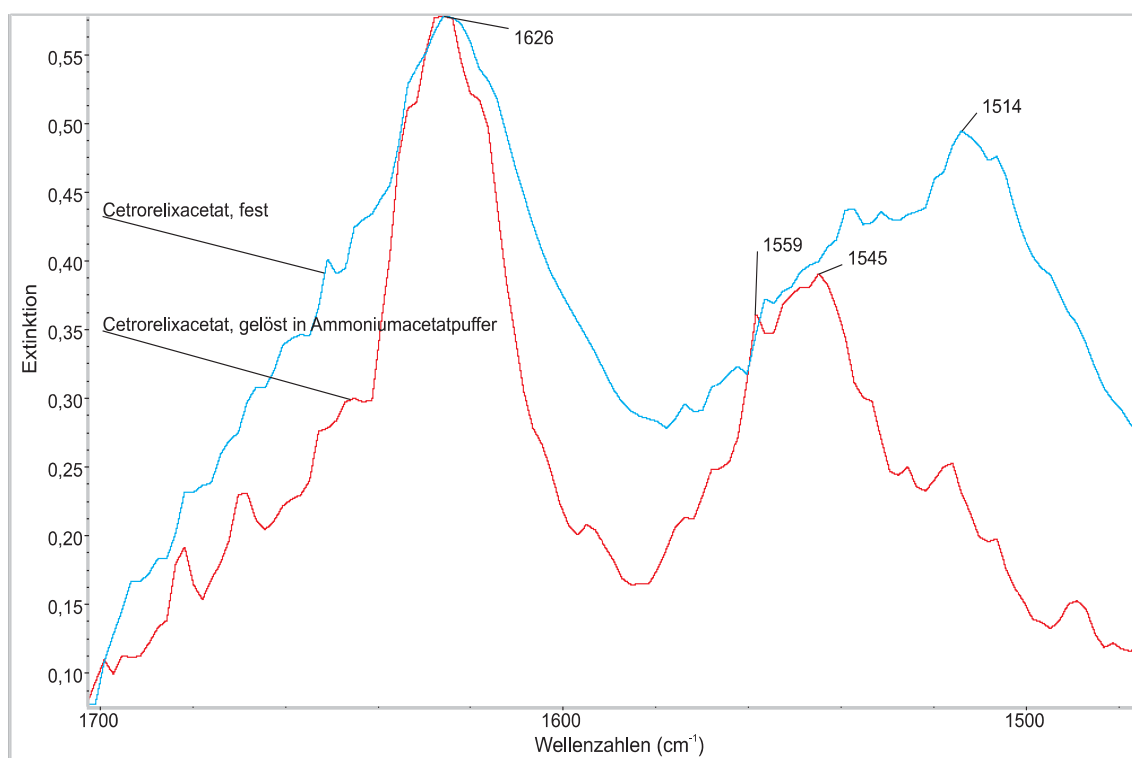


Abbildung 20: Vergleich der Spektren von Cetorelix-Acetat fest und in 2,5 M wässriger Lösung in Abgeschwächter Totalreflexion (Aufnahme auf Diamant-HATR)

4.1.2 MC-Simulation der Sekundärstruktur von Cetrorelix

4.1.2.1 Evaluierung des MC-Simulationsverfahrens anhand von Peptiden bekannter Sekundärstruktur

Neben dem Algorithmus der Konformationssuche ist die Auswahl des Kraftfeldes zur Berechnung der Konformationsenergie entscheidend für eine realitätsnahe Modellierung der Molekülstrukturen. Daher wurden vor der Arbeit mit Cetrorelix zunächst Peptide bekannter Sekundärstruktur untersucht und somit die Kraftfeldparameter überprüft. Da alle Konformationsanalysen anhand von Einzelmolekülen durchgeführt wurden, waren Vergleichsmoleküle auszuwählen, deren Sekundärstruktur ausschließlich intramolekular stabilisiert wird. Als Beispiel eines kleinräumigen, stabilen Strukturmotivs diente der Asx-turn im Tetrapeptid Asn-Asn-Asp-Gly. Dieser Turn wird durch eine Wasserstoffbrücke, ausgehend vom Carbonylsauerstoff einer Asp- oder Asn- („Asx“) Seitenkette zum Wasserstoff des Amidstickstoffes N_{n+2} der übernächsten Peptidbindung im Rückgrat, stabilisiert [Marraud & Aubry 1996]. In der Kristallstruktur der Asn¹¹⁷-Asn¹¹⁸-Asp¹¹⁹-Gly¹²⁰-Sequenz im Adenopoinetin Typ II konnte eine derartige Wasserstoffbrücke neben einer weiteren, zwischen NH_n und CO_n des Rückgrates verlaufenden, nachgewiesen werden [Marraud & Aubry 1996]. Für den Vergleich dieser Sekundärstrukturen mit den Ergebnissen unserer Simulationen stellten wir mit der Software Cerius² 3.5 von MSI ein Set von mehr als 1.000 Konformationen des Tetrapeptides durch Konformationssuche mit Random Sampling unter Fixierung der planar vorliegenden Peptidbindungen sowie Minimierung jedes Konformers über 500 Schritte mit dem Kraftfeld universal 1.02 [Rappe' et al. 1992] von Cerius² her. Die so erhaltenen Konformere wurden nach einer Neuberechnung der Partialladungen mit Hilfe der Charge-Equilibration (QE) [Rappe' & Goddard 1991] von EVOCAP mit der Software TINKER 3.8 unter Anwendung des Kraftfeldes MM3 [Allinger et al. 1989] zu energetisch minimalen Strukturen optimiert. In Vorversuchen hatte sich bei Anwendung von MM3 die Berücksichtigung der 1-3-Wechselwirkungspotenziale im Kraftfeld als erforderlich erwiesen, um gebundene Heteroatome, wie z.B. Cl, korrekt zu modellieren.

Die Raumstruktur der so erhaltenen, energetisch günstigsten, Konformation von Asn-Asn-Asp-Gly zeigt neben der typischen turn-Struktur des Peptidrückgrates auch als engste Wasserstoffbrücke die den Asx-turn stabilisierende Wechselwirkung (Abb. 21). Somit ließen sich die wesentlichen, struktur-stabilisierenden Wechselwirkungen auch in unserem Modell reproduzieren.

Als Modell für eine großräumige, intramolekular stabilisierte Peptidstruktur eignete sich besonders die als α -Helixbildner bekannte Polyaminosäure Polyalanin [Rabenstein 2000] mit einer dem Cetrorelix entsprechenden Kettenlänge von 10 Aminosäuren. Dieses Modell wurde wie Asn-Asn-Asp-Gly als Set von 1000 Konformeren mit Cerius² 3.5 und Random Sampling, QE und MM3-Minimierung mit TINKER erstellt. Die so erhaltenen Konformere wurden mit der α -helikalen Referenzkonformation verglichen. Dabei zeigten die energetisch minimalen Konformere eine starke Stabilisierung durch intramolekulare Wasserstoffbrücken, die in verschiedenartigen Sekundärstrukturformen auftrat. Die α -Helix wies jedoch eine deutlich geringere Konformationsenergie als die günstigsten β -Faltblatt/ β -turn-Strukturen auf (Tab. 9). Daraus resultiert eine Bevorzugung der α -helikalen Raumstruktur (Abb. 22) in unserem Modell, so wie sie auch in neutraler Lösung zu beobachten ist.

4.1.2.2 Anwendung des MC-Simulationsverfahrens auf Cetrorelix

Nachdem so die Reproduzierbarkeit intramolekular stabilisierter Strukturelemente mit Hilfe von Random Sampling und MM3-Minimierung gezeigt werden konnte, wurde auf diese Weise mit Cerius²

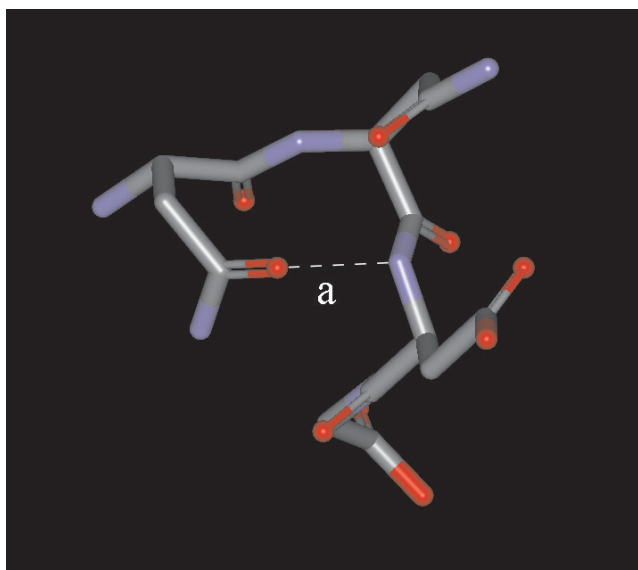


Abbildung 21: Raumstruktur des Asn-Asn-Asp-Gly-Konformers mit minimaler Konformationsenergie aus Random Sampling und MM3-Minimierung, gekennzeichnet ist die Asx-turn stabilisierende Wasserstoffbrücke vom CO der Asn_n-Seitenkette zu NH_{n+2} (a), die auch in Kristallstrukturen gefunden wurde [Marraud & Aubry 1996].

Tabelle 9: Konformationsenergien und Torsionswinkel ϕ/ψ des Peptid-Rückgrates [Rattei 1995] der 5 energetisch günstigsten Sekundärstrukturen von Polyalanin (Dekamer) aus Random Sampling und MM3-Minimierung

Konformationsenergie	ϕ/ψ_2 [°]	ϕ/ψ_3 [°]	ϕ/ψ_4 [°]	ϕ/ψ_5 [°]	ϕ/ψ_6 [°]
2741,5 kJ/mol	-51,1/-40,1	-62,6/-38,5	-71,8/-39,3	-61,3/-46,0	-59,2/-49,8
2751,6 kJ/mol	-75,6/89,4	-71,5/69,6	-65,3/93,5	59,0/34,5	94,9/-18,7
2751,6 kJ/mol	-82,1/76,0	74,7/-64,5	-163,1/138,3	75,0/-53,9	-69,8/83,0
2756,2 kJ/mol	78,2/-37,6	-68,4/79,7	-73,6/72,6	-73,4/71,9	74,9/-47,1
2756,2 kJ/mol	-80,7/74,3	73,7/-64,4	-81,4/58,9	-72,7/7,9	-82,4/61,1
Konformationsenergie	ϕ/ψ_7 [°]	ϕ/ψ_8 [°]	ϕ/ψ_9 [°]	Sekundärstruktur	
2741,5 kJ/mol	-56,6/-42,3	-69,0/-31,2	-82,8/-22,4	α -Helix	
2751,6 kJ/mol	-72,1/90,6	-65,3/80,5	-73,5/85,3	β -Faltblatt/ β -turn	
2751,6 kJ/mol	77,0/-39,5	-74,8/71,4	-78,7/65,5	β -Faltblatt/ β -turn	
2756,2 kJ/mol	-78,7/70,1	63,2/-74,6	-135,3/11,2	β -Faltblatt/ β -turn	
2756,2 kJ/mol	72,9/-47,0	-52,6/-38,0	-121,9/44,6	β -Faltblatt/ β -turn	

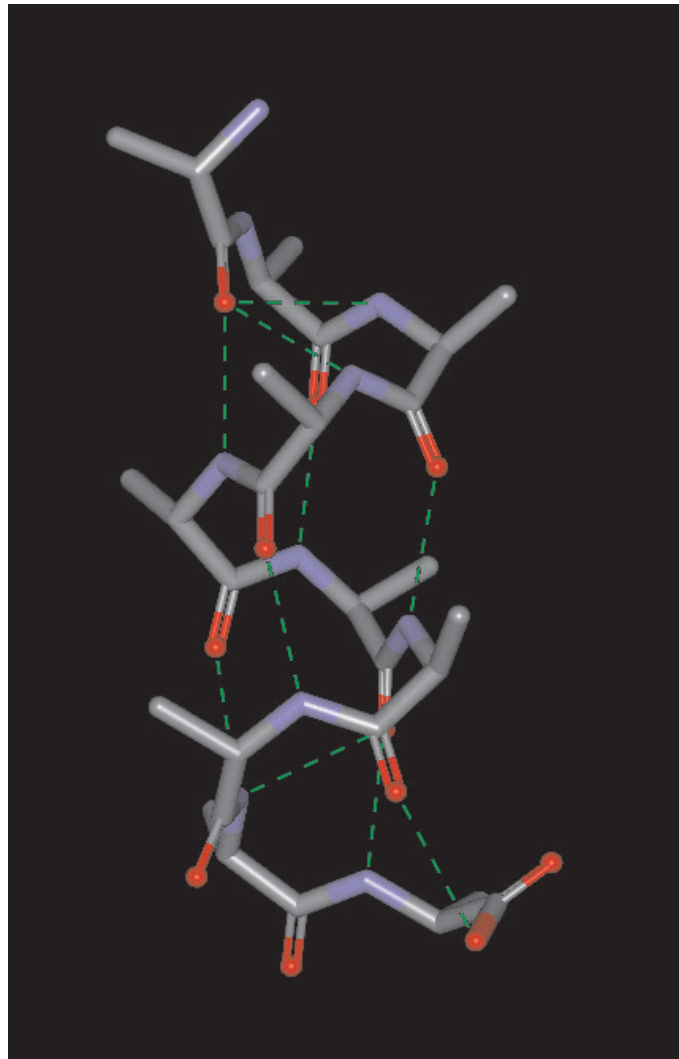


Abbildung 22: Raumstruktur der energetisch günstigsten, α -helikalen Konformation von Polyalanin (Dekamer) aus Random Sampling und MM3-Minimierung

3.5 ein Set von mehr als 10.000 Cetrorelixkonformationen generiert. Nach der Konformationssuche mittels Random Sampling unter Fixierung der planar vorliegenden Peptidbindungen erfolgte eine erste Minimierung jedes Konformers über 500 Schritte mit dem Kraftfeld universal 1.02 in Cerius². Die Anzahl von 10.000 Konformeren ist für eine Reproduktion der globalen energetischen Minimalstruktur zwar in diesem Fall noch nicht ausreichend, jedoch steigt der Aufwand für wesentlich größere Konformationssets mit den derzeitigen technischen Möglichkeiten zu stark an. Die Analyse dieser Konformere kann daher wertvolle Aussagen über die Beweglichkeit des Peptidrückgrates liefern. Nachfolgend wurde für jede dieser Konformationen eine Neuberechnung der Partialladungen mit Hilfe der Charge-Equilibration sowie eine Minimierung bis zum Gradientenabbruch über maximal 20000 Schritte mit der Software TINKER 3.8 mit dem Kraftfeld MM3 durchgeführt. So konnten die durch das Random Sampling erzeugten, teils sehr energiereichen Konformere in energetisch günstigere, räumlich jedoch ähnliche Strukturen überführt werden.

Tabelle 10: Komponenten der MM3-Kraftfeldenergien [Allinger et al. 1989] von 9167 Cetrorelixkonformationen aus Random-Sampling und MM3-Minimierung

Energiekomponente	Mittelwert [kJ/mol]	Standardabweichung [kJ/mol]
bond-stretching	759,5	7,1
angle-bending	165,8	12,1
stretch-bend	-11,3	2,1
angle-angle	-3,8	0,4
op-bend	2,5	0,8
torsion-angle	75,4	16,3
stretch-torsion	-9,2	2,1
1-4-vdw	3849,8	5,9
other-vdw	-108,0	18,4
charge-charge	560,6	12,6
charge-dipole	-33,9	18,8
dipole-dipole	-32,2	13,0
Gesamtenergie	5215,1	48,6

Für die Analyse dieses Sets von Cetrorelixkonformationen im Vakuum wurde eine Energieschranke bei 6280 kJ/mol verwendet, um energetisch ungünstige lokale Minima des Energiepotenzials aus der Bewertung auszuschließen. Die Verteilung der erhaltenen Gesamtenergien und deren Gegenüberstellung mit den Gyrationenradien der Cetrorelixkonformere zeigt Abb. 23. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen MM3-Teilenergien wurden in Tab. 10 zusammengefasst.

Mit dem Ziel der realitätsnahen Analyse der im Vakuum berechneten Cetrorelix-Konformere wurde deren Stabilisierung im Solvens Wasser untersucht. Mit den verfügbaren Rechenkapazitäten konnten dabei sowohl die explizite Solvatation zweier ausgewählter Cetrorelixkonformere mit Wassermolekülen, als auch die Solvatation des gesamten Konformationssatzes mit dem Kontinuumsverfahren GB/SA durchgeführt werden.

Für die explizite Berechnung der Solvatationsenthalpie und deren Vergleich bei Konformationen mit geringen und hohen Gyrationenradien wurden je eine gestreckte und eine geknäuelte, energetisch minimale Cetrorelixkonformation aus Random Sampling und MM3-Minimierung ausgewählt. Beide Konformationen wurden mit einer Solvathülle aus Wasser mit einer Dicke von 0,6 nm umgeben (Abb. 24). Diese Dicke ist aufgrund der begrenzten Reichweite der Wechselwirkungen zwischen Solut und Sol-

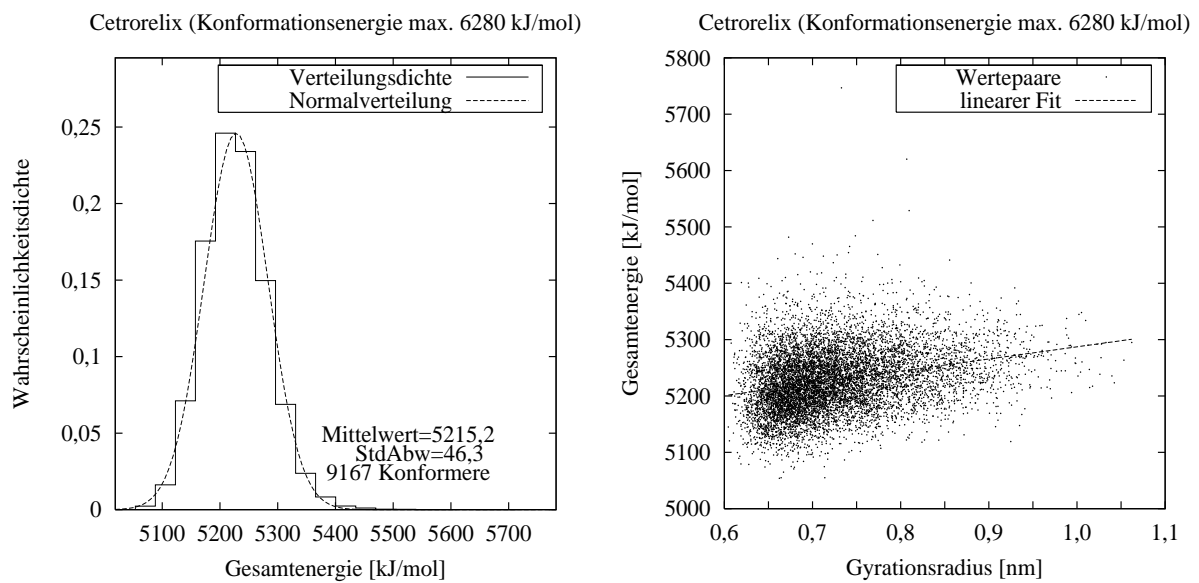


Abbildung 23: Verteilung der Konformationsenergien (links) sowie Zusammenhang von Konformationsenergie und Gyrationradius (rechts) bei Cetorelix-Konformeren aus Random-Sampling und MM3-Minimierung

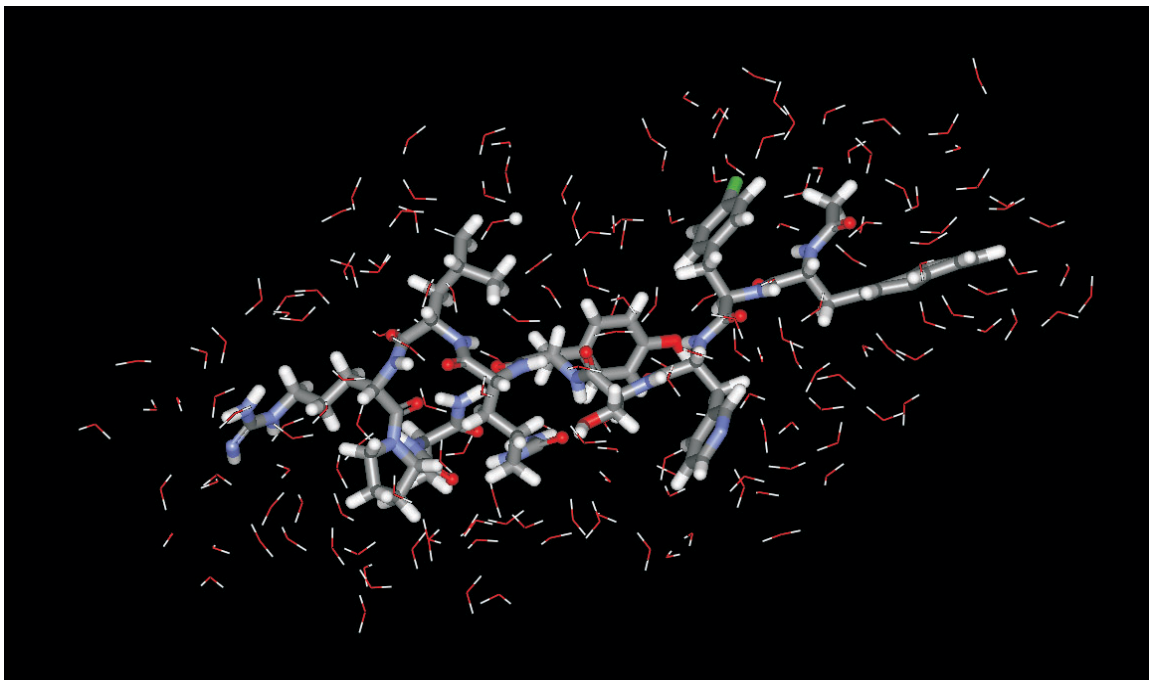


Abbildung 24: Modell eines Cetorelix-Konformers (Stabdarstellung) mit 0,6 nm dicker Solvathülle aus Wasser (Strichdarstellung)

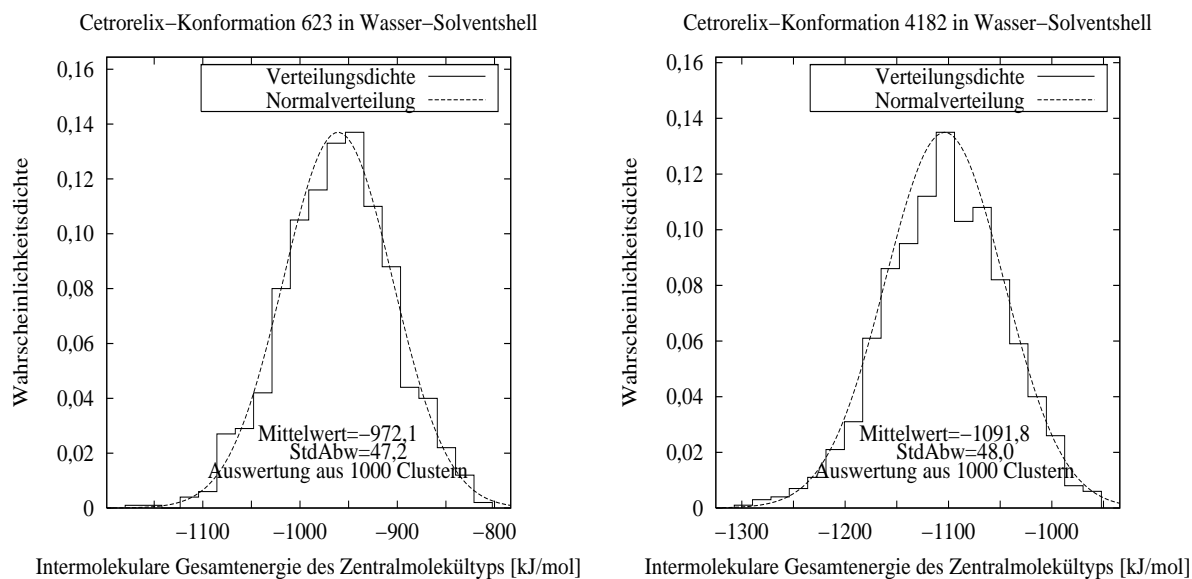


Abbildung 25: Intermolekulare Stabilisierung einer geknäuelten (links) und gestreckten (rechts) Cetorelix-Konformation in 0,6 nm-Solvathülle mit Wasser, berechnet mit EVOCAP

vens ein guter Kompromiss zwischen Modellgröße und Rechenaufwand. Für jedes der beiden Konformere wurde so ein Ensemble aus 1000 Cetorelix-Wasser-Clustern erstellt, deren intermolekulare Stabilisierung in Abb. 25 zusammengestellt wurden.

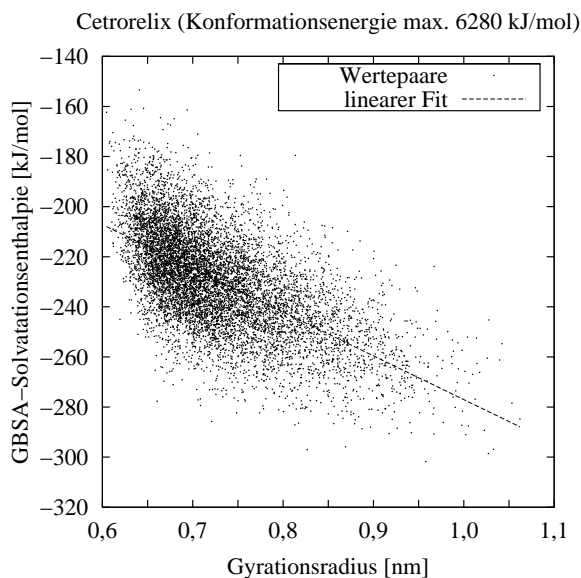


Abbildung 26: Absolute freie GB/SA-Hydratationsenthalpie des Cetorelix-Konformationssets in Abhängigkeit vom Gyrationsradius der Konformere

Für die GB/SA-Solvatation konnten aufgrund des geringen Berechnungsaufwandes alle Cetorelix-Konformere aus Random-Sampling und MM3-Minimierung verwendet werden. Die ermittelten Solvatationsenthalpien sind in Abhängigkeit vom Gyrationsradius der Konformere in Abb. 26 dargestellt.

4.2 Aggregation von Cetrorelix

4.2.1 FTIR-Spektroskopische Untersuchungen von Cetrorelix-Aggregaten

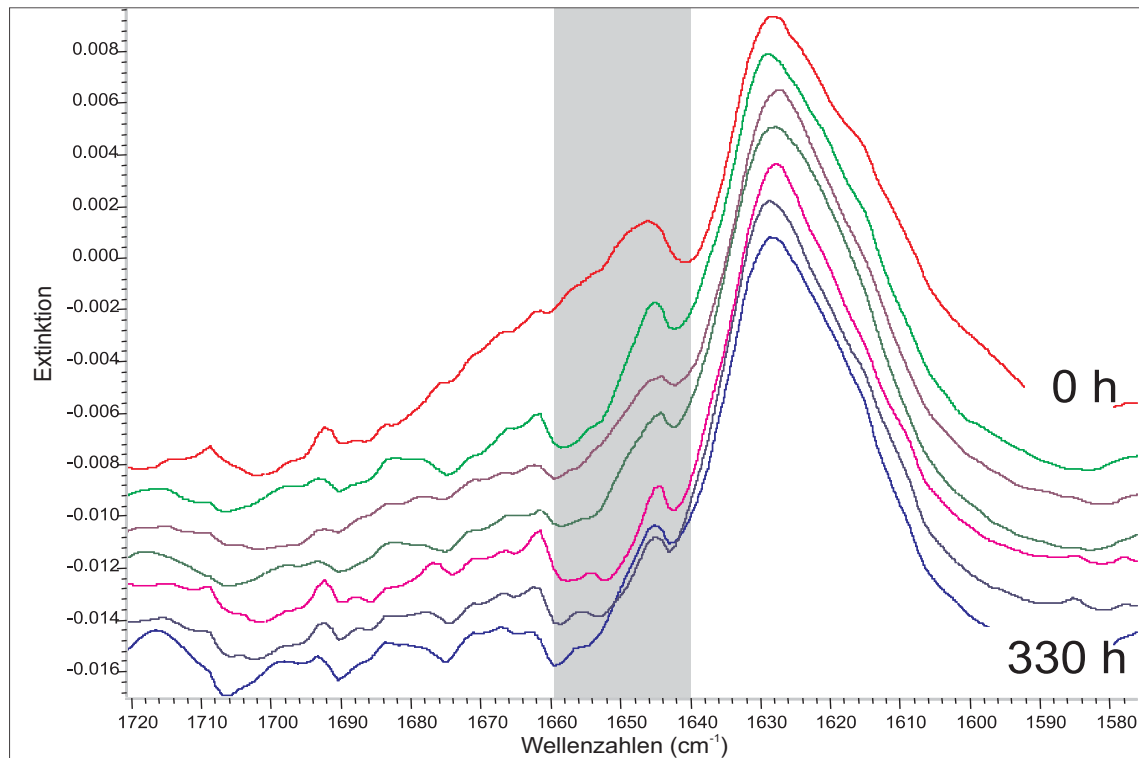


Abbildung 27: FTIR-Spektren einer 10^{-2} M, wässrigen Cetrorelixlösung auf einem ZnSe-HATR-Kristall in zeitlicher Auflösung von Messbeginn bis zu 330 Stunden

Zunächst wurden ausgehend von den Analysen des festen Cetrorelix (vgl. S. 78) mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie Untersuchungen wässriger Lösungen des Peptides durchgeführt. Derartige Messungen können jedoch aufgrund der hohen IR-Absorption des Wassers nicht in traditioneller Aufnahme-technik mit Küvetten im IR-Strahlengang durchgeführt werden. Zwar ließe sich das Lösungsmittel Wasser durch D_2O ersetzen, welches im Bereich der für die Sekundärstrukturanalyse wesentlichen Amid-Banden kaum Eigenabsorptionen aufweist, doch beeinflusst D_2O die Konformation des Peptides und die Ausbildung der empfindlichen Aggregate möglicherweise in anderer Weise als das Wasser. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit kamen daher wässrige Lösungen in Verbindung mit der HATR-Aufnahmetechnik zum Einsatz. So ließen sich FTIR-Spektren von Lösungen mit Cetrorelixkonzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-4} mol/l aufnehmen (Abb. 27 und 28). Die Messzeit betrug pro Spektrum 1-2 Minuten. Die für die Analyse der Sekundärstruktur des Peptides sensitiven Amid I-Banden der FTIR-Spektren ließen sich als zwei typische Einzelmaxima deutlich erkennen:

- $1640-1660\text{ cm}^{-1}$, entspricht α -helikalen und ungeordneten Strukturen und
- $1620-1630\text{ cm}^{-1}$, entspricht β -Faltblatt.

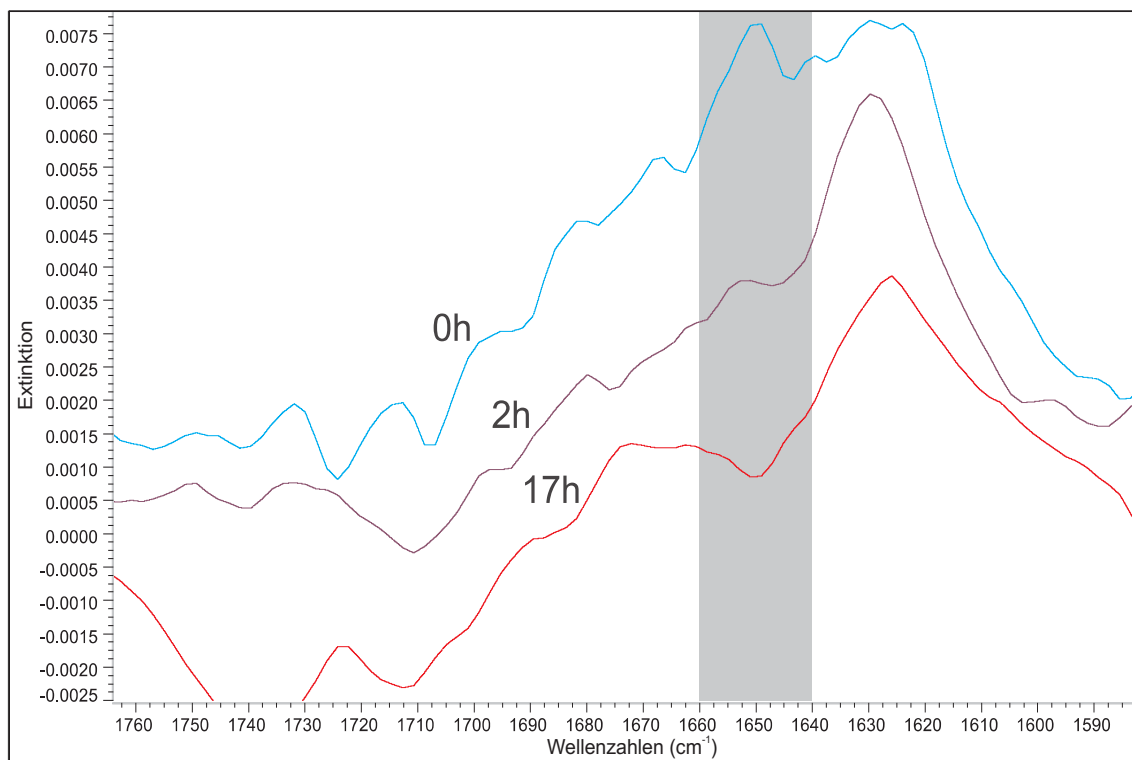


Abbildung 28: FTIR-Spektren einer 10^{-4} M, wässrigen Cetorelixlösung auf einem Diamant-HATR-Kristall in zeitlicher Auflösung von Messbeginn bis zu 17 Stunden

4.3 Charakterisierung von Struktur und Zusammensetzung von Cetrorelix-Komplexen

4.3.1 Einfluss der Stöchiometrie von Cetrorelix-Komplexen auf deren Liberationseigenschaften

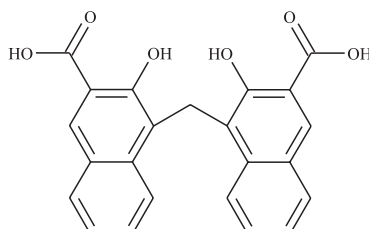


Abbildung 29: Strukturformel von Embonsäure (4,4'-Methylenbis-[3-hydroxynaphthalin-carbonsäure-(2)])

Im Rahmen der Strukturuntersuchungen zu Cetrorelix und dessen Komplexen wurden mit Hilfe der dynamischen Liberation zunächst der Einfluss der Komplexstöchiometrie des bekannten und eingehend charakterisierten Komplexes mit Embonsäure auf das Freisetzungsverhalten untersucht und mit der Freisetzungskinetik des reinen Peptides in den verschiedenen Liberationenmedien verglichen. Embonsäure bildet als aromatische Hydroxycarbonsäure schwerlösliche Komplexe mit Cetrorelix, die für einen zukünftigen klinische Einsatz als Retardsystem in Frage kommen (Abb. 29).

Tabelle 11: Freisetzungparameter der dynamischen Liberationen von Cetrorelix-Embonsäure-Komplexen verschiedener Stöchiometrie in Ammoniumacetat und Ringerlösung

Medium Parameter	Ammoniumacetat			Ringerlösung		
	<i>a</i>	<i>b</i> [h ⁻¹]	<i>c</i> [h ⁻¹]	<i>a</i>	<i>b</i> [h ⁻¹]	<i>c</i> [h ⁻¹]
Stöchiometrie 1:1	0,06	0,08	0,007	0,15	0,58	0,009
Stöchiometrie 1:2	0,06	0,45	0,006	0,04	0,36	0,006
Vergleich: Cetrorelix-Acetat	0,97	5,20		0,22	1,85	0,004

Hierzu wurden Cetrorelix-Embonsäurekomplexe in den Zusammensetzungen 1:1 und 1:2 durch Fällung der Cetrorelix-Base sowie des Cetrorelix-Acetates aus DMA/Wasser hergestellt (siehe S. 63). Nachfolgend wurden diese Komplexe durch dynamische Liberation sowie FTIR-Spektroskopie charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Liberationen sind in Abbildung 30 und Tabelle 11 zusammengefasst.

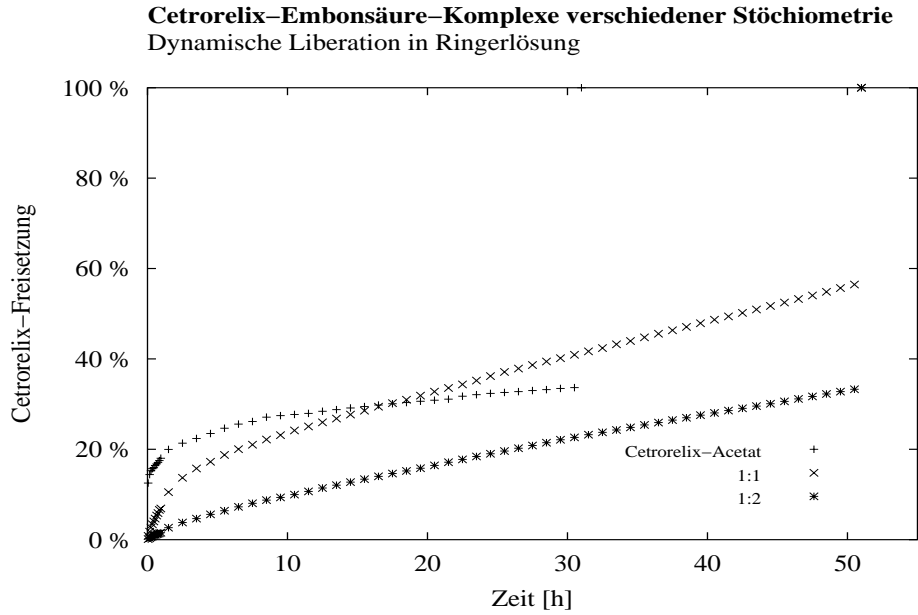
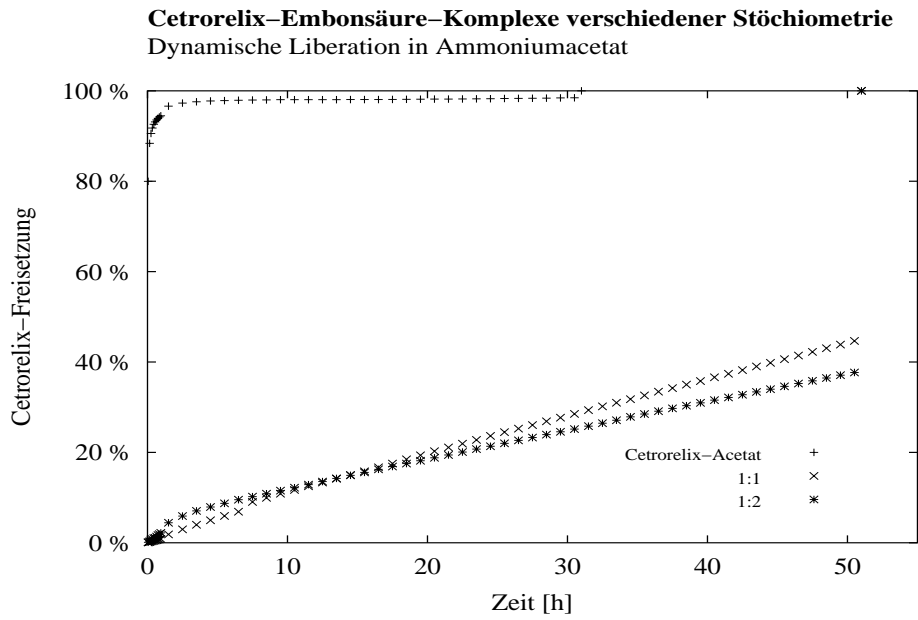


Abbildung 30: Freisetzungskinetik von Cetorelix sowie Cetorelix-Embonsäure-Komplexen verschiedener Stöchiometrie mit je 10 mg Cetorelixgehalt

4.3.2 FTIR-spektroskopische Untersuchungen zur Stöchiometrie von Cetrorelixkomplexen

Da mit Hilfe von FTIR-Spektren bereits Einblicke in die Struktur von Cetrorelix und dessen Aggregation gewonnen werden konnten (s. Abschnitt 5.2.3), wurde diese Technik nun auch für die Analyse der Komplexe eingesetzt. Als Komplexpartner dienten Embonsäure sowie aliphatische Carbonsäuren, deren Komplexe bereits mittels statischer und dynamischer Liberation präzise untersucht worden waren.

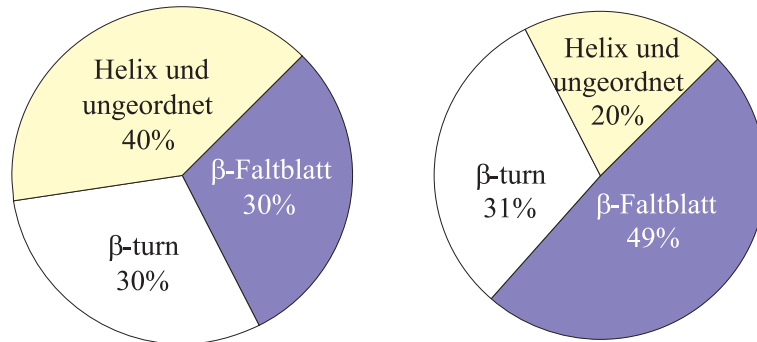


Abbildung 31: Sekundärstrukturanteile von Cetrorelix als Acetat (links) sowie im 1:2-Komplex mit Embonsäure (rechts)

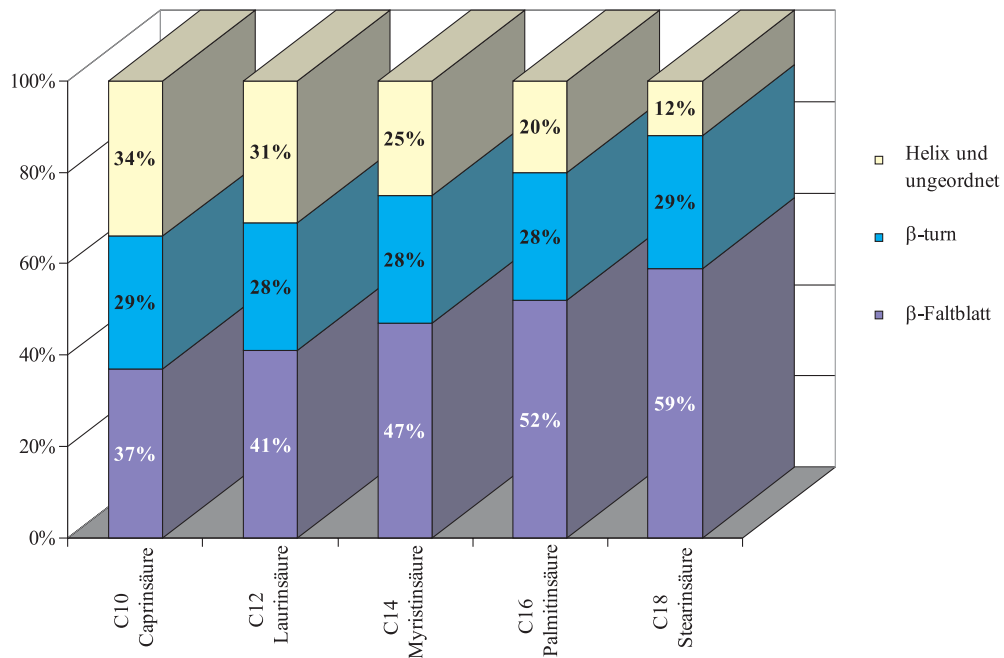


Abbildung 32: Sekundärstrukturanteile von Cetrorelix in 1:1-Komplexen mit aliphatischen Carbonsäuren

Da Embonsäure und die untersuchten aliphatischen Carbonsäuren im Bereich der Amid I-Bande des

Cetorelix nur geringe Extinktionen aufweisen, konnten zuerst die Veränderungen der Sekundärstruktur von Cetorelix in den Komplexen anhand der datenbankgestützten Spektralanalyse bestimmt werden (siehe S.65). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den Abb. 31 und 32 zusammengefasst.

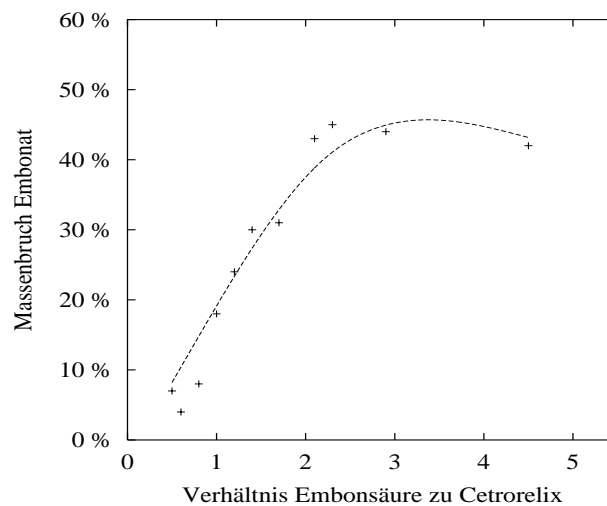


Abbildung 33: Massenbruch des Embonates an Cetorelix-Embonsäurekomplexen der Zusammensetzung 2:1 bis 1:4

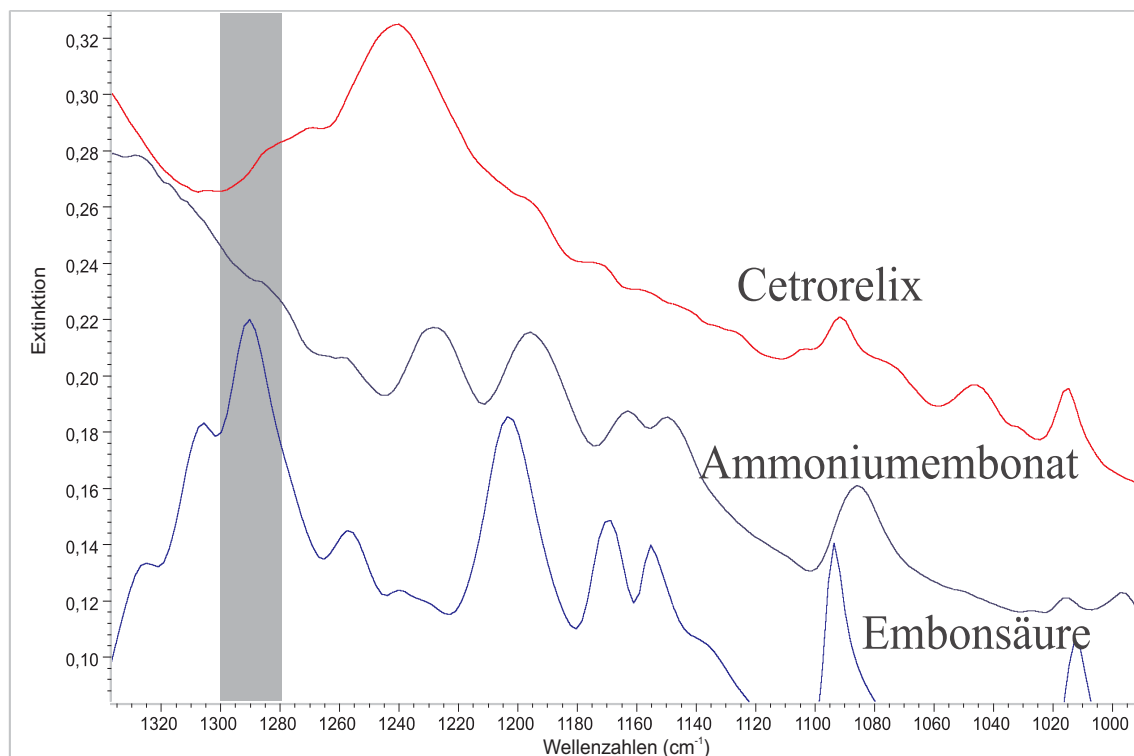


Abbildung 34: Vergleich der FTIR-Spektren von Cetorelix, Embonsäure und Ammoniumembonat

Anhand der FTIR-Spektren der Cetorelix-Embonsäure-Komplexe konnte darüber hinaus eingehend der Zustand des Komplexpartners studiert werden. Der Vergleich der FTIR-Spektren von Cetorelix,

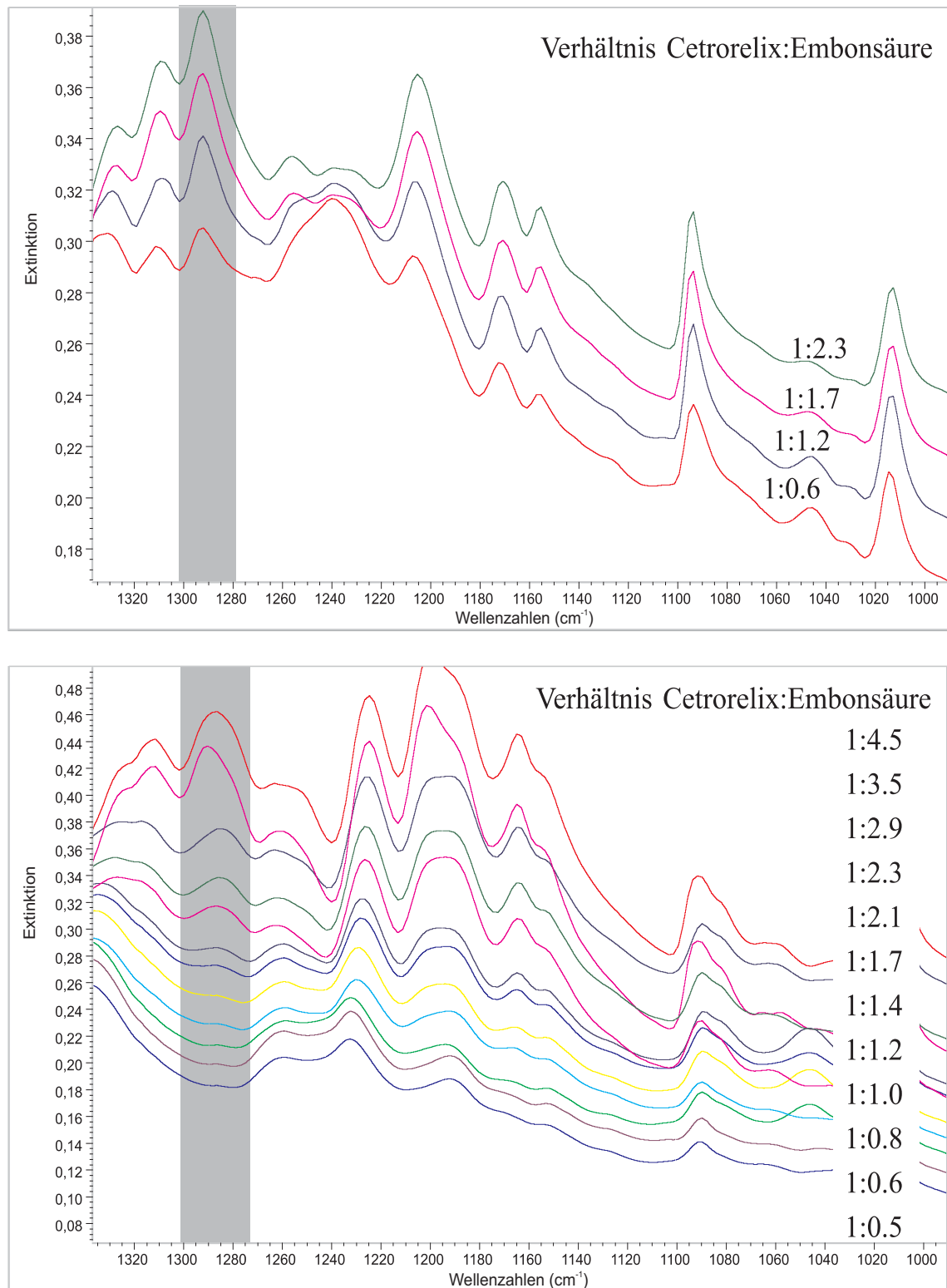


Abbildung 35: Vergleich der FTIR-Spektren von Cetorelix-Embonsäure-Gemischen (oben) und -Komplexen (unten) im Bereich der Embonsäurebande bei 1290 cm^{-1}

Embonsäure und Ammoniumembonat (Abb. 34) zeigt eine intensive Bande freier Embonsäure mit protonierten Carboxylgruppen bei 1290 cm^{-1} . In diesem spektralen Bereich zeigen Cetrorelix und das an den Carboxylgruppen deprotonierte Ammoniumembonat keine scharf begrenzte Bande, sodass der Bereich zwischen 1280 und 1300 cm^{-1} für eine direkte Quantifizierung der freien Embonsäure genutzt werden konnte.

Da Ammoniumembonat gegenüber freier Embonsäure und Cetrorelix keine spezifische und scharf begrenzte Bande aufweist, wurde für diese Bestimmung eine quantitative Mehrstoffanalyse der FTIR-Spektren analog dem Verfahren in [Rattei 1995] vorgenommen (Abb. 33).

4.4 Entwicklung neuer Cetrorelix-Komplexe

4.4.1 Analyse bekannter Cetrorelix-Komplexe

Zunächst wurden zur Erstellung einer Basis von Vergleichsdaten der Freisetzungseigenschaften die bereits intensiv *in vitro* und *in vivo* getesteten Cetrorelix-Komplexe mit Embonsäure sowie zweier Polyaminosäuren synthetisiert und durch dynamische Liberationsanalyse in Ammoniumacetat- und Ringerlösung charakterisiert.

Cetrorelix-Embonsäure-Komplex

Der Komplex mit Embonsäure wurde im molaren Verhältnis der Komplexpartner von 1:1 nach herkömmlicher Vorschrift durch Fällung und nachfolgende Gefriertrocknung hergestellt. Dazu wurden die Komplexpartner gemeinsam eingewogen, in wenig DMA und Wasser gelöst und durch Zugabe von Wasser gefällt (siehe S. 63). Dabei schied sich der Komplex als gallertartige Masse in einer sonst klaren Lösung ab. Durch die dynamische Liberationsanalyse konnte in Ammoniumacetatlösung eine flächenunabhängige Freisetzung mit fast linearer Auflösung des Komplexes beobachtet werden (Abb. 36, oben). In Ringerlösung ist der Komplex durch einen kombinierten Freisetzungstyp mit einer Anfangsfreisetzung von 15% des Wirkstoffs gekennzeichnet (Abb. 36, unten).

Cetrorelix-Polyasparaginsäure-Komplex

Für die Herstellung des Komplexes von Cetrorelix mit Polyasparaginsäure wurde die Herstellungsvorschrift aus [Murgas 1998] verwendet (siehe S. 63). Als Komplexpartner diente Poly-L-Asparaginsäure mit einer mittleren molaren Masse von 14.400 g/mol. Beide Komplexpartner wurden getrennt in Wasser gelöst und unter Rühren vereinigt. Dabei fiel der Komplex in weißen Flocken aus und wurde durch nachfolgende Gefriertrocknung quantitativ isoliert. Bei der dynamischen Liberationsanalyse fällt in beiden Liberationsmedien eine gleichmäßige, lineare Freisetzung ohne Flächenänderung auf (Abb. 37). Darüber hinaus stimmen die Freisetzungsraten des Wirkstoffs in Ammoniumacetatlösung und Ringerlösung überein.

Cetrorelix-Polyglutaminsäure-Komplex

Die Herstellung des Komplexes von Cetrorelix mit Poly-L-Glutaminsäure einer mittleren molaren Masse von 46.200 g/mol erfolgte analog dem Polyasparaginsäure-Komplex (s.o. sowie S. 63). Sowohl der Habitus des Komplexes, als auch die Freisetzungskinetik der dynamischen Liberation sind dem Polyasparaginsäurekomplex sehr ähnlich (Abb. 38). Festzustellen ist jedoch eine um ca. 25% geringere Freisetzungsraten in beiden Liberationsmedien (Tab. 12), gekennzeichnet durch den Parameter c .

Die kinetischen Parameter der dynamischen Liberationen wurden in Tab. 12 zusammengefasst.

4.4.2 Evaluierung des MC-Simulationsverfahrens von Cetrorelix-Komplexen

Das neu entwickelte MC-Simulationsverfahren für Cetrorelix-Komplexe wurde zunächst an den bekannten und gut charakterisierten Komplexen mit den Komplexpartnern Embonsäure sowie Mono-

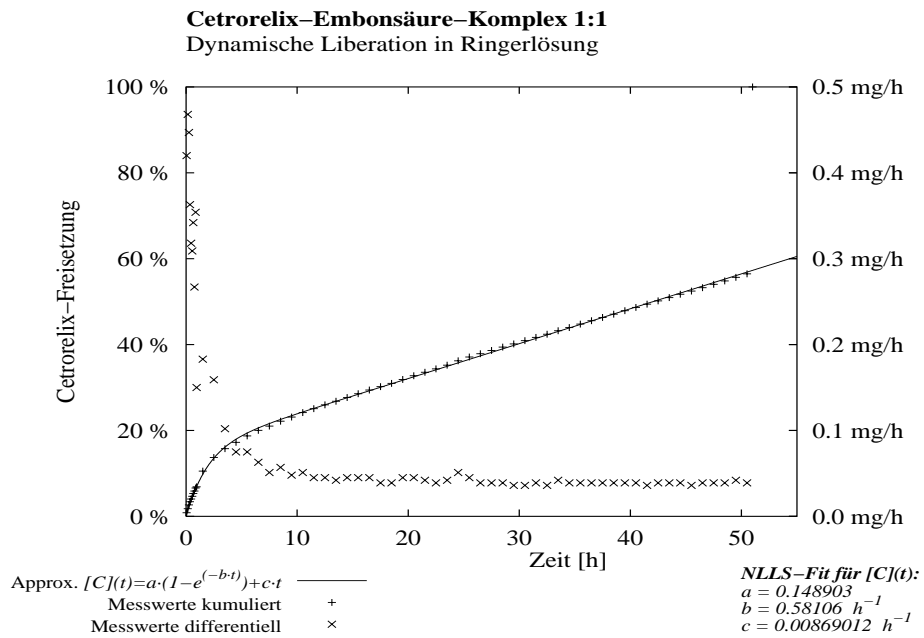
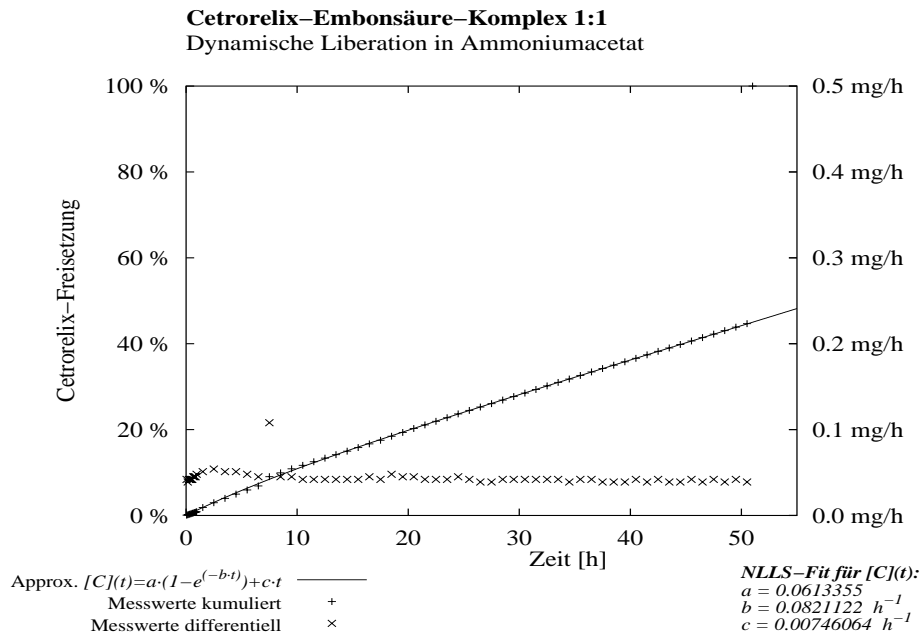


Abbildung 36: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-Embonsäure-Komplexes

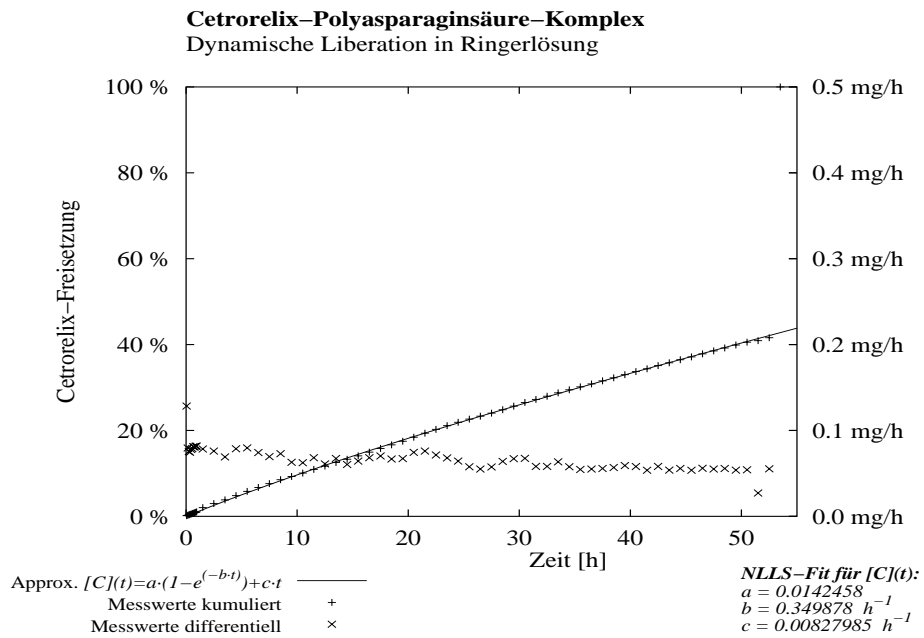
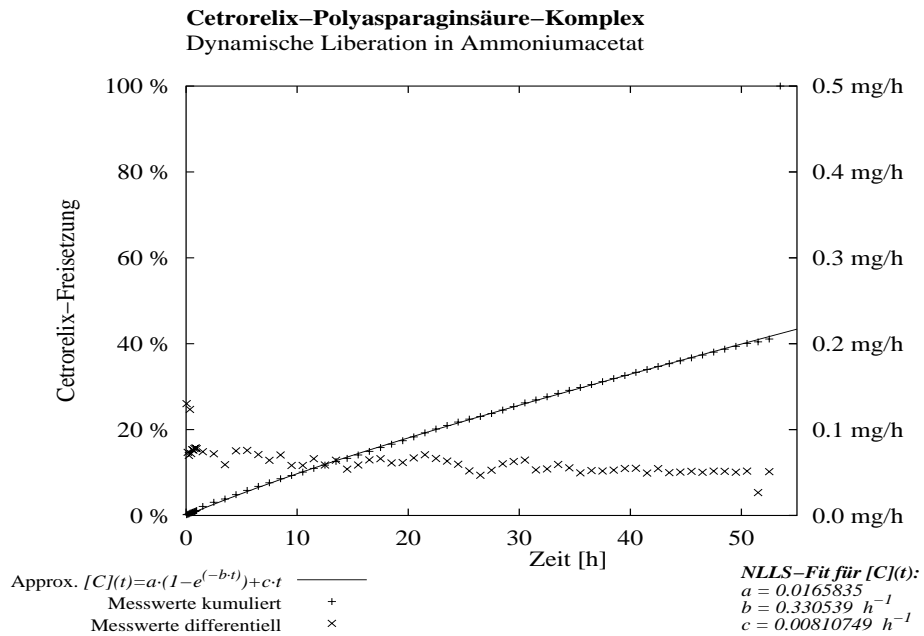


Abbildung 37: Freisetzungskinetik des Cetorelix-Polyasparaginsäure-Komplexes

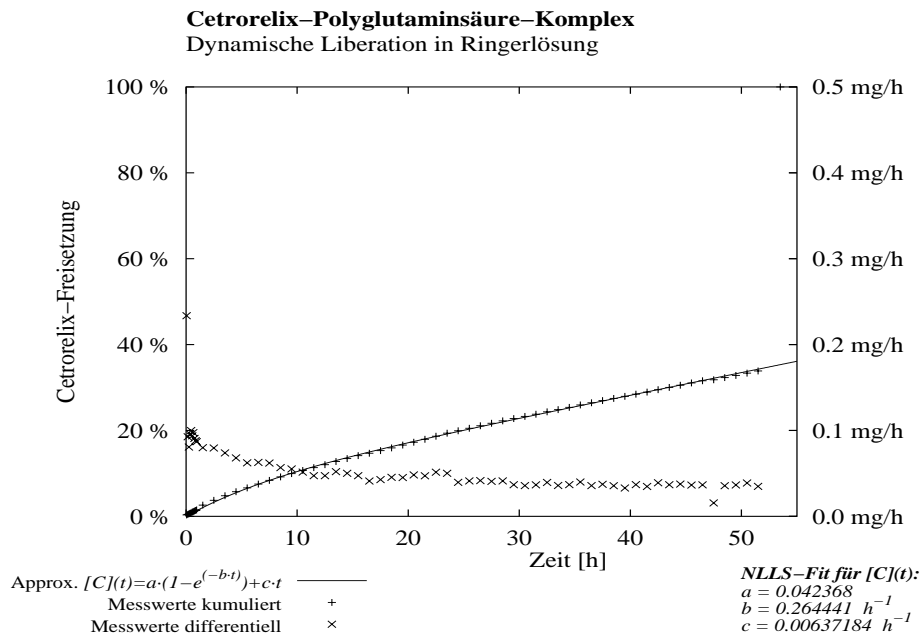
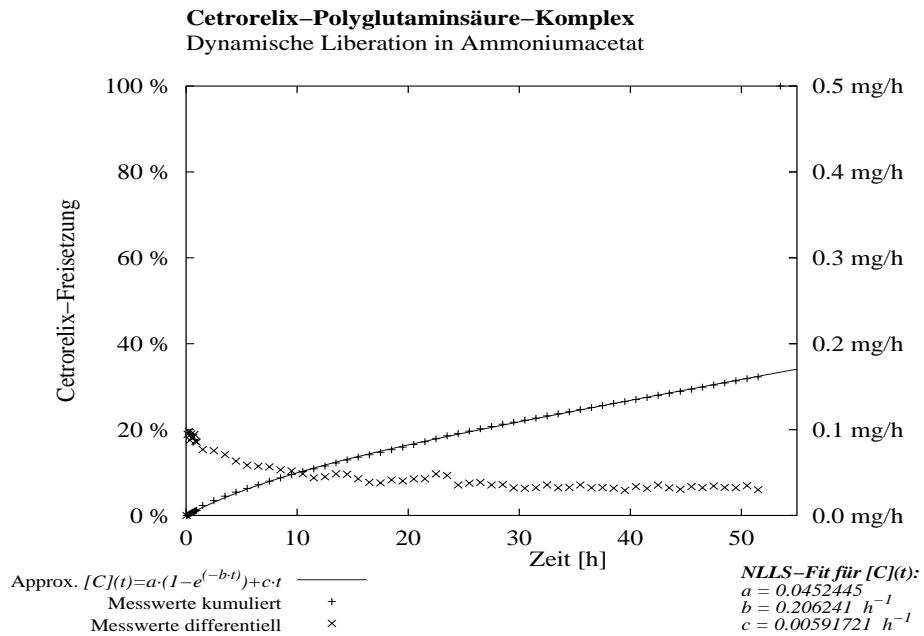


Abbildung 38: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-Polyglutaminsäure-Komplexes

Tabelle 12: Freisetzungparameter der dynamische Liberationen von Cetrorelix-Embonsäure- und Cetrorelix-Polyaminosäurekomplexen in Ammoniumacetat und Ringerlösung

Medium Parameter	Ammoniumacetat			Ringerlösung		
	<i>a</i>	<i>b</i> [h^{-1}]	<i>c</i> [h^{-1}]	<i>a</i>	<i>b</i> [h^{-1}]	<i>c</i> [h^{-1}]
Cetrorelix-Embonsäure-Komplex	0,06	0,08	0,007	0,15	0,58	0,009
Cetrorelix-Poly-Asp-Komplex	0,017	0,33	0,008	0,014	0,35	0,008
Cetrorelix-Poly-Glu-Komplex	0,05	0,21	0,006	0,04	0,26	0,006
Vergleich: Cetrorelix-Acetat	0,97	5,20		0,22	1,85	0,004

und Dicarbonsäuren erprobt. Als Vergleichsmoleküle wurden die nicht als Komplexpartner bekannten Substanzen Phenol, Benzol, Pyridin und Naphthalin ausgewählt. Es wurden für jeden Komplexpartner je 10000 Cluster der Stöchiometrien 1:1 und 1:2 berechnet und aus den Verteilungen der berechneten Wechselwirkungen die energetischen Parameter bestimmt (Tab. 13 und 14).

4.4.3 Anwendung der MC-Simulationen auf Komplexe mit neuartigen Komplexpartnern

Das neu entwickelte und an Mono- und Dicarbonsäuren erprobte MC-Simulationsverfahren wurde für die Simulation der Komplexe mit den neuartigen Komplexpartnern Salicylsäure, Acetylsalicylsäure, β -Hydroxynaphthoesäure, β -Acetoxynaphthoesäure und den 8 ausgewählten Dipeptiden eingesetzt. Es wurden für jeden Komplexpartner je 10000 Cluster der Stöchiometrien 1:1 und 1:2 berechnet und aus den Verteilungen der berechneten Wechselwirkungen die energetischen Parameter bestimmt (Tab. 15-18).

Tabelle 13: Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelix und Aromaten, Carbonsäuren und Embonsäure in der Stöchiometrie 1:1

Energie [kJ/mol] Komplekspartner	Cetro			spec-ec			spec-ev			spec-et			GB/SA	
	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ
Benzol	6440	45,2	5628	-9,2	5,0	-18,8	-12,1	2,9	-15,9	-20,9	5,4	-32,7	-286	15,5
Naphthalin	6434	46,5	5571	-11,3	6,3	-27,2	-16,3	4,2	-23,4	-27,6	6,7	-44,8	-284	15,5
Phenol	6433	46,1	5589	-18,8	8,8	-51,1	-11,3	3,3	-16,3	-30,6	8,8	-62,4	-304	15,5
Pyridin	6437	44,8	5634	-15,1	7,1	-35,6	-10,5	2,9	-14,2	-25,5	7,5	-47,3	-291	15,1
Oxalsäure	6414	47,7	5497	-40,6	14,7	-128	-2,9	2,9	-6,7	-43,5	13,8	-119	-322	15,9
Malonsäure	6386	49,0	5425	-69,9	19,7	-227	-1,7	3,3	-6,7	-71,2	18,8	-216	-341	16,7
Bernsteinsäure	6401	49,0	5435	-53,6	18,0	-183	-4,2	3,3	-8,8	-57,8	17,6	-182	-346	16,3
Glutarsäure	6393	48,1	5465	-61,1	19,3	-210	-4,6	3,8	-10,0	-65,7	18,8	-210	-354	16,7
Adipinsäure	6404	48,1	5483	-51,5	17,2	-168	-6,3	3,8	-11,3	-57,4	17,2	-174	-353	16,7
Pimelinsäure	6403	47,3	5506	-51,5	17,2	-172	-7,1	3,8	-12,1	-58,2	17,6	-183	-355	16,3
Korksäure	6403	48,6	5462	-52,3	18,0	-183	-7,5	3,8	-13,0	-59,9	18,4	-197	-355	16,7
Acelainsäure	6403	48,1	5473	-52,3	18,8	-192	-8,4	3,8	-13,8	-60,7	19,3	-207	-354	16,7
Sebacinsäure	6403	49,0	5443	-53,2	19,3	-204	-8,8	3,8	-14,2	-61,5	20,1	-220	-353	16,7
Undecandisäure	6403	46,9	5530	-53,2	20,1	-211	-9,2	3,8	-15,5	-62,4	20,5	-229	-351	16,7
Dodecandisäure	6403	49,4	5428	-54,0	20,5	-222	-9,6	4,2	-15,9	-63,6	20,9	-238	-350	16,7
Tridecandisäure	6402	48,6	5462	-54,4	21,4	-240	-10,0	4,2	-16,3	-64,1	21,8	-255	-348	16,7
Tetradecandisäure	6403	47,7	5494	-54,4	21,8	-247	-10,0	4,2	-16,7	-64,5	22,2	-263	-346	16,7
Pentadecandisäure	6403	46,1	5558	-54,4	22,6	-257	-10,5	4,2	-17,6	-64,5	23,0	-275	-343	17,2
Hexadecandisäure	6403	47,3	5512	-55,3	23,0	-265	-10,5	4,6	-18,0	-65,7	23,0	-281	-341	17,2
Heptadecandisäure	6403	46,9	5515	-55,7	23,4	-276	-10,5	4,6	-18,8	-66,2	23,9	-293	-339	17,2
Octadecandisäure	6403	49,4	5419	-54,8	23,9	-279	-10,9	4,6	-18,8	-65,3	23,9	-295	-336	17,2
Nonadecandisäure	6403	46,1	5553	-55,3	23,9	-285	-10,9	4,6	-19,7	-66,2	24,3	-302	-334	17,6
Icosandisäure	6403	47,3	5503	-54,8	24,7	-297	-10,9	5,0	-20,5	-65,7	25,1	-315	-331	17,6
Essigsäure	6410	47,7	5493	-46,9	16,7	-161	-3,3	2,9	-6,7	-50,2	16,3	-157	-319	15,9
Propionsäure	6413	48,1	5489	-45,2	17,6	-171	-5,0	2,9	-8,0	-50,2	17,6	-177	-320	15,9
Buttersäure	6413	49,4	5443	-46,5	18,8	-188	-6,3	2,5	-8,8	-52,8	18,8	-198	-320	15,9
Valeriansäure	6412	47,7	5506	-48,6	19,7	-202	-6,7	2,9	-10,0	-55,3	20,1	-214	-319	15,9
Capronsäure	6410	47,7	5494	-51,1	20,9	-229	-7,5	2,9	-10,9	-58,2	21,4	-242	-317	15,9
Oenanthensäure	6409	48,6	5472	-52,8	22,2	-250	-8,0	3,3	-11,7	-60,7	22,6	-263	-316	15,9
Caprylsäure	6409	46,9	5523	-54,4	23,0	-263	-8,0	3,3	-12,6	-62,4	23,0	-277	-313	15,9
Nonansäure	6408	48,6	5462	-55,7	23,9	-283	-8,4	3,8	-13,4	-64,1	24,3	-299	-311	16,3
Caprinsäure	6407	46,9	5529	-56,5	24,3	-293	-8,4	3,8	-13,8	-64,9	24,7	-309	-309	15,9
Undecansäure	6408	47,7	5495	-57,4	25,1	-309	-8,4	3,8	-14,2	-65,7	25,5	-324	-307	16,3
Laurinsäure	6406	47,3	5506	-57,8	25,5	-321	-8,8	4,2	-15,1	-66,6	26,0	-337	-304	16,3
Tridecansäure	6407	47,3	5505	-58,2	26,0	-331	-8,8	4,2	-15,5	-67,0	26,4	-347	-302	16,3
Myristinsäure	6406	47,7	5501	-59,0	26,8	-344	-8,8	4,6	-16,7	-67,8	27,2	-360	-299	16,3
Pentadecansäure	6407	49,0	5450	-59,5	26,8	-346	-8,8	4,6	-16,7	-68,2	27,2	-363	-297	16,3
Palmitinsäure	6407	46,9	5524	-59,0	27,2	-356	-8,8	4,6	-17,2	-67,8	27,6	-371	-295	16,7
Margarinsäure	6406	46,5	5535	-59,5	27,2	-357	-8,8	4,6	-17,6	-68,7	27,6	-373	-293	16,7
Stearinsäure	6406	46,5	5536	-59,5	27,2	-360	-8,8	5,0	-18,4	-68,7	27,6	-374	-290	16,7
Nonadecansäure	6405	46,9	5526	-59,5	28,1	-371	-9,2	5,0	-18,8	-68,7	28,1	-384	-288	16,7
Icosansäure	6408	47,3	5519	-59,0	28,1	-376	-9,2	5,0	-19,3	-68,2	28,1	-386	-285	17,2
Embonsäure	6404	48,1	5478	-42,7	17,6	-165	-15,9	6,3	-32,7	-58,6	18,0	-187	-376	16,3

Tabelle 14: Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelix und Aromaten, Carbonsäuren und Embonsäure in der Stöchiometrie 1:2

Energie [kJ/mol] Komplektpartner	Cetro			spec-ec			spec-ev			spec-et			GB/SA	
	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ
Benzol	6418	46,5	5558	-17,6	7,1	-36,8	-24,3	4,6	-32,2	-41,9	7,5	-65,7	-277	15,5
Naphthalin	6405	46,1	5552	-21,8	8,8	-53,2	-32,7	6,3	-49,4	-54,4	10,5	-97,1	-274	15,9
Phenol	6402	49,8	5412	-36,8	13,0	-103	-23,0	5,0	-33,9	-59,9	13,0	-128	-313	15,9
Pyridin	6408	46,5	5546	-29,7	10,0	-69,1	-21,4	4,6	-29,3	-51,1	10,5	-94,6	-289	15,5
Oxalsäure	6365	52,8	5248	-80,8	22,6	-282	-6,3	4,6	-13,8	-87,1	20,9	-261	-348	16,7
Malonsäure	6315	56,9	5018	-134	33,5	-586	-4,6	4,6	-13,4	-138	33,1	-572	-386	18,0
Bernsteinsäure	6343	52,3	5249	-103	28,1	-417	-8,8	4,6	-18,0	-112	27,6	-418	-395	18,0
Glutarsäure	6331	54,8	5133	-116	31,4	-507	-10,0	5,0	-20,5	-126	31,4	-518	-412	18,4
Adipinsäure	6349	50,2	5332	-98,0	26,0	-365	-13,0	5,0	-23,0	-111	26,4	-389	-411	18,0
Pimelinsäure	6349	51,5	5289	-98,4	27,2	-390	-14,2	5,4	-25,1	-113	28,1	-425	-413	18,0
Korksäure	6350	51,1	5311	-98,4	27,6	-400	-15,5	5,4	-27,2	-114	28,5	-439	-413	18,4
Acelainsäure	6349	51,1	5302	-98,0	28,9	-430	-16,7	5,4	-28,9	-115	29,7	-473	-412	18,0
Sebacinsäure	6349	50,7	5322	-100	30,1	-464	-17,6	5,9	-31,0	-118	31,4	-514	-409	18,0
Undecandisäure	6349	49,4	5370	-100	30,1	-468	-18,4	5,9	-31,8	-119	31,4	-516	-407	18,0
Dodecandisäure	6350	49,8	5363	-101	31,4	-492	-18,8	5,9	-33,5	-120	32,7	-543	-404	18,4
Tridecandisäure	6349	50,7	5315	-101	31,8	-511	-19,7	6,3	-34,8	-121	33,1	-559	-399	18,4
Tetradecandisäure	6349	50,7	5329	-102	32,7	-529	-20,1	6,3	-35,2	-121	33,5	-576	-395	18,8
Pentadecandisäure	6350	50,2	5337	-103	33,9	-560	-20,5	6,3	-36,8	-123	34,8	-609	-390	18,8
Hexadecandisäure	6349	50,7	5321	-104	34,8	-586	-20,5	6,7	-37,3	-124	36,0	-638	-386	18,8
Heptadecandisäure	6349	49,8	5347	-104	35,2	-597	-20,9	6,7	-38,9	-125	36,0	-648	-382	19,3
Octadecandisäure	6351	49,4	5366	-104	36,0	-617	-21,4	6,7	-39,8	-125	36,8	-665	-376	19,7
Nonadecandisäure	6351	51,1	5306	-103	36,0	-619	-21,4	7,1	-41,4	-124	36,8	-664	-371	19,7
Icosandisäure	6350	49,4	5377	-103	36,8	-641	-21,8	7,1	-42,3	-124	37,7	-691	-367	19,7
Essigsäure	6359	51,1	5321	-91,7	25,1	-345	-7,1	3,8	-13,4	-98,8	24,7	-341	-342	17,2
Propionsäure	6364	49,4	5383	-89,2	26,0	-362	-10,5	3,8	-16,7	-99,6	26,0	-373	-346	16,7
Buttersäure	6365	49,8	5367	-90,4	28,1	-407	-12,6	4,2	-18,8	-103	28,5	-430	-345	17,2
Valeriansäure	6364	50,2	5356	-94,6	30,6	-466	-13,8	4,2	-20,5	-108	31,0	-493	-343	17,2
Capronsäure	6361	49,0	5407	-98,8	32,2	-517	-15,1	4,6	-23,0	-114	33,1	-548	-340	17,2
Oenanthensäure	6359	49,4	5377	-102	33,9	-564	-15,9	4,6	-24,3	-118	34,3	-595	-336	17,2
Caprylsäure	6356	49,0	5388	-105	35,6	-616	-16,3	5,0	-26,0	-121	36,4	-650	-332	17,6
Nonansäure	6356	48,6	5412	-107	36,4	-638	-16,7	5,0	-27,2	-124	36,8	-672	-327	17,6
Caprinsäure	6354	49,0	5389	-109	38,1	-692	-17,2	5,4	-28,9	-126	38,5	-724	-323	17,6
Undecansäure	6354	50,2	5352	-111	40,2	-758	-17,6	5,4	-30,1	-128	40,6	-793	-319	17,6
Laurinsäure	6353	49,4	5377	-111	40,6	-771	-18,0	5,9	-31,4	-129	41,0	-805	-313	18,0
Tridecansäure	6354	50,2	5342	-113	41,0	-788	-18,0	5,9	-32,2	-131	41,4	-821	-309	18,0
Myristinsäure	6354	52,8	5247	-113	42,3	-835	-18,4	6,3	-33,5	-131	42,7	-865	-304	18,0
Pentadecansäure	6354	50,2	5338	-112	42,3	-833	-18,4	6,3	-33,9	-131	42,7	-864	-299	18,0
Palmitinsäure	6354	49,4	5374	-113	42,7	-844	-18,8	6,3	-35,6	-131	43,1	-872	-294	18,4
Margarinsäure	6354	48,6	5416	-113	44,0	-880	-18,8	6,7	-36,8	-131	44,0	-906	-290	18,4
Stearinsäure	6354	48,1	5423	-112	44,0	-888	-18,8	6,7	-36,8	-131	44,4	-916	-284	18,8
Nonadecansäure	6355	50,2	5338	-111	44,0	-886	-19,3	6,7	-38,1	-130	44,4	-912	-280	18,8
Icosansäure	6356	50,7	5330	-110	44,4	-898	-19,7	7,1	-39,4	-129	44,4	-924	-275	19,3
Embonsäure	6353	48,1	5417	-78,7	25,5	-343	-31,4	9,6	-69,9	-110	28,1	-423	-458	18,0

Tabelle 15: Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelax und aromatischen Hydroxycarbonsäuren in der Stöchiometrie 1:1

Energie [kJ/mol] Komplekspartner	Cetro			spec-ec			spec-ev			spec-et			GB/SA	
	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ
Embonsäure	6404	48,1	5478	-42,7	17,6	-165	-15,9	6,3	-32,7	-58,6	18,0	-187	-376	16,3
Salicylsäure	6417	46,1	5563	-35,6	13,4	-107	-10,5	4,6	-18,8	-46,1	13,8	-124	-335	15,9
Acetylsalicyl- säure	6412	47,3	5509	-43,1	17,6	-168	-10,9	4,6	-18,8	-54,0	18,4	-189	-346	15,5
β -Hydroxy- naphthoesäure	6411	45,6	5572	-38,1	15,9	-139	-13,8	5,4	-26,4	-52,3	15,9	-154	-335	15,9
β -Acetoxy- naphthoesäure	6406	48,1	5479	-46,5	20,5	-214	-13,8	5,4	-26,0	-60,3	20,9	-233	-346	15,9

Tabelle 16: Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelax und aromatischen Hydroxycarbonsäuren in der Stöchiometrie 1:2

Energie [kJ/mol] Komplekspartner	Cetro			spec-ec			spec-ev			spec-et			GB/SA	
	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ
Embonsäure	6353	48,1	5417	-78,7	25,5	-343	-31,4	9,6	-69,9	-110	28,1	-423	-458	18,0
Salicylsäure	6372	48,1	5452	-69,1	19,7	-224	-20,9	6,7	-38,5	-90,0	20,9	-263	-375	17,2
Acetylsalicyl- säure	6362	47,3	5470	-82,5	26,4	-364	-21,8	6,7	-39,8	-104	27,6	-414	-396	16,7
β -Hydroxy- naphthoesäure	6363	49,0	5395	-72,4	23,9	-301	-27,6	8,4	-55,3	-99,6	25,1	-353	-376	16,7
β -Acetoxy- naphthoesäure	6352	48,1	5420	-88,3	31,4	-481	-27,2	8,4	-54,4	-116	32,7	-538	-398	16,7

Tabelle 17: Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelax und Dipeptiden in der Stöchiometrie 1:1

Energien [kJ/mol] Komplekspartner	Cetro			spec-ec			spec-ev			spec-et			GB/SA	
	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ
Embonsäure	6404	48,1	5478	-42,7	17,6	-165	-15,9	6,3	-32,7	-58,6	18,0	-187	-376	16,3
Asp-Phe-OMe	6408	49,0	5440	-44,0	18,4	-180	-11,7	4,6	-20,9	-55,7	18,8	-200	-372	16,3
Asp-Gly	6413	46,9	5532	-41,0	13,0	-107	-7,1	4,2	-13,4	-48,1	13,4	-118	-366	16,3
Asp-Val	6410	46,5	5549	-42,3	15,1	-131	-8,8	4,2	-15,9	-51,5	15,9	-151	-368	17,2
Asp-Tyr	6410	45,6	5571	-39,8	14,7	-127	-10,9	5,0	-21,4	-50,7	15,1	-143	-385	16,7
Glu-Ala	6411	47,7	5505	-40,2	13,0	-108	-8,4	4,2	-15,1	-48,6	13,8	-123	-369	16,7
Glu-Gly	6400	46,9	5513	-52,8	17,6	-177	-6,7	4,2	-14,2	-59,9	17,2	-180	-371	16,7
Glu-Tyr	6410	48,1	5477	-40,2	14,2	-122	-11,3	5,0	-21,8	-51,1	14,7	-139	-386	16,7
Arg-Glu	6407	48,6	5465	-46,1	17,2	-165	-10,0	4,6	-18,8	-56,1	18,0	-185	-372	17,6

Tabelle 18: Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelix und Dipeptiden in der Stöchiometrie 1:2

Energien [kJ/mol]	Cetro			spec-ec			spec-ev			spec-et			GB/SA	
	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ	$\langle U \rangle$	μ	σ
Komplexpartner														
Embonsäure	6353	48,1	5417	-78,7	25,5	-343	-31,4	9,6	-69,9	-110	28,1	-423	-458	18,0
Asp-Phe-OMe	6359	49,4	5386	-82,5	26,8	-373	-23,4	7,1	-43,5	-106	28,1	-424	-450	18,0
Asp-Gly	6364	49,4	5386	-77,5	19,3	-228	-15,1	5,9	-27,6	-92,5	20,1	-256	-435	18,0
Asp-Val	6361	49,4	5388	-81,2	22,2	-279	-18,4	5,9	-32,7	-99,6	23,4	-323	-439	18,4
Asp-Tyr	6361	48,6	5422	-74,5	21,4	-259	-22,6	7,5	-44,4	-97,1	22,6	-302	-473	18,4
Glu-Ala	6364	48,1	5431	-77,0	19,3	-224	-17,2	5,9	-30,1	-94,2	20,1	-258	-441	18,0
Glu-Gly	6343	50,2	5334	-100	27,6	-404	-14,2	5,9	-28,5	-114	27,6	-422	-445	18,4
Glu-Tyr	6360	47,7	5447	-74,9	21,4	-254	-23,0	7,5	-45,2	-98,0	22,6	-299	-475	18,4
Arg-Glu	6354	49,4	5385	-87,1	26,0	-354	-20,9	6,7	-39,4	-108	27,2	-406	-446	19,3

4.4.4 Herstellung und Charakterisierung der Komplexe von Cetrorelix mit aromatischen Hydroxycarbonsäuren

Zur Charakterisierung der Cetrorelixkomplexe mit den ausgewählten aromatischen Hydroxycarbonsäuren (Abb. 15) wurden je ca. 30 mg der Komplexe hergestellt (siehe S. 63) und durch dynamische Liberation in Ammoniumacetatlösung sowie Ringerlösung deren Freisetzungseigenschaften bestimmt.

Tabelle 19: Freisetzungparameter der dynamischen Liberationen von Cetrorelix-Carbonsäurekomplexen in Ammoniumacetat und Ringerlösung

Medium Parameter	Ammoniumacetat			Ringerlösung		
	a	$b [h^{-1}]$	$c [h^{-1}]$	a	$b [h^{-1}]$	$c [h^{-1}]$
Cetrorelix-Salicylsäure-Komplex	0,27	1,02	0,018	0,07	0,37	0,009
Cetrorelix-Acetylsalicylsäure-Komplex	0,73	0,65	0,005	0,09	0,69	0,011
Cetrorelix- β -Hydroxynaphthoesäure-Komplex	0,53	0,43	0,011	0,50	0,34	0,008
Cetrorelix- β -Acetoxynaphthoesäure-Komplex	0,53	0,71	0,008	0,26	1,28	0,014
Vergleich: Cetrorelix-Acetat	0,97	5,20		0,22	1,85	0,004

Die Charakterisierung der Komplexe mit aromatischen Hydroxycarbonsäuren wird im folgenden zusammengefasst.

Cetrorelix-Salicylsäure-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1,5

Habitus: schwach rosa, körnig

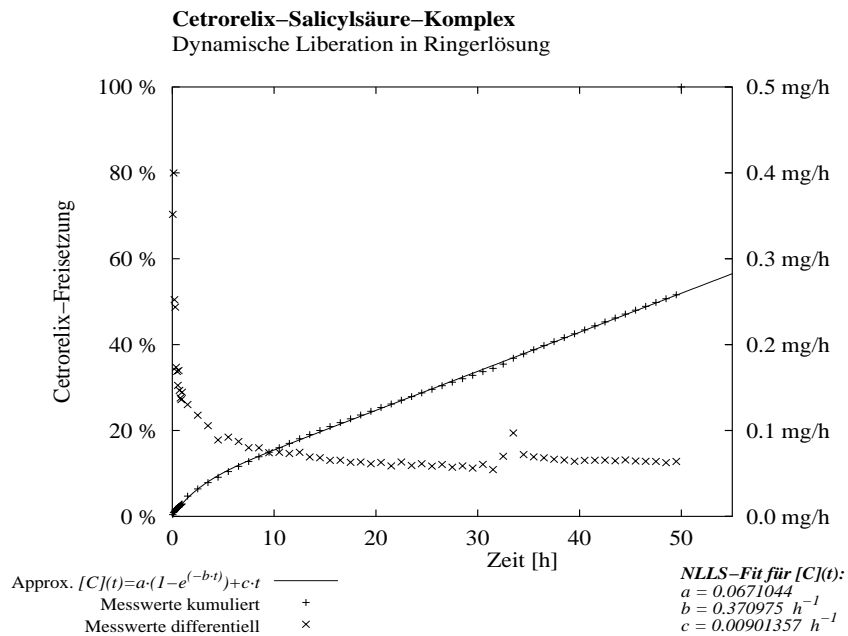
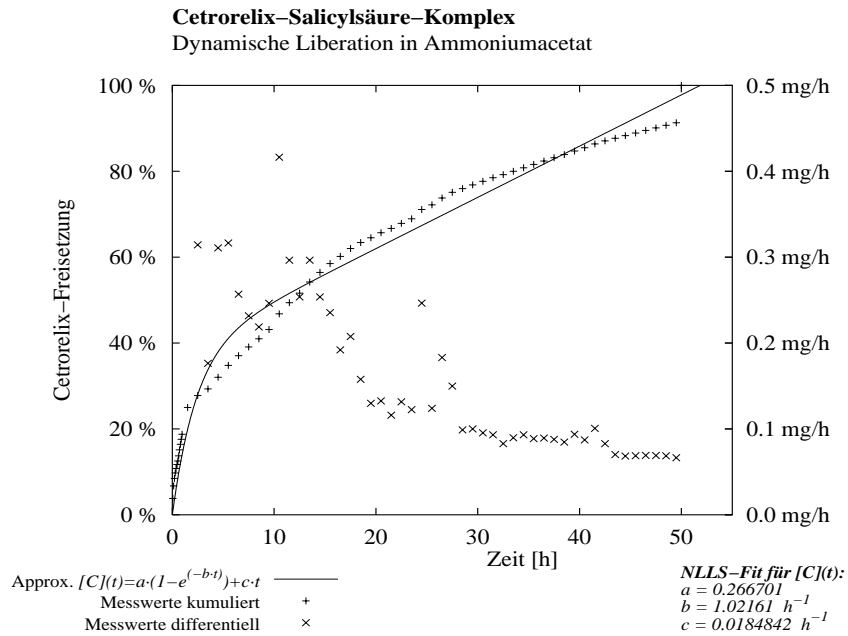


Abbildung 39: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-Salicylsäure-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 39

Cetrorelix-Acetylsalicylsäure-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1,5

Habitus: weiß, leichte, sich elektrostatisch aufladende Substanz

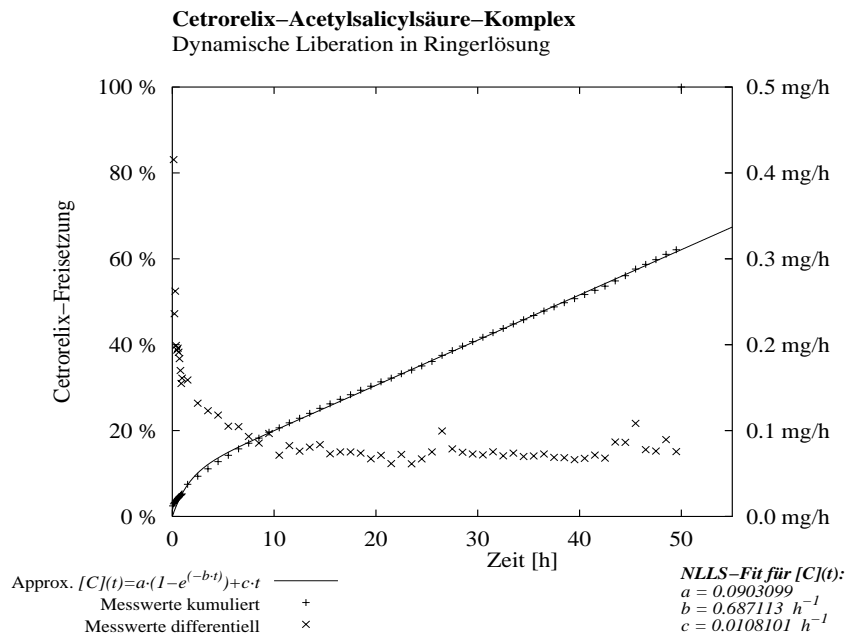
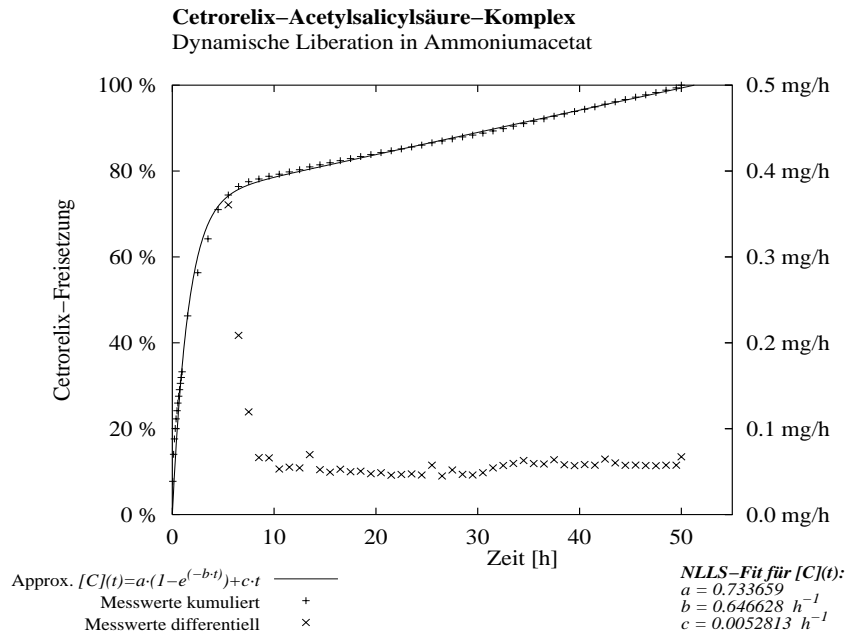


Abbildung 40: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-Acetylsalicylsäure-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 40

Cetrorelix-β-Hydroxynaphthoesäure-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1,5

Habitus: weiß, locker, faserig, gewebeartig

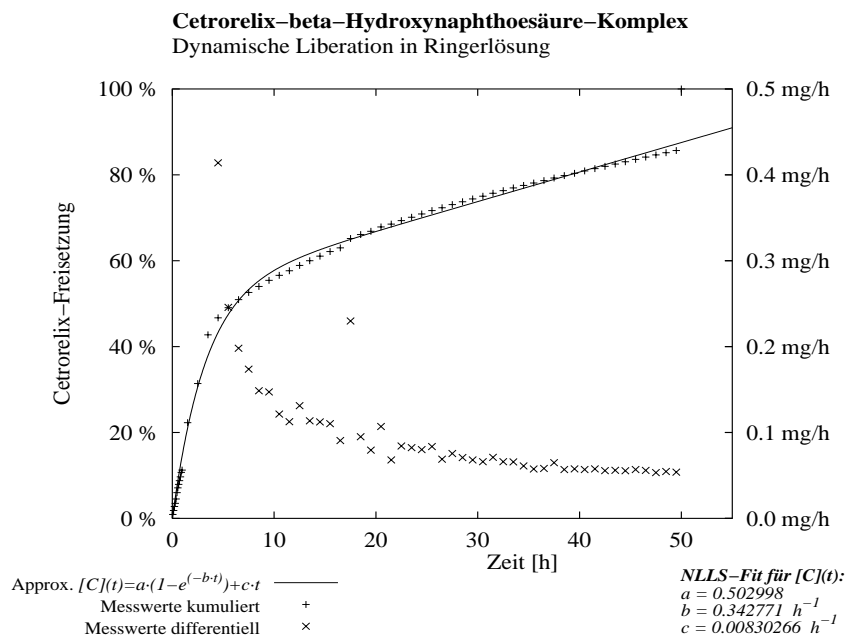
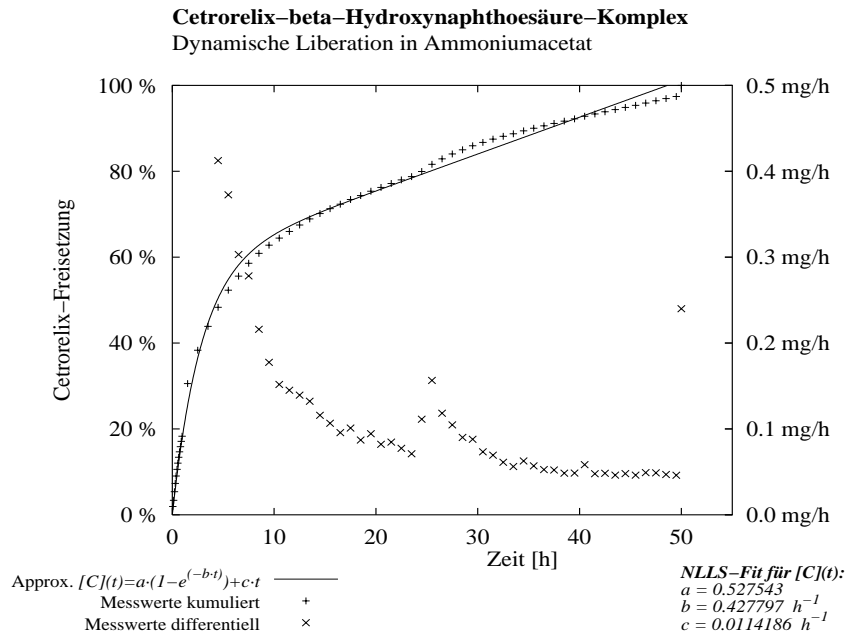


Abbildung 41: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-β-Hydroxynaphthoesäure-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 41

Cetrorelix-β-Acetoxy-naphthoesäure-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1,5

Habitus: weiß, locker

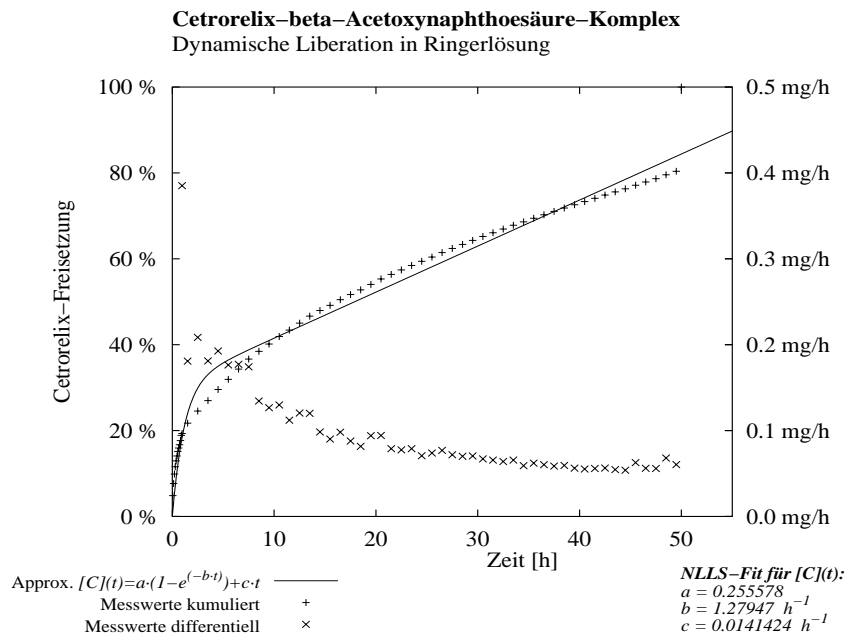
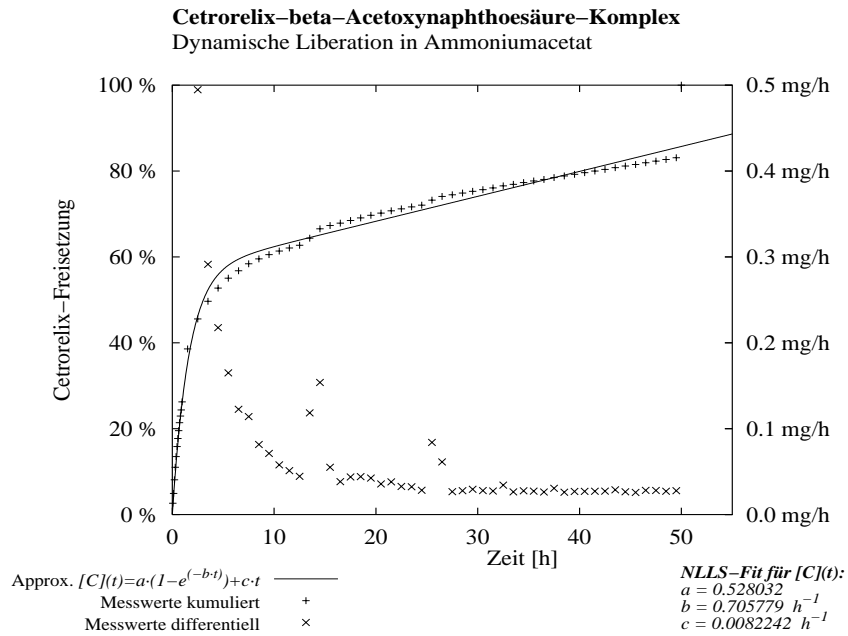


Abbildung 42: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-β-Acetoxy-naphthoesäure-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 42

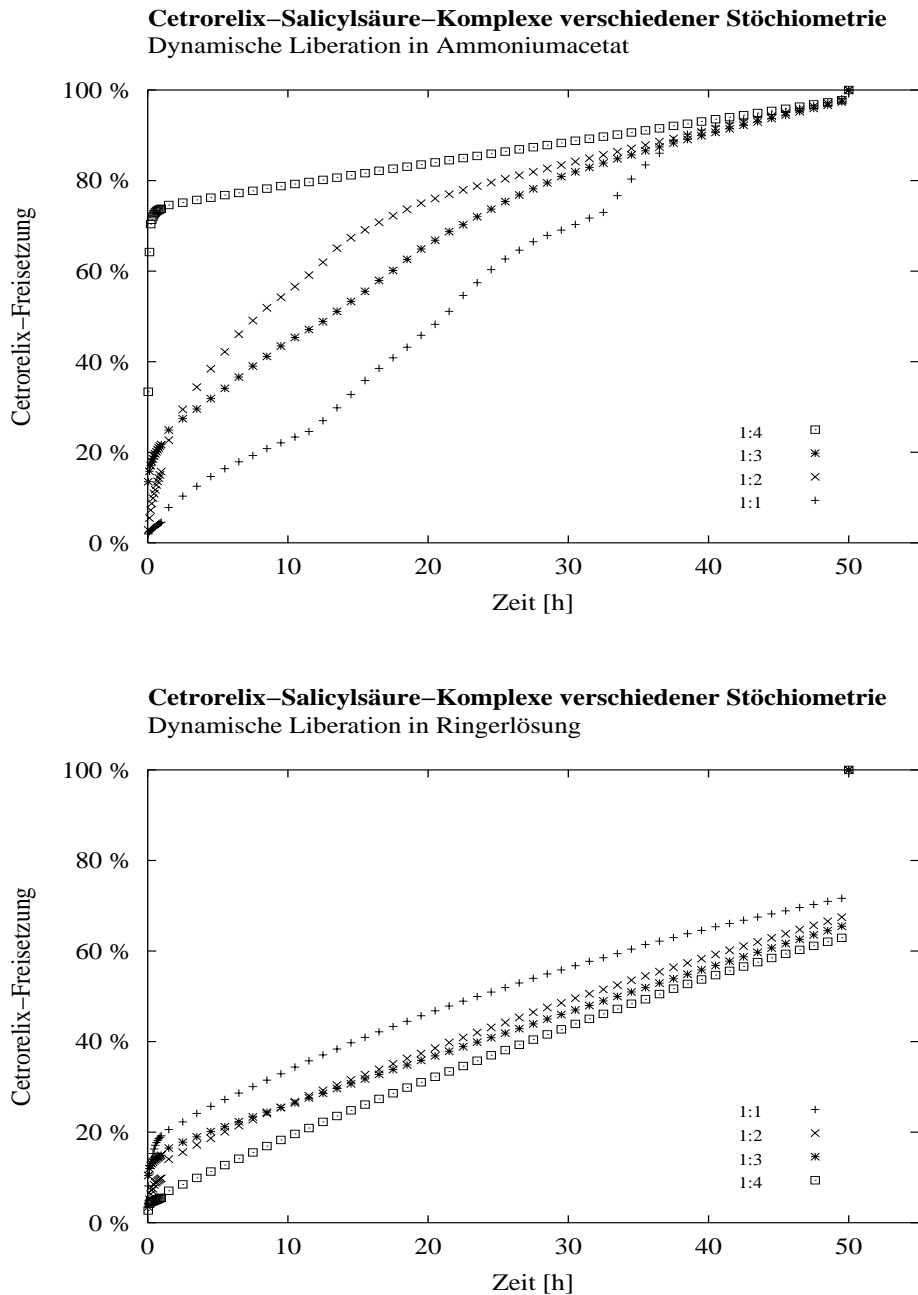


Abbildung 43: Freisetzungskinetik von Cetorelix-Salicylsäurekomplexen verschiedener Stöchiometrie

Für den Komplex mit Salicylsäure wurden wegen der außergewöhnlich linearen Freisetzungprofile zusätzliche Stöchiometrieuntersuchungen durchgeführt. Dafür wurde der Komplex in den vier Zusammensetzungen 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 (jeweils molare Verhältnisse Cetorelix:Salicylsäure) synthetisiert und durch dynamische Liberation in Ammoniumacetatlösung und Ringerlösung deren Freisetzungseigenschaften charakterisiert (Ergebnisse in Abb. 43 und Tab. 20).

Tabelle 20: Freisetzungparameter der dynamische Liberationen von Cetrorelix-Salicylsäurekomplexen verschiedener Stöchiometrie in Ammoniumacetat und Ringerlösung

Medium Parameter	Ammoniumacetat			Ringerlösung		
	<i>a</i>	<i>b</i> [h ⁻¹]	<i>c</i> [h ⁻¹]	<i>a</i>	<i>b</i> [h ⁻¹]	<i>c</i> [h ⁻¹]
Stöchiometrie 1:1	-0,045	0,025	0,025	0,21	2,58	0,013
Stöchiometrie 1:2	0,43	0,36	0,015	0,14	1,29	0,012
Stöchiometrie 1:3	0,23	2,45	0,021	0,15	3,16	0,010
Stöchiometrie 1:4	0,74	7,08	0,005	0,060	1,69	0,013
Vergleich: Cetrorelix-Acetat	0,97	5,20		0,22	1,85	0,004

4.4.5 Herstellung und Charakterisierung der Komplexe von Cetrorelix mit Dipeptiden

Zur Charakterisierung der Cetrorelixkomplexe mit Dipeptiden als neuartige Komplexpartnern (Abb. 16) wurden je ca. 30 mg der Komplexe hergestellt (siehe S. 63) und deren Freisetzungseigenschaften durch dynamische Liberation in Ammoniumacetatlösung sowie Ringerlösung bestimmt. Bei der Herstellung der Komplexe waren, wie bereits bei den Komplexen mit aromatischen Hydroxycarbonsäuren, sehr unterschiedliche makroskopische Eigenschaften feststellbar.

Tabelle 21: Freisetzungparameter der dynamische Liberationen von Cetrorelix-Dipeptidkomplexen in Ammoniumacetat und Ringerlösung

Medium Parameter	Ammoniumacetat			Ringerlösung		
	<i>a</i>	<i>b</i> [h ⁻¹]	<i>c</i> [h ⁻¹]	<i>a</i>	<i>b</i> [h ⁻¹]	<i>c</i> [h ⁻¹]
Cetrorelix-Asp-Tyr-Komplex	0,55	1,05	0,009	0,11	0,20	0,018
Cetrorelix-Asp-Phe-OMe-Komplex	0,25	0,83	0,014	0,04	0,15	0,003
Cetrorelix-Asp-Gly-Komplex	0,65	2,04	0,009	0,11	0,14	0,018
Cetrorelix-Arg-Glu-Komplex	0,87	0,21	0,001	0,02	0,18	0,004
Cetrorelix-Glu-Ala-Komplex	0,58	0,84	0,006	0,05	0,25	0,006
Cetrorelix-Asp-Val-Komplex	0,67	1,16	0,007	0,05	0,14	0,006
Cetrorelix-Glu-Tyr-Komplex	0,59	6,41	0,008	0,025	0,20	0,005
Cetrorelix-Glu-Gly-Komplex	0,35	0,58	0,015	0,12	0,11	0,012
Vergleich: Cetrorelix-Acetat	0,97	5,20		0,22	1,85	0,004

Die Charakterisierung der Komplexe mit Dipeptiden wird im folgenden zusammengefasst.

Cetrorelix-(Asp-Tyr)-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1

Habitus: schwer pulverisierbares, sehr leichtes, sich elektrostatisch aufladendes weißes Pulver

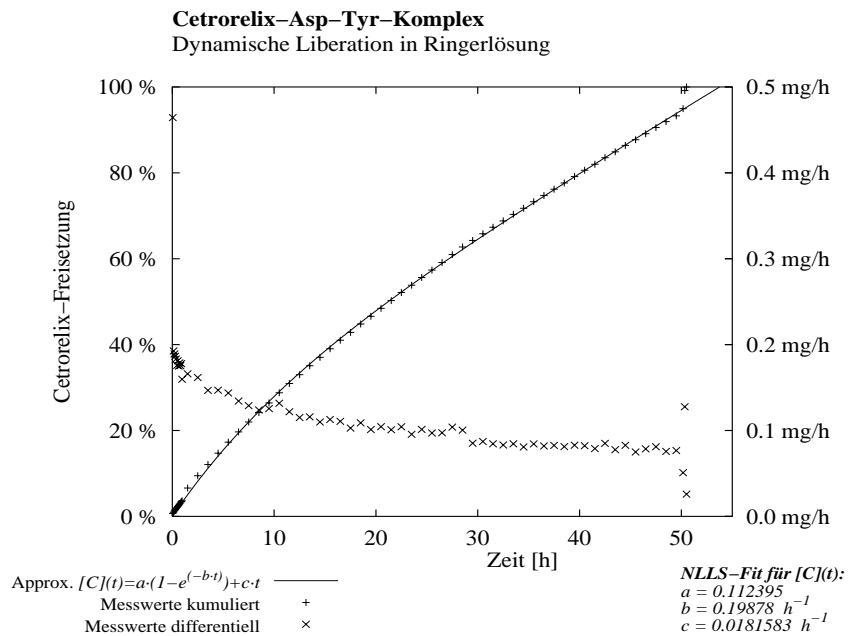
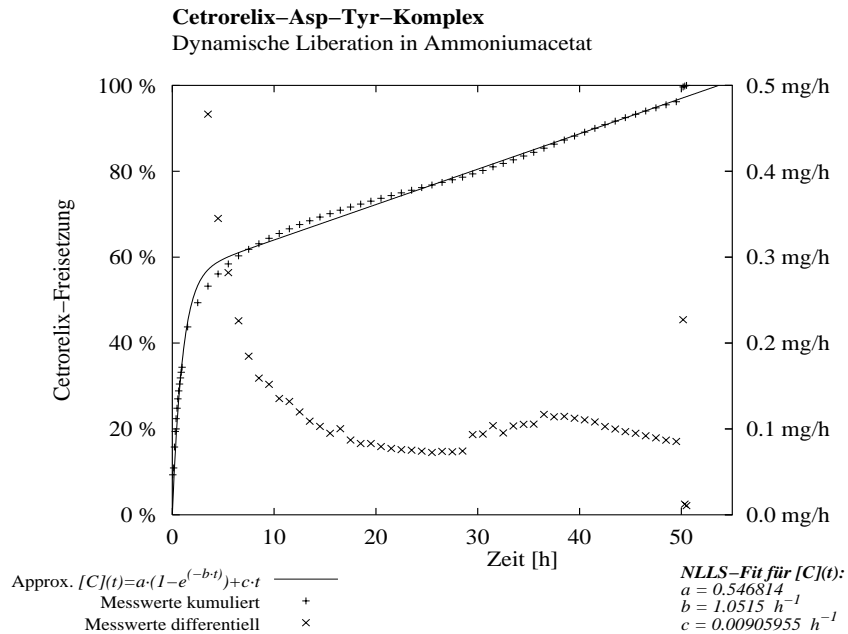


Abbildung 44: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Asp-Tyr)-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 44

Cetrorelix-(Asp-Phe-OMe)-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1

Habitus: weißes, sehr leichtes, mäßig pulverisierbares, sich kaum elektrostatisch aufladendes Pulver

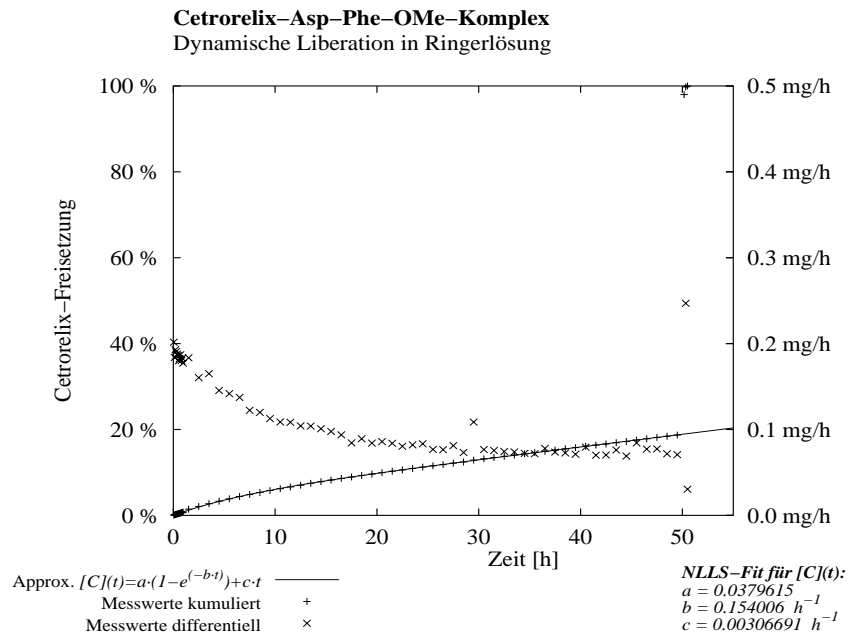
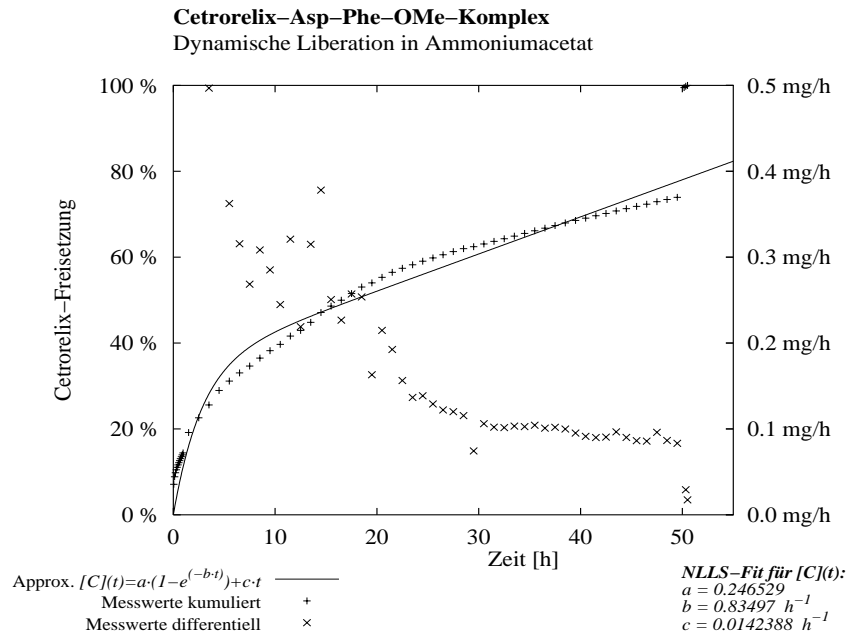


Abbildung 45: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Asp-Phe-OMe)-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 45

Cetrorelix-(Asp-Gly)-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1

Habitus: leichtes, flockiges, weißes Pulver

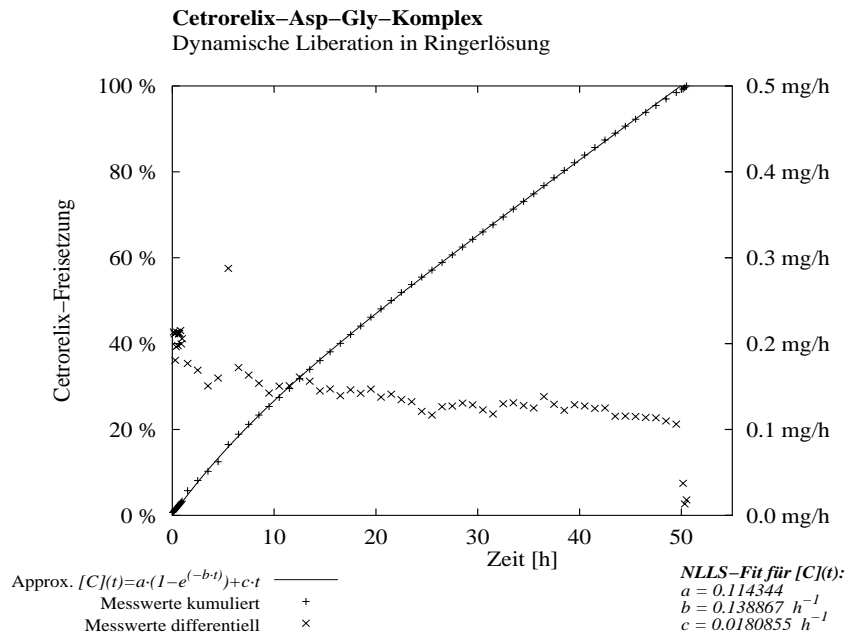
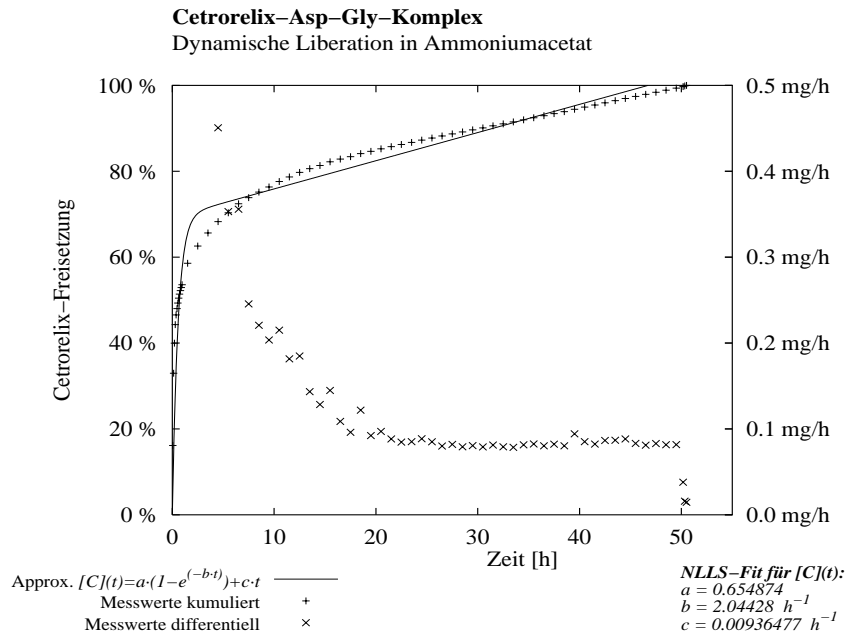


Abbildung 46: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Asp-Gly)-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 46

Cetrorelix-(Arg-Glu)-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1

Habitus: weißes, gut pulverisierbares, größtenteils flockiges, sich kaum elektrostatisch aufladendes Pulver

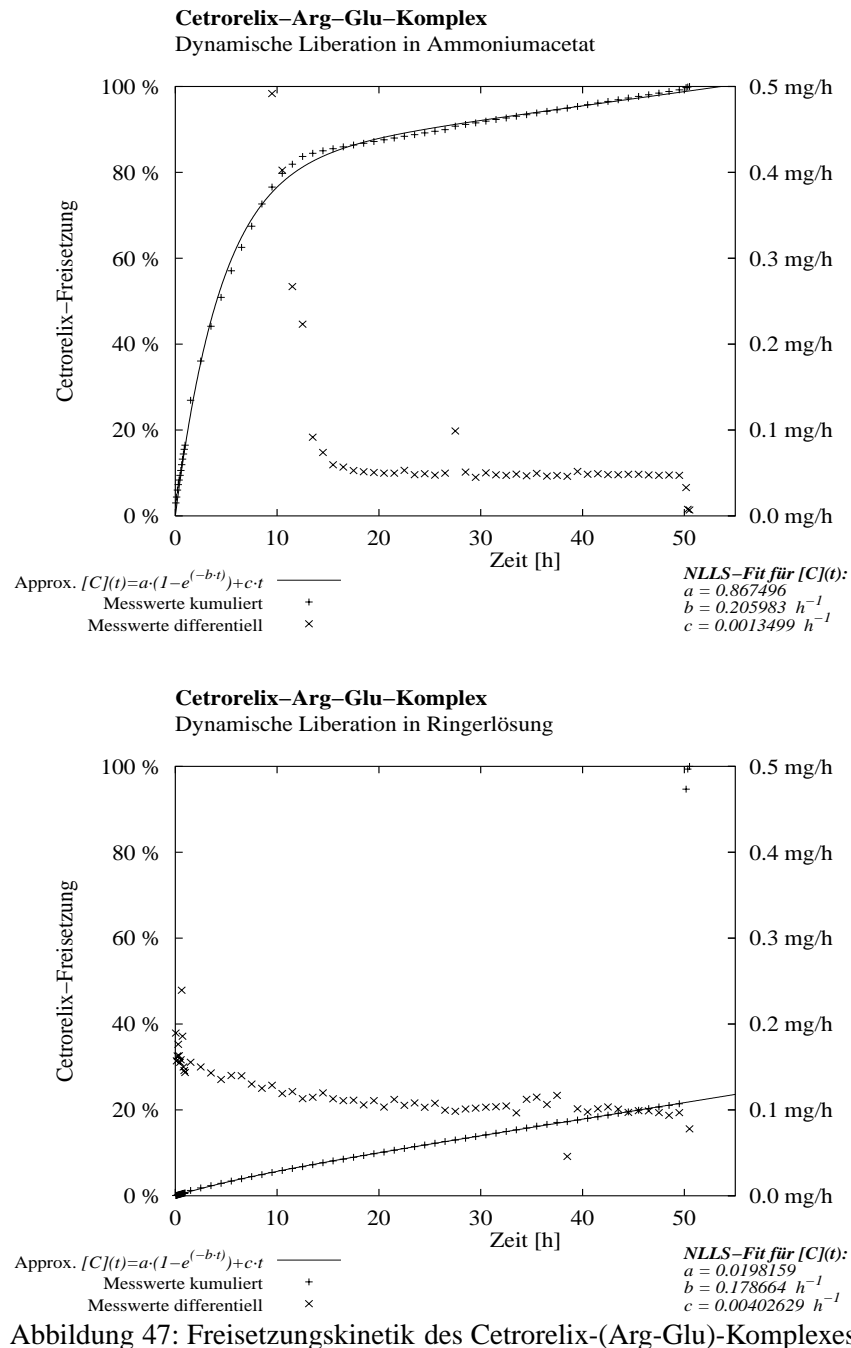


Abbildung 47: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Arg-Glu)-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 47

Cetrorelix-(Glu-Ala)-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1

Habitus: sehr leichtes, flockiges, weißes Pulver

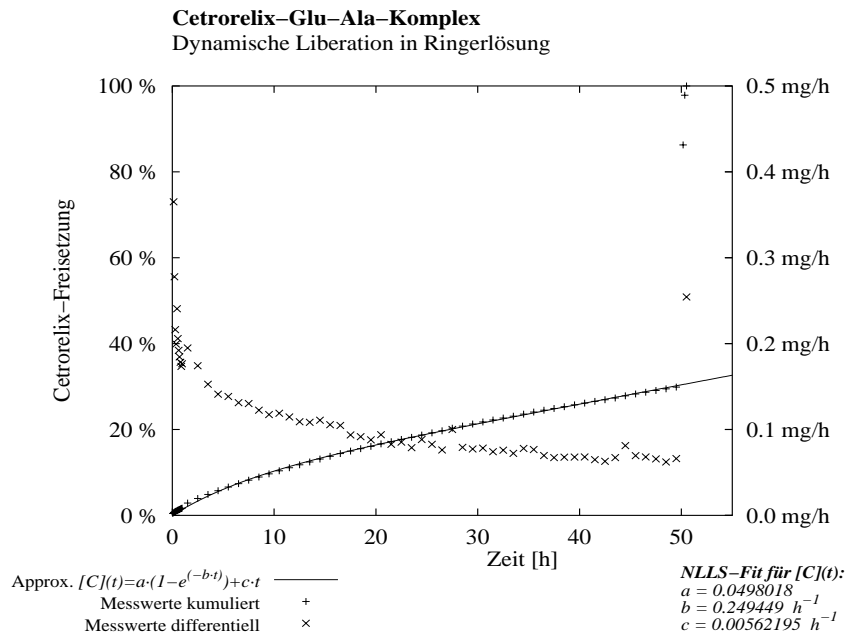
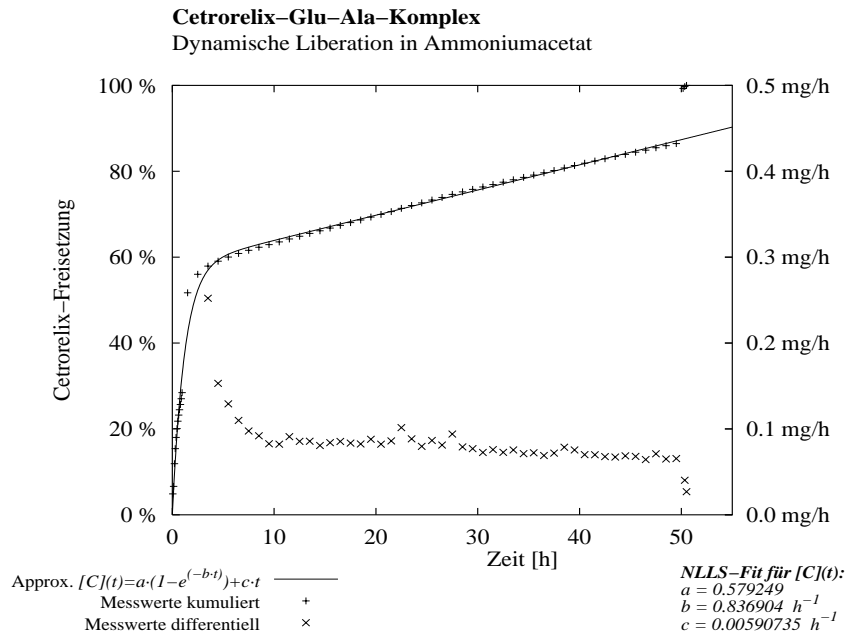


Abbildung 48: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Glu-Ala)-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 48

Cetrorelix-(Asp-Val)-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1

Habitus: weißes, schwer pulverisierbares, sich elektrostatisch aufladendes Pulver

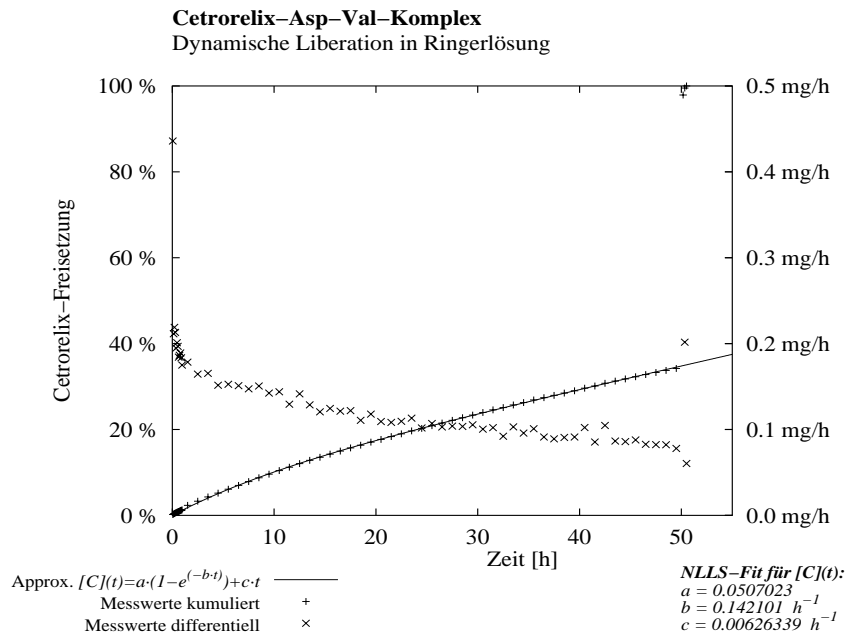
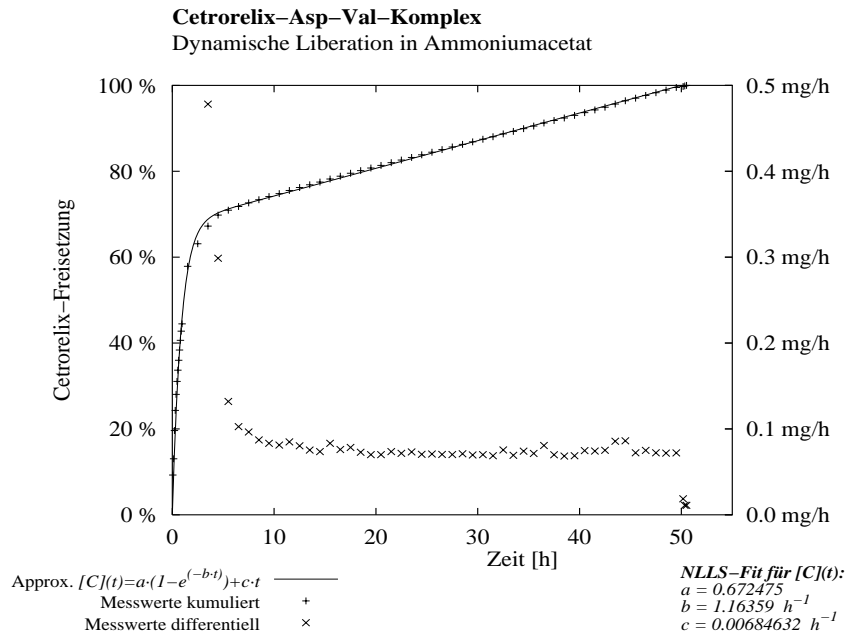


Abbildung 49: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Asp-Val)-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 49

Cetrorelix-(Glu-Tyr)-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1

Habitus: weißes, gut pulverisierbares, flockiges Pulver

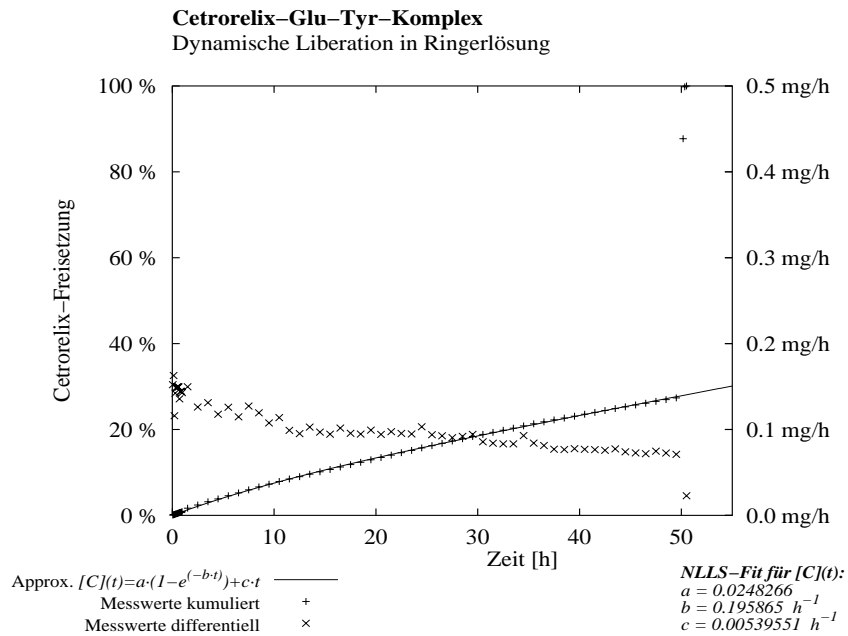
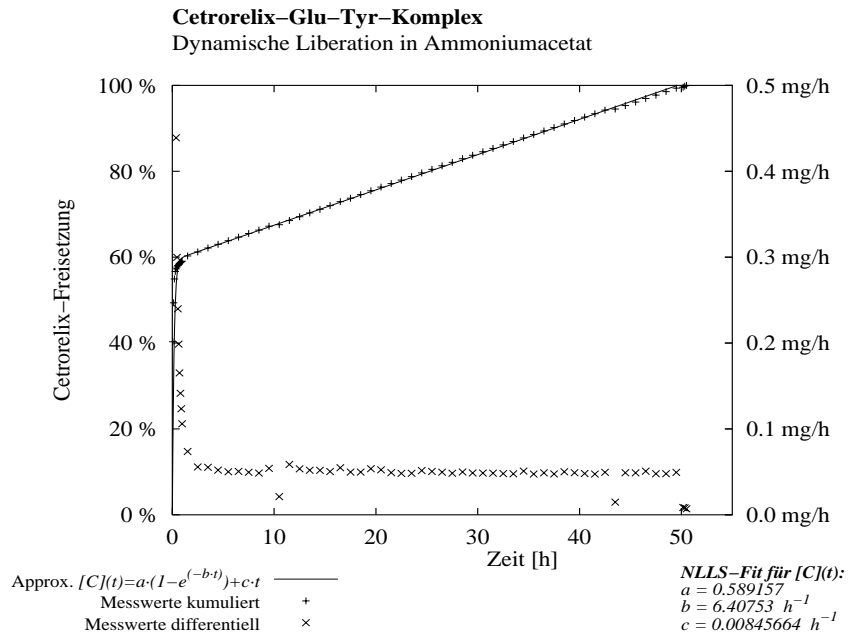


Abbildung 50: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Glu-Tyr)-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 50

Cetrorelix-(Glu-Gly)-Komplex

Molare Zusammensetzung: 1:1

Habitus: weißes, gut pulverisierbares, körniges Pulver

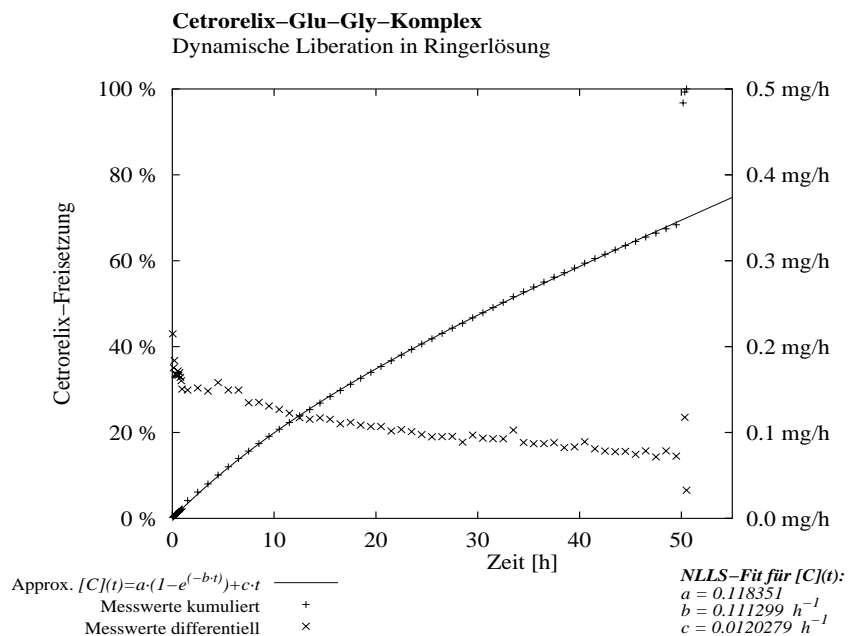
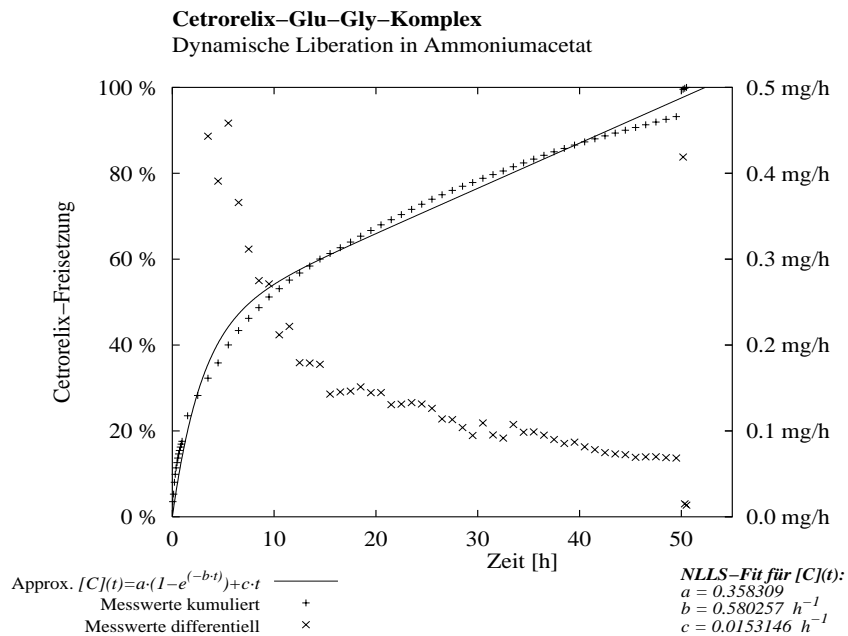


Abbildung 51: Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Glu-Gly)-Komplexes

Freisetzungsprofil der dynamischen Liberation: Abb. 51

5 Diskussion

5.1 Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Cetrorelix

5.1.1 FTIR-Spektroskopische Untersuchungen der Sekundärstruktur von Cetrorelix

Der Vergleich der für die Interpretation der FTIR-Spektren besonders wichtigen Amid I-Banden zwischen den beiden Spektren des rein vorliegenden Cetrorelix (Abb. 20) mit dem Spektrum des in KBr vermischten Peptides (Abb. 17) zeigt, dass in reinem Cetrorelix weit weniger ungeordnete oder helikale Konformationsanteile existieren als in der Probe mit KBr. Vielmehr wird das FTIR-Spektrum von einer Amid I-Bande dominiert, die eindeutig β -Faltblatt-Konformationen zuzuordnen ist. Dies ist als Ausdruck intensiver intermolekularer Wechselwirkungen zu interpretieren, die in Verdünnung mit einem inerten und wasserentziehenden Medium wie KBr weit weniger intensiv wirken können. Die Veränderungen im FTIR-Spektrum von Proteinen durch Wasserentzug wurden durch HADDEN et al. [Hadden et al. 1995] eingehend untersucht. Danach verändert sich mit sinkendem Wasseranteil in Proteinkristallen die Lage der Amid I-Bande in den FTIR-Spektren dieser Präparate.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich die Modellvorstellung ableiten, wonach Cetrorelix als Einzelmolekül keine einheitliche Sekundärstruktur aufweist, in konzentrierter fester oder gelöster Form jedoch durch intermolekulare Stabilisierung zu einem wesentlichen Anteil β -Faltblatt-Konformation besitzt. Um einen reproduzierbaren und den nativen Bedingungen entsprechenden Wasseranteil der Proben zu gewährleisten, wurde für die nachfolgenden Untersuchungen auf die Einbettung der Proben in KBr verzichtet.

5.1.2 MC-Simulation der Sekundärstruktur von Cetrorelix

Die Analyse der einzelnen Kraftfeldenergie-Komponenten in Tab. 10 zeigt deutlich, dass variierende van der Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen gleichermaßen zu den verschiedenen Konformationsenergien beitragen. Der erhebliche Beitrag der Elektrostatik verdeutlicht eindrucksvoll die Bedeutung und Notwendigkeit der Ladungsberechnung mit QEQ für jede einzelne Konformation.

Ein Vergleich der Torsionswinkel im Rückgrat von Cetrorelix und Polyalanin mit Hilfe der Ramachandran-Auftragung in Abb. 52 zeigt ein überraschendes Resultat. Trotz der deutlich großräumigeren Seitenketten des Cetrorelix weist das Peptid-Rückgrat energetisch minimaler Konformere eine signifikant höhere Beweglichkeit auf als das des Polyalanins. Diese verminderte räumliche Orientierung kann durch die sehr zahlreichen Möglichkeiten für gerichtete intramolekulare Stabilisierungen zwischen den teils polaren Seitenketten sowie durch die ungerichteten van der Waals-Stabilisierungen zwischen unpolaren Seitenketten von Cetrorelix erklärt werden.

Wie Abb. 23 verdeutlicht, erstrecken sich die Konformationsenergien der Cetrorelix-Konformere auf einen Bereich von 5150-5360 kJ/mol. Dabei sind bevorzugt geknäuelte Konformationen mit Gyrationradien unter 0,85 nm zu beobachten, was auf die Krümmung des Peptid-Rückgrates bei intramolekularer Stabilisierung zurückzuführen ist. Ein ausgeprägtes Minimum der Konformationsenergie bei einem bestimmten Gyrationradius existiert jedoch nicht (Abb. 23 rechts).

Abschließend wurde im Konformationsset von Cetrorelix die Variation der Partiaalladungen untersucht. Durch die individuelle Ladungsberechnung für jedes einzelne Konformer können sich diese partiellen Ladungen je nach chemischer Umgebung stark unterscheiden. Zur Visualisierung dieser

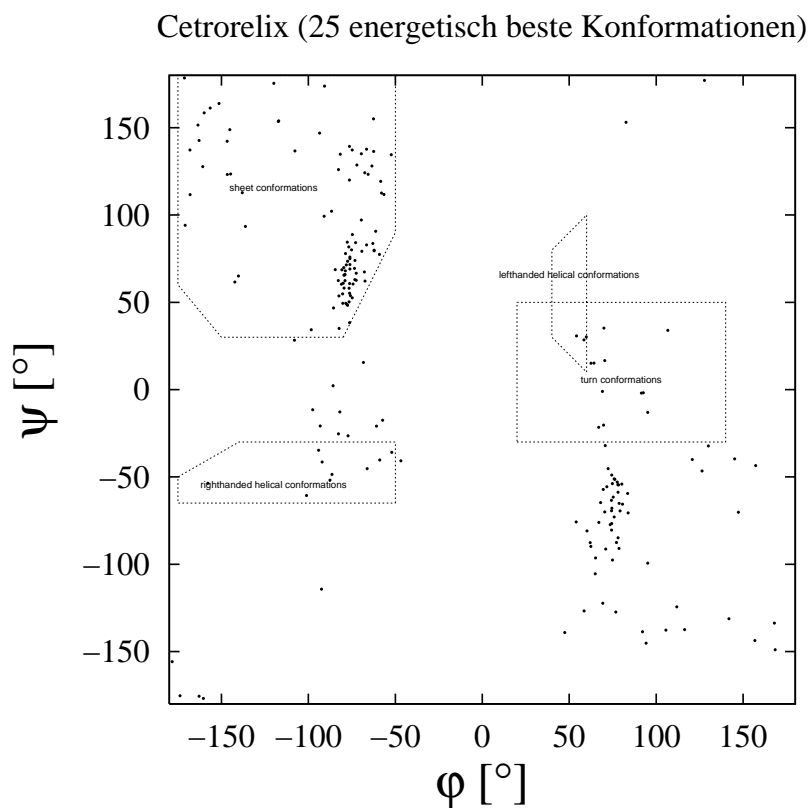
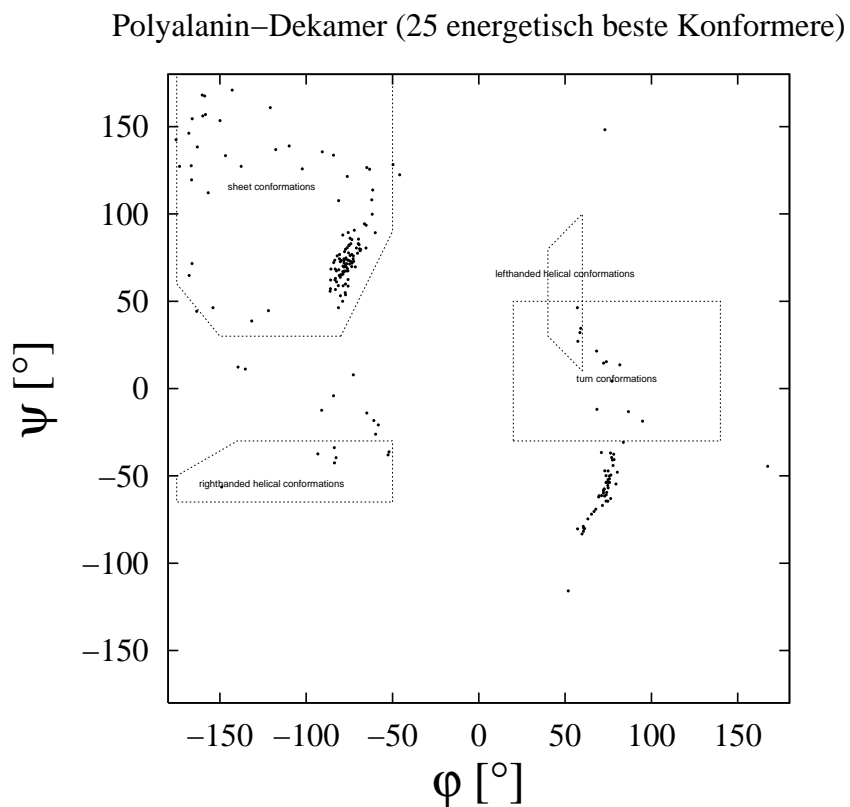


Abbildung 52: Ramachandran-Auftragung der Torsionswinkel ϕ/ψ [Rattei 1995] im Peptidrückgrat der 25 energetisch minimalen Konformere aus Random-Sampling und MM3-Minimierung von Polyalanin (links) und Cetorelix (rechts)

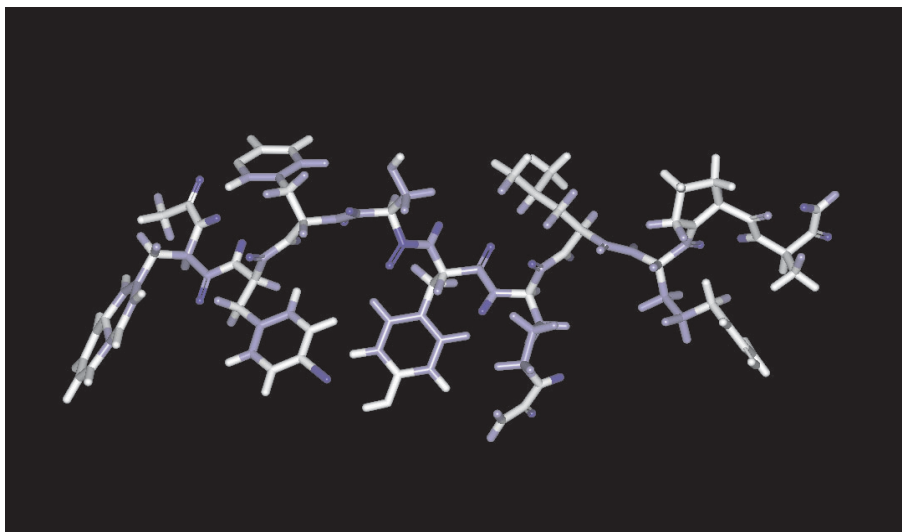


Abbildung 53: Grad der Variation der Partiaalladungen in den Cetrorelix-Konformeren aus Random-Sampling und MM3-Minimierung, dargestellt als Färbungsintensität der Atome

Tatsache wurde die Standardabweichung der Ladungen über alle 9167 Konformere aus Random-Sampling und MM3-Minimierung berechnet und mit Hilfe eines Molekülmodells visualisiert (Abb. 53). Dabei steigt die Intensität der Färbung eines Atoms mit der Standardabweichung seiner Partiaalladungen an. Die stärkste Variation der Ladungen ist erwartungsgemäß im Bereich des Peptidrückgrates und der polaren Seitenketten festzustellen, ausgelöst durch die Ausbildung der intramolekularen Wasserstoffbrücken.

Die Auswertung der expliziten Solvation zweier Cetrorelixkonformere mit Wasser zeigt eine signifikant höhere intermolekulare Stabilisierung für das gestreckte Konformer (Abb. 25). Dies ist aufgrund der zunehmenden Molekülfläche des Konformers sowie der verbesserten Zugänglichkeit der polaren Peptidbereiche bei einer Entfaltung zu erwarten und wurde auch bei der Solvation von Polymeren in anderen Lösungsmitteln, wie Dimethylformamid und Tetrahydrofuran, beobachtet [Drache et al. 1999]. Somit lassen sich aufgrund dieser Modellrechnungen für in Wasser gelöstes Cetrorelix vorherrschend gestreckte Konformere erwarten.

Eine Gegenüberstellung der mit GB/SA ermittelten absoluten freien Hydratationsenthalpien in Abb. 26 mit der expliziten Solvation in der Solventshell (Abb. 25) zeigt erwartungsgemäß, dass die absoluten freien Hydratationsenthalpie mit steigendem Gyrationradius der Konformere zunimmt.

5.1.2.1 Fazit

Die spektroskopischen Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Cetrorelix haben das bisherige Wissen aus NMR-Untersuchungen und Modellrechnungen bestätigen und erweitern können. Danach weist dieses Peptidmolekül keine vorherrschende und bevorzugte Sekundärstruktur auf, sondern kann eine Vielzahl meist ungeordneter Raumstrukturen einnehmen. Die FTIR-Spektren des reinen Feststoffs und auch der wässrigen Lösung zeigten jedoch eine bislang unbekannte Orientierung der Peptidmoleküle zu β -Faltblatt-reichen Strukturen. Dieses Verhalten ist als Aggregation der Moleküle zu größeren Einheiten zu interpretieren und eingehend zu untersuchen.

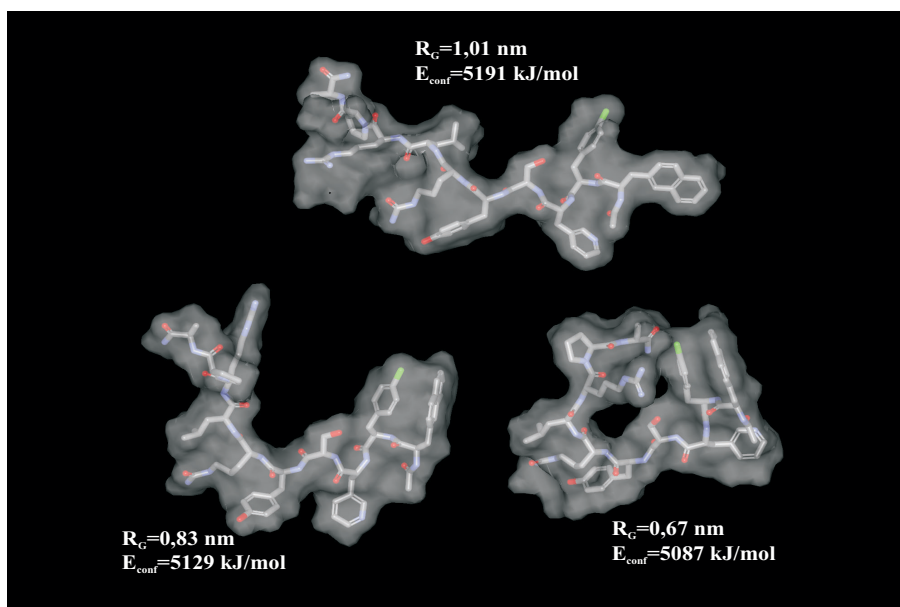


Abbildung 54: Darstellung ausgewählter Raumstrukturen von Cetrorelix mit verschiedenen Gyrationradien, entnommen aus dem Cetrorelix-Konformationsset

Durch Modellrechnungen konnte die Ursache für das Fehlen einer Vorzugskonformation in der Koexistenz vielfältiger intramolekular stabilisierter und energetisch äquivalenter Raumstrukturen mit stark variierenden Gyrationradien (Abb. 54) gefunden werden. Bei der Solvatation von Cetrorelix-Konformeren mit Wasser konnte eine mit steigendem Gyrationradius des Konformers eine zunehmende Stabilisierung durch das Solvens beobachtet werden. Der dabei stattfindende Ersatz polarer intramolekularer Wechselwirkungen durch intermolekulare wirkt dem Trend zu stark gefalteten Konformationen im Vakuum entgegen. Wie die Analyse der Ladungsvarianz in den verschiedenen Cetrorelix-Konformeren zeigte, stehen neben den polaren Seitenketten vor allem die polaren Bereiche des Peptidrückgrates für derartige Wechselwirkungen zur Verfügung.

5.2 Aggregation von Cetrorelix

5.2.1 FTIR-Spektroskopische Untersuchungen von Cetrorelix-Aggregaten

Die Betrachtung der Intensitäten der beiden Einzelbanden im Amid I-Bereich der FTI-Spektren zeigte in beiden Mess-Serien deutlich, dass im zeitlichen Verlauf die Bande zwischen $1640\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$, in den Abbildungen 27 und 28 gekennzeichnet durch einen grauen Bereich im Spektrum, erheblich an Intensität verliert. Die Bande bei $1620\text{-}1630 \text{ cm}^{-1}$ bleibt in dieser Zeit hingegen fast unverändert. Dies ist als Zunahme geordneter, β -faltblattartiger Strukturen bei der Aggregation von Cetrorelix zu interpretieren. Als Ursache dafür sind intermolekulare Stabilisierungen mit Wasser und anderen Cetrorelixmolekülen anzusehen, die in bestimmten Cetrorelixkonformationen bevorzugt auftreten können.

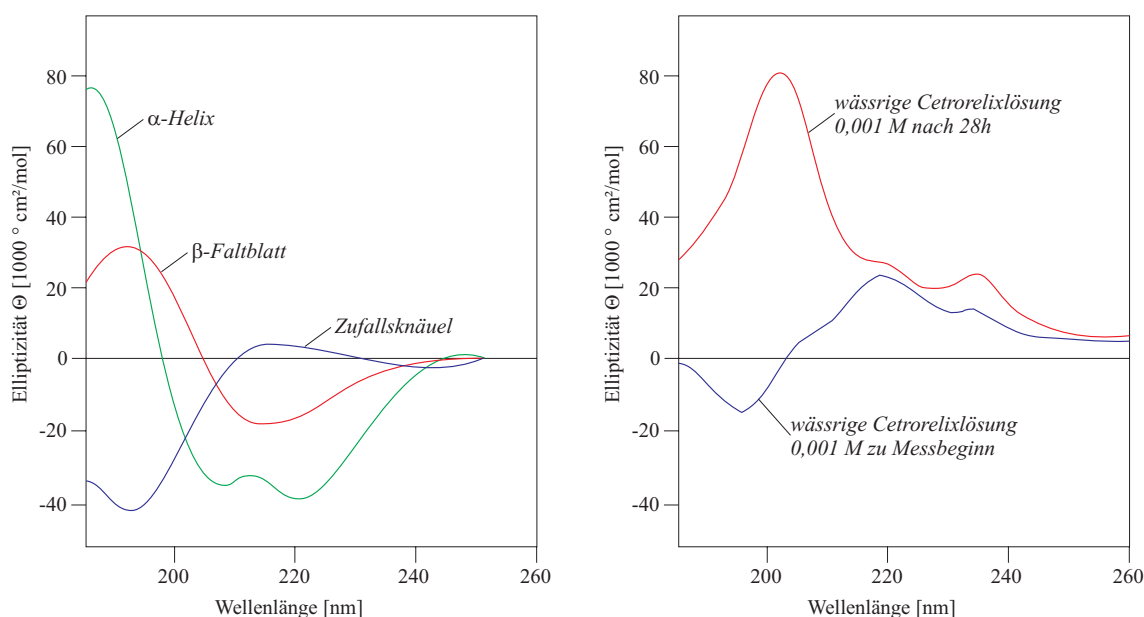


Abbildung 55: Links: Charakteristische CD-Kurvenverläufe von Proteinen mit verschiedenen Sekundärstrukturen [Woody 1996, Yang et al. 1986], rechts: CD-Spektren von Cetorelix in 10⁻³ M, wässriger Lösung zu Messbeginn sowie nach 28 Stunden

5.2.2 CD-Spektroskopische Untersuchungen von Cetorelix-Aggregaten

Für die Absicherung der Ergebnisse aus der Interpretation der FTIR-Spektren und um Einflüsse der HATR-Kristalle auf die Aggregation von Cetorelix auszuschließen, wurden durch MURGAS ausgewählte Vergleichsmessungen mit der CD-Spektroskopie durchgeführt (Abb. 55 rechts) [Murgas 1998]. Beim Vergleich der Kurvenverläufe der frischen, 10⁻³ M, wässrigen Lösung sowie der gleichen Lösung nach 28 Stunden mit den Referenzspektren der verschiedenen Sekundärstrukturtypen zeigt sich deutlich die Zunahme geordneter, β-faltblattartiger Strukturen nach 28 Stunden gegenüber vollständig ungeordneten Strukturen der frischen Lösung. Der Befund der FTIR-Spektroskopie konnte damit klar bestätigt werden.

5.2.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von Cetorelix-Aggregaten

Die Charakterisierung der Aggregationsprozesse durch die Untersuchung der Sekundärstrukturanteile im Cetorelix liefert erste, qualitative Einblicke in Ablauf und Ursachen dieses Vorgangs. Für die Quantifizierung des Aggregationsgrades sowie die Betrachtung verschiedener Einflussfaktoren, wie Zeit, Temperatur, Eigenkonzentration, Art und Konzentration von Fremdionen, eigneten sich jedoch weder FTIR- noch CD-Spektroskopie, da mit diesen Methoden nur bis zu 10⁻⁴ M Cetorelixlösungen untersucht werden konnten. FTIR-Untersuchungen an 10⁻⁵ M, wässrigen Lösungen lieferten trotz aufwändiger Präparation der Proben keine auswertbaren Spektren mehr. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Analysen des Aggregationsverhaltens von Cetorelix in unserer Arbeitsgruppe durch LANG [Lang 1998] die Fluoreszenzspektroskopie erschlossen.

Als Voruntersuchung wurde das rechnerisch durch Konformationssuche gewonnene Set von Cetorelixkonformeren auf die Polarität der Umgebung dieser Seitenkette untersucht, da deren Erhöhung

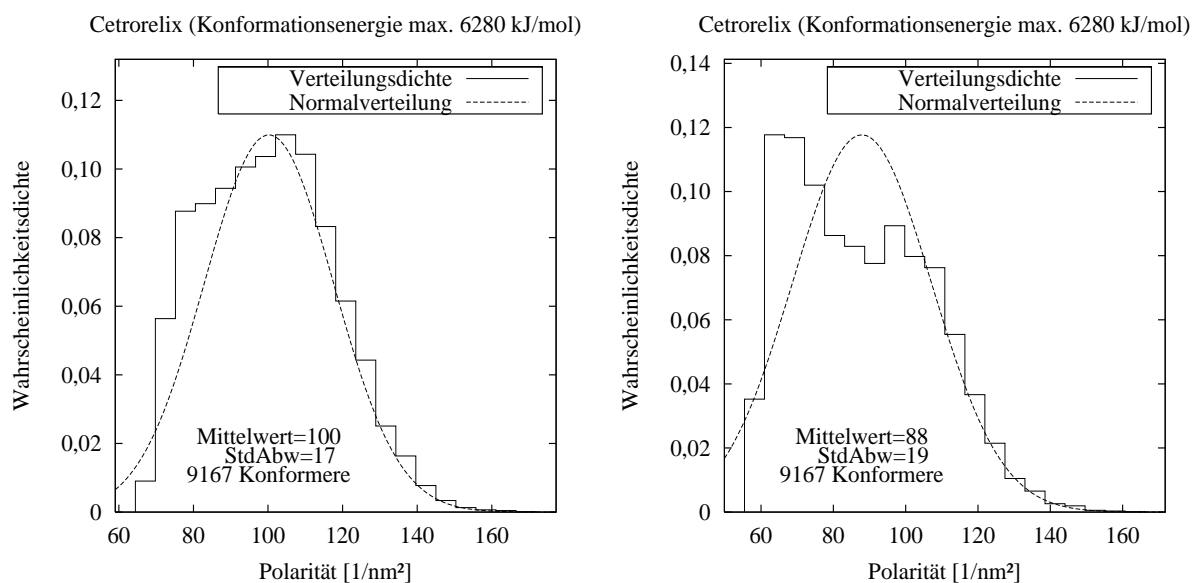


Abbildung 56: Durch Modellrechnungen ermittelte Polarität der Umgebung der Ringzentren 1, 2, 3, 4, 4a, 8a (links) und 5, 6, 7, 8, 8a, 4a (rechts) der Naphthylalanyl-Seitenkette in den verschiedenen Cetorelix-Konformationen

ein quenching der intrinsischen Fluoreszenz von Chromophoren bewirkt [Jayakumar et al. 1997]. Die Umgebungspolarität P wurde für zwei Bezugspunkte in den Zentren der beiden kondensierten Ringsysteme des Naphthylalanins als Summe der Coulomb-Wechselwirkungen gegenüber einer fiktiven Ladung von ± 1 berechnet:

$$P = \sum_{i=1}^{i=n} \frac{|q_i|}{r_i^2}$$

Dabei sind q_i die Partiaalladungen des Atoms i , r_i der Abstand des Atoms i zum Bezugspunkt sowie n die Gesamtanzahl der Atome im Molekül. Wie Abbildung 56 zu entnehmen ist, variiert die Polarität der Umgebung beider Ringzentren je nach Konformation zwischen ca. 60 nm^{-2} und 160 nm^{-2} , wodurch sich Strukturwechsel des Peptidmoleküls durch eindeutige spektrale Veränderungen nachweisen lassen sollten.

In den Untersuchungen von LANG [Lang 1998] wurde jedoch neben spektralen Veränderungen in Spektren unterschiedlich konzentrierter Peptidlösungen vor allem ein zeitabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität bei konstanter Peptidkonzentration gefunden, der aussagekräftige Hinweise auf die Aggregation von Cetorelix lieferte (Abb. 57). Dieser Befund wurde als zunehmender Austausch der polaren Umgebung des Peptidmoleküls (solvatisierter Zustand) gegen eine apolare (aggregierter Zustand) interpretiert und anhand von Dissoziations- und Denaturierungsversuchen belegt.

Die Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren auf das Aggregationsverhalten von Cetorelix durch LANG [Lang 1998] lieferte wertvolle Informationen zu Charakterisierung und Verständnis dieser Vorgänge (Tab. 22). Neben der Bestätigung und Quantifizierung von Einflüssen durch Zeit, Eigenkonzentration und Fremdionen, die anhand vorangegangener, makroskopischer Beobachtungen bereits zu erwarten waren, stellen die gefundene, wenig signifikante Temperaturabhängigkeit der Aggregationsgeschwindigkeit sowie die Schwellkonzentration von $\alpha_{Cet}=0,01 \text{ mg/ml}$ (entspricht ca. $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$) für Cetorelix völlig neuartige Erkenntnisse dar (Abb. 58). Die Ursachen des geringen Temperatureinflusses auf das Aggregationstempo von Cetorelix sind momentan noch nicht bekannt. Zu vermuten ist

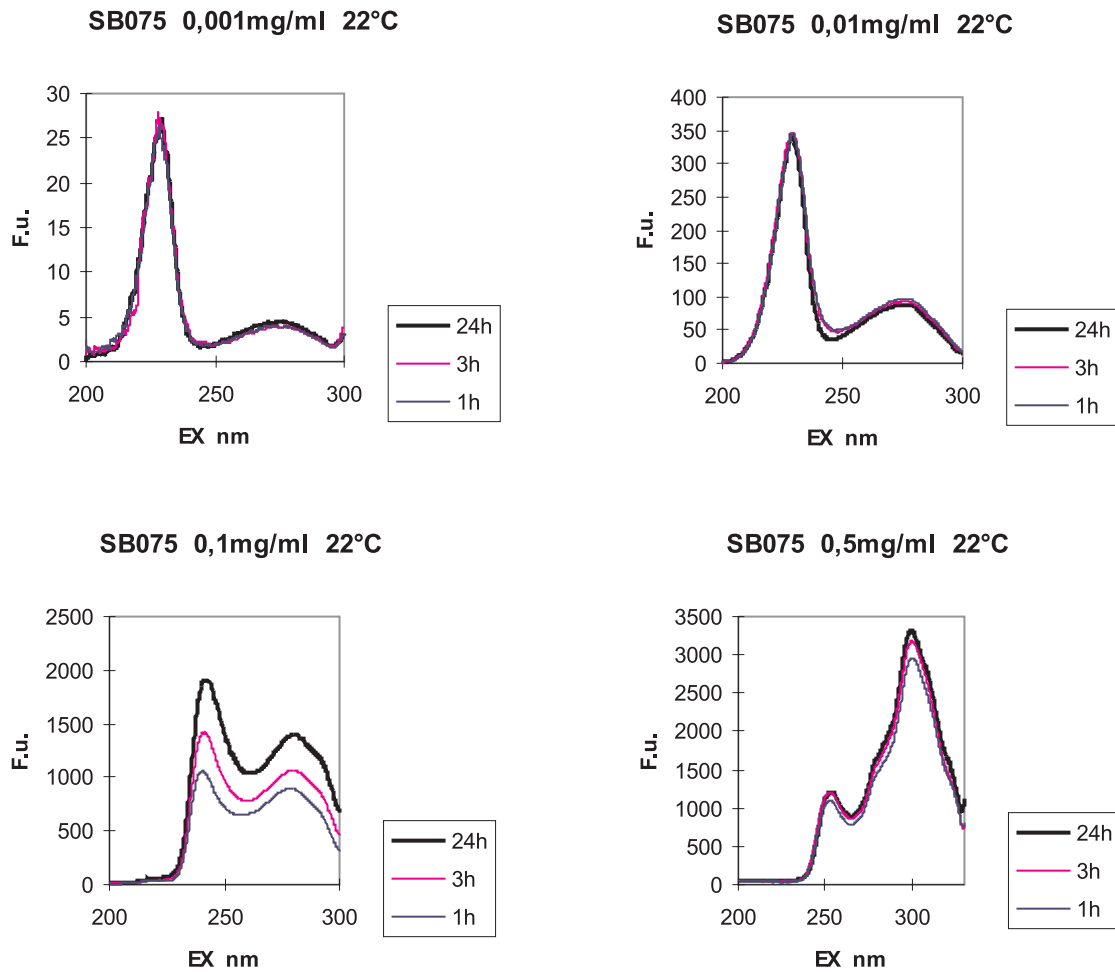
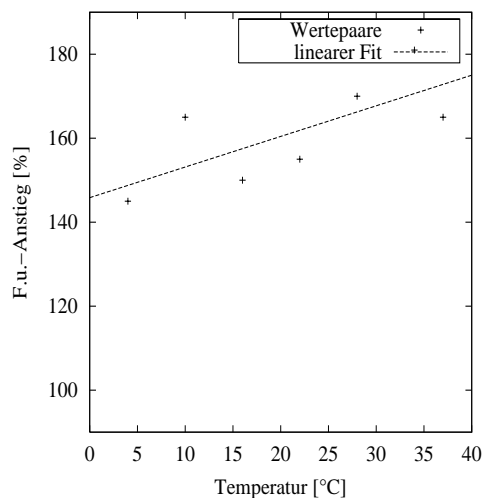


Abbildung 57: Fluoreszenzspektren von Cetorelix (Anregung) bei einer Emissionswellenlänge von 337 nm, 22°C, Lösung in 10mM NH₄Ac (pH=7,0) nach 1, 3, 24 Stunden [Lang 1998]

Tabelle 22: Zusammenstellung von Parametern und ihrem Einfluss auf die Aggregation von Cetorelix [Lang 1998]

Parameter	Einfluss auf die Aggregation von Cetorelix
Zeit	sehr stark
Temperatur	gering
Eigenkonzentration von Cetorelix	sehr stark
Salzart	
Ammoniumacetat	stark
Natriumchlorid	sehr stark
Salzkonzentration	
Ammoniumacetat	stark, maximal bei 10-50 mM
Natriumchlorid	stark, maximal bei 5-10 mM

Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Cetorelix



Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Cetorelix

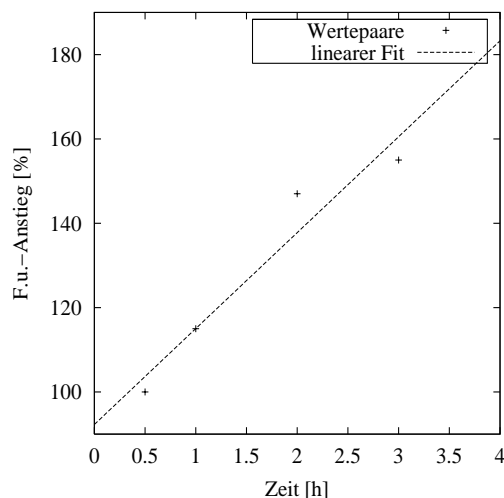


Abbildung 58: Temperaturabhängigkeit (links) und Zeitabhängigkeit (rechts) der Fluoreszenzintensität von Cetorelix bei einer Emissionswellenlänge von 337 nm, Lösung in 10mM NH_4Ac (pH=7,0) [Lang 1998]

ein Zusammenhang dieser Tatsache mit der beobachteten Labilität der gebildeten Aggregate, welche u.a. durch den Zerfall der Aggregate bei chromatografischen Analysen belegt wurde.

5.2.4 Fazit

Betrachtet man die Erkenntnisse aus allen, im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommenen, spektroskopischen Untersuchungen, so stellen sich die Beobachtungen am Cetorelix als typischer Aggregationsvorgang hydrophober Polypeptide dar. Die geringe Aggregationsgeschwindigkeit ist durch das gleichzeitige Vorhandensein hydrophiler und hydrophober Bereiche in der Sequenz des Peptides zu erklären, wodurch sowohl der solvatisierte als auch der aggregierte Zustand nebeneinander vorliegen können. Gestützt wird diese These durch die Beobachtung bei der Durchführung der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen, wonach die im Zeitverlauf gebildeten Aggregate auch bei nachfolgender Verdünnung der Lösung noch nachweisbar blieben [Lang 1998].

Der Einfluss der Elektrolytart und -konzentration auf die Geschwindigkeit ist bei allen ionischen Reaktionen ausgeprägt und als Salzeffekt bekannt. Im vorliegenden Fall destabilisiert die Zugabe von Anionen konzentrationsabhängig den solvatisierten Zustand und begünstigt die Aggregation. Dies ist durch den störenden Einfluss von Fremdionen auf die Solvathülle des gelösten Cetorelix zu erklären, wodurch die Ausbildung des aggregierten Zustandes erleichtert wird. Im Bereich der untersuchten, hohen Elektrolytkonzentrationen ist neben diesem allgemeinen Salzeffekt auch mit spezifischen Wechselwirkungen zwischen Elektrolyt und Polypeptid zu rechnen, was in Form unterschiedlich starker Einflüsse von Ammoniumacetat oder Natriumchlorid auch beobachtet werden konnte.

Eines der interessantesten Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen zur Cetorelixaggregation stellen die beobachteten Sekundärstrukturveränderungen beim Übergang des solvatisierten Peptides in den aggregierten Zustand dar. Derartige Prozesse weisen auf die Ausbildung definierter Bindungsstellen für hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Peptidmolekülen hin. Eine Modellvorstellung zur Ausbildung von Cetorelixaggregaten in β -Faltblatt-

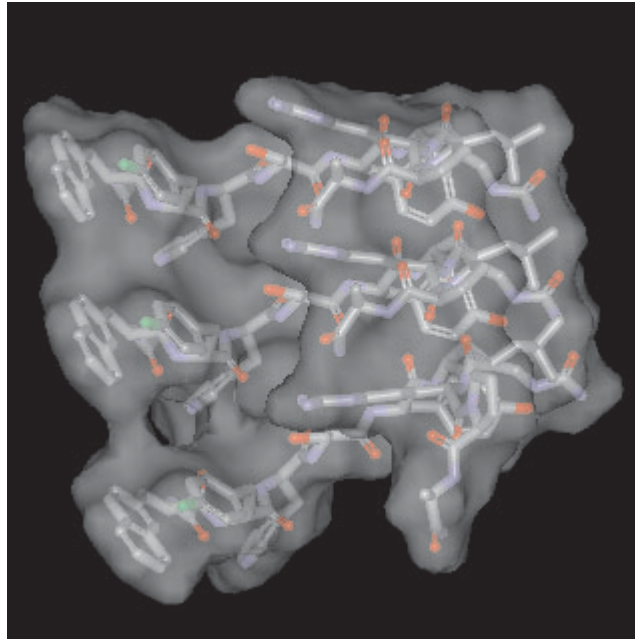


Abbildung 59: Vorschlag einer Modellstruktur eines Cetorelixaggregates in ausgerichteter β -Faltblattkonformation, erstellt mit einem ausgewählten Konformer des Cetorelix-Konformationssets

strukturen zeigt Abbildung 59. Vergleichbare Vorgänge konnten u.a. bei Versuchen zur Faltung von β -Faltblatt-Membranproteinen an Modellsystemen mit hydrophoben Hexapeptiden durch WIMLEY et al. beobachtet werden [Wimley et al. 1998]. In deren Untersuchungen wurden vergleichbare Konformationsveränderungen vom ungeordneten, solvatisierten Zustand der Hexapeptide zu geordneten β -Faltblattstrukturen in den Aggregaten der Peptide in einer Membran nachgewiesen.

Für die Vertiefung des Verständnisses der Cetorelix-Aggregation sowie zur Gewinnung thermodynamischer und kinetischer Daten über diese Vorgänge ist jedoch die Fixierung und direkte Analyse der gebildeten Aggregate erforderlich.

5.3 Charakterisierung von Struktur und Zusammensetzung von Cetorelix-Komplexen

5.3.1 Einfluss der Stöchiometrie von Cetorelix-Komplexen auf deren Liberationseigenschaften

Durch Analyse der Freisetzungsverläufe (Abb. 30) und Vergleich der durch NLLS-Fit ermittelten Parameter (Tab. 11) lassen sich zum Einfluss der Stöchiometrie auf die Freisetzungseigenschaften am Beispiel der Cetorelix-Embonsäure-Komplexe folgende Schlußfolgerungen ableiten:

- Die Freisetzung des Wirkstoffs aus Cetorelix-Komplexen erfolgt in Ammoniumacetat und Ringerlösung deutlich verschieden. Als Ursache für diesen Effekt kommen unterschiedliche Benetzung und unterschiedlich rascher Zerfall der Komplexpartikel sowie das unterschiedliche Aggregationsvermögen des freigesetzten Cetorelix in Ammoniumacetatlösung bzw. Ringerlösung in Betracht.

- Bei Freisetzung des Wirkstoffs in Ammoniumacetatlösung ist bei beiden Stöchiometrien ein erhebliches Retardvermögen der Komplexe zu beobachten. Anhand der Freisetzungparameter lassen sich beide Komplexe dem flächenunabhängigen Freisetzungstyp zuordnen. Eine Zunahme des Komplexpartneranteils führt bei den untersuchten Zusammensetzungen offenbar zu einer Verringerung der Komplexlöslichkeit, da bei der Stöchiometrie von 1:2 der Retardeffekt etwas deutlicher ausgeprägt ist.
- Bei Freisetzung des Wirkstoffs in Ringerlösung zeigt sich gegenüber Ammoniumacetatlösung ein größerer Einfluss der Stöchiometrie auf das Freisetzungsverhalten. Während der 1:2-Komplex wie in Acetatlösung flächenunabhängig freigesetzt wird, kommt beim 1:1-Komplex eine Anfangsfreisetzung von 15% des Wirkstoffs hinzu. Anhand der Freisetzungparameter lässt sich damit der 1:1-Komplex dem kombinierten Freisetzungstyp zuordnen. Entgegen den Erwartungen bewirkt die Ringerlösung bei diesem Komplex trotz des stärkeren Aggregationsvermögens eine beschleunigte Wirkstofffreisetzung.

Anhand der Liberationsuntersuchungen zeigt sich, dass sowohl die Stöchiometrie von Peptid und Komplexpartner als auch das verwendete FreisetzungsmEDIUM auf die Stabilität und damit die Liberation des Komplexes einen erheblichen Einfluss ausüben. Dabei führt ein stärkeres Aggregationsvermögen des Liberationsmediums nicht zwingend zu einer Verzögerung der Wirkstofffreisetzung, sondern kann diese sogar fördern.

Da die Komplexzusammensetzung auf sehr verschiedene Weise den Charakter und das Freisetzungsverhalten der Komplexe verändern kann, ist deren genauere Charakterisierung unerlässlich. Ein Hinweis auf Unterschiede zwischen dem 1:1- und 1:2-Komplex wurde durch deren Herstellung selbst geliefert. Während der 1:1-Komplex nur blassgelb ausfiel, besitzt der 1:2-Komplex wie die Embonsäure eine intensiv gelbe Färbung. Dies lässt den Schluss zu, dass eine obere Grenze für den Anteil an Komplexpartner existiert und oberhalb dieser Grenze der Komplexpartner ungebunden vorliegt. Diese Hypothese konnte nur durch Quantifizierung von gebundenem und ungebundenem Komplexpartner überprüft werden.

5.3.2 FTIR-spektroskopische Untersuchungen zur Stöchiometrie von Cetrorelixkomplexen

Durch FTIR-spektroskopische Analyse zeigte sich bei allen Cetrorelix-Embonsäure-Komplexen von den molaren Zusammensetzungen 2:1 bis 1:2 eine Erhöhung des β -Faltblatt-Anteils von 30% im Cetrorelix-Acetat auf 50% im Komplex mit Embonsäure (Abb. 31). Im gleichen Maße nahmen helikale und ungeordnete Konformationsanteile ab. Dieses Ergebnis deutet auf einen der Aggregation vergleichbaren Mechanismus der Komplexierung hin, da auch in Cetrorelix-Aggregaten ein deutlicher Anstieg des β -Faltblatt-Anteils beobachtet wurde. Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden die Spektren von Cetrorelix-Komplexen mit aliphatischen Monocarbonsäuren ebenfalls anhand der datenbankgestützten Spektrenanalyse untersucht, da für diese Komplexpartner in der Arbeit von MURGAS [Murgas 1998] nach Kettenlänge differenzierte Komplexierungseigenschaften gefunden worden waren. Dabei zeigte sich wiederum ein Anstieg des β -Faltblatt-Anteils auf 37% im Komplex mit Caprinsäure oder bis auf 59% im Komplex mit Stearinsäure (Abb. 32). Der beobachtete Anstieg des β -Faltblatt-Anteils innerhalb der untersuchten Reihe der Säuren ist mit einer zunehmenden Komplexstabilität in statischen und dynamischen Liberationen verbunden, was auf eine Stabilisierung der Komplexe durch den Ordnungsgrad des Cetrorelix hinweist. Ein absoluter Zusammenhang zwischen der Konformation des Cetrorelix und den Liberationseigenschaften der Komplexe lässt sich daraus

jedoch nicht ableiten, da die Freisetzungseigenschaften wesentlich durch die Geometrie der Komplexpartikel sowie die Hydrophobizität des Komplexpartners mitbestimmt werden.

Zusätzlich zur Konformationsanalyse des Cetrorelax in Komplexen unterschiedlicher Stöchiometrien erlauben die FTIR-Spektren Rückschlüsse auf den Protonierungsgrad des Komplexpartners. Dazu wurde der Verlauf der Spektren von Cetrorelax-Embonsäure-Gemischen und -Komplexen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß in allen Gemischen die freie Embonsäure mit einer deutlichen Bande zwischen 1280 und 1300 cm^{-1} (Abb. 35). Im komplexgebundenen Zustand trat diese Bande jedoch erst ab einer molaren Zusammensetzung Cetrorelax:Embonsäure von ca. 1:2, also ab dem doppelten molaren Embonsäureanteil auf (Abb. 35). Bis zu diesem Verhältnis liegt offenbar die Embonsäure vollständig in deprotonierter Form als Embonat vor. Zur Bestätigung dieses Befundes wurde zusätzlich der Embonatanteil der Komplexe quantifiziert. Der ermittelte Embonatanteil steigt bis zu einem Cetrorelax:Embonsäure-Verhältnis von 1:2 linear an und bleibt darüber etwa konstant (Abb. 33). Dies bestätigt die Untersuchungen an der Embonsäurebande und erlaubt die Schlussfolgerung, dass in Cetrorelax-Embonsäure-Komplexen eine variable Stöchiometrie von 2:1 bis 1:2 existiert und der gebildete Komplex ionischen Charakter besitzt. Über dieses Verhältnis hinaus eingesetzte Embonsäure verbleibt in ihrer freien, nicht ionisierten Form.

5.3.3 Fazit

Anhand der vorliegenden Untersuchungen zur Struktur und Zusammensetzung von Cetrorelax-Komplexen lassen sich die bisherigen Vorstellungen über die Natur dieser Komplexe klar bestätigen: Cetrorelax-Komplexe unterliegen keiner festgelegten Stöchiometrie, sondern lassen sich in einem großen, kontinuierlichen Bereich der Zusammensetzung synthetisieren und charakterisieren. Zur Stabilisierung derartiger Molekülaggregate tragen unterschiedliche Wechselwirkungen gleichzeitig bei.

Zusätzlich konnten durch die NMR- und FTIR-Spektroskopie für den Referenzkomplex von Cetrorelax mit Embonsäure die Grenzen des stöchiometrischen Bereiches mit 2:1 und 1:2 bestimmt werden. Die in diesen Systemen bestehenden Wechselwirkungen sind wegen des ionischen Charakters des Komplexpartners eindeutig elektrostatisch dominiert. Dadurch kann die Stabilität der gebildeten Komplexe, nicht jedoch ihr Retardverhalten in statischen und dynamischen Liberationen im Medium Ammoniumacetatlösung erklärt werden. Als wesentlich hierfür sind die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Bereichen des Komplexpartners mit den hydrophoben Seitenketten des Peptides anzusehen.

Wie bei der Aggregation von Cetrorelax wurde auch bei der Komplexbildung die Zunahme geordneter Sekundärstrukturen beobachtet. Daher ist auch bei der Komplexbildung die Ausbildung spezifischer Bindungsstellen für elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen anzunehmen. Eine daraus abgeleitete Modellvorstellung über die Struktur derartiger Komplexe zeigt Abbildung 60.

Wie die pharmakokinetische Modellierung der Freisetzungseigenschaften von Cetrorelax-Komplexen zeigt, sind für die Liberationseigenschaften der Komplexe zwei parallel ablaufende Elementarprozesse verantwortlich: ohne Flächenänderung verlaufende Ablösung des Wirkstoffs sowie unter Flächenabbau verlaufende Auflösung des Komplexfestkörpers. Mit dem kombinierten Zeitgesetz (Gleichung 1, S. 33) ist erstmalig die Quantifizierung dieser Vorgänge möglich, eine wesentliche Voraussetzung für das Entwickeln neuer, „maßgeschneiderter“ Cetrorelaxkomplexe.

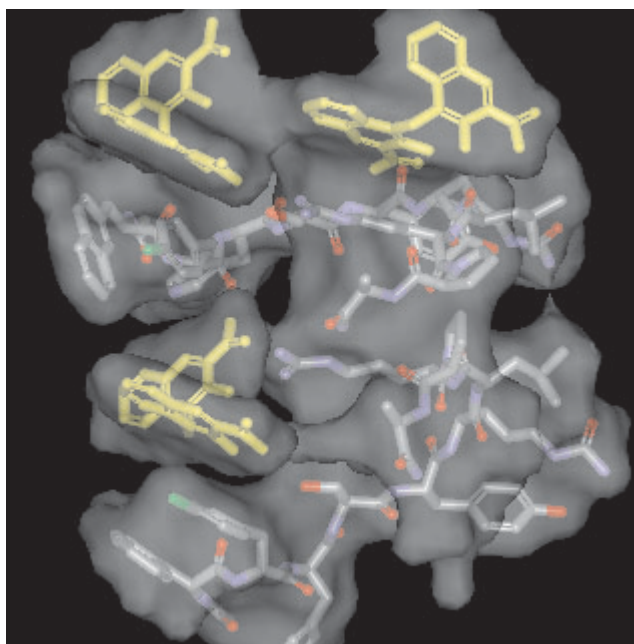


Abbildung 60: Vorschlag einer Modellstruktur eines Cetorelixkomplexes mit Embonsäure (gelb eingefärbt) in geordneter Konformation des Peptides, zusammengestellt aus je einem ausgewählten Konformer der Cetorelix- und Embonsäure-Konformationssets im molekularen Verhältnis 2:3

5.4 Entwicklung neuer Cetorelix-Komplexe

5.4.1 Analyse bekannter Cetorelix-Komplexe

Die dynamische Liberation von Cetorelix-Embonsäure- und Cetorelix-Polyaminosäure-Komplexen dokumentierte den großen Einfluss der Freisetzungsmedien auf die Liberation des Wirkstoffs. Insbesondere die Komplexe mit Polyaminosäuren zeigen jedoch im Vergleich mit Cetorelix-Acetat eine gleichmäßige, lineare Freisetzung ohne Flächenänderung. Darüber hinaus stimmen die Freisetzungsraten des Wirkstoffs in Ammoniumacetatlösung und Ringerlösung fast überein. Dieses Verhalten lässt den Schluss zu, dass der Polyasparaginsäurekomplex eine großvolumige Matrix bildet, aus der Cetorelix durch das Freisetzungsmedium herausgelöst wird. Dabei bleibt die Peptidkonzentration selbst an der Komplexoberfläche unter dem Aggregationsschwellwert, sodass sich auch in Ringerlösung keine Aggregate ausbilden können. Diese Interpretation des gegenüber der Embonsäure als Komplexpartner deutlich veränderten Freisetzungsverhaltens wird durch die mikroskopischen Untersuchungen derartiger Komplexe sowie die *in vivo* gemessenen Testosteronsuppressionen in männlichen Ratten von über 600 Stunden bekräftigt [Murgas 1998].

5.4.2 Evaluierung des MC-Simulationsverfahrens von Cetorelix-Komplexen

Durch den Vergleich der im Modellierungsverfahren ermittelten Energieverteilungen, in Tab. 13 und 14 zusammengestellt, mit den bekannten Komplexierungs- und Liberationseigenschaften der verwendeten Komplexpartner konnten sowohl die prinzipielle Eignung des angewandten Modellierungsverfahrens für die Berechnung von Komplexwechselwirkungen nachgewiesen, als auch völlig neuartige,

quantitative Informationen über deren Art und Stärke gewonnen werden: Die inter- und intramolekulare Wechselwirkungsenergie von Cetorelix bei 300 K $\langle U_{Cetro} \rangle$ besitzt für Partnermoleküle mit komplexbildenden Eigenschaften signifikant geringere Werte als in Clustern mit den nicht komplexbildenden Molekülen Benzol, Phenol, Pyridin und Naphthalin. Diese Energien beinhalten sowohl die Stabilisierung des Peptidmoleküls durch den Komplexpartner als auch die Konformationsenergie von Cetorelix.

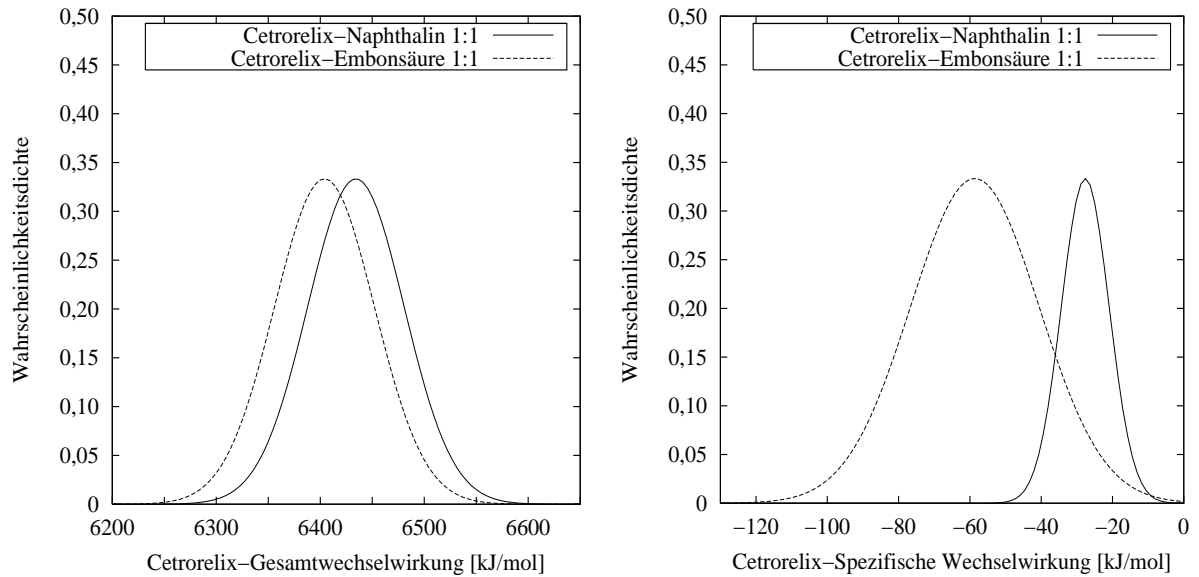


Abbildung 61: Gesamtwechselwirkung (links) und spezifische Wechselwirkungsenergien (rechts) von Cetorelix im 1:1-Cluster mit Naphthalin sowie Embonsäure

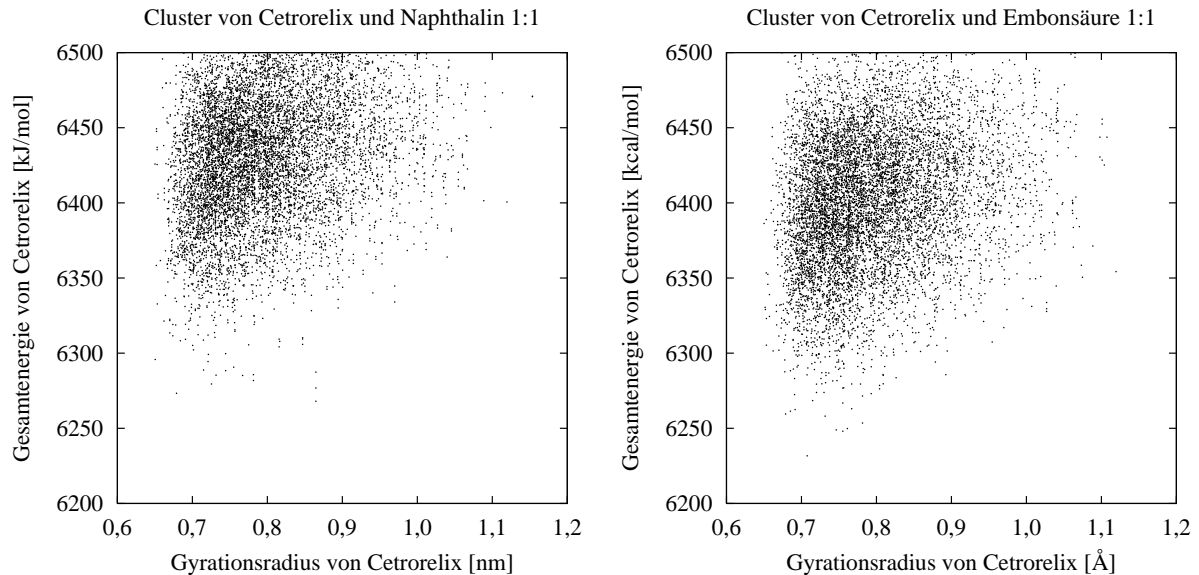


Abbildung 62: Abhängigkeit der Cetorelix-Wechselwirkungsenergien vom Gyrationradius des Cetorelixkonformers im 1:1-Cluster mit Naphthalin (links) sowie Embonsäure (rechts)

In Abb. 61 ist deutlich der Unterschied zwischen den Verteilungen der Wechselwirkungsenergien von

Cetorelix in Clustern mit Naphthalin sowie Embonsäure zu erkennen. Die Abhängigkeit von Gesamtenergie und Gyrationradius des Cetorelixkonformers illustriert Abb. 62. Im Vergleich zu unkomplexiertem Cetorelix mit den meisten energiearmen Konformeren bei Gyrationradien zwischen 0,6 nm und 0,7 nm (Abb. 23 auf S. 87) sind Cetorelixkonformere mit Gyrationradien zwischen 0,7 nm und 0,8 nm besonders energiearm in Komplexen. Dies steht mit den Erkenntnissen aus den vorgestellten Strukturuntersuchungen an Cetorelixaggregaten und -komplexen im Einklang, in denen im Vergleich zu freiem Cetorelix veränderte Sekundärstruktur des Peptides beobachtet wurden.

Der Vergleich der spezifischen Wechselwirkungen der modellierten Cluster ist anhand der berechneten Werte für $\langle U_{spec-et} \rangle$ und deren van der Waals-Komponente $\langle U_{spec-ev} \rangle$ sowie Coulomb-Komponente $\langle U_{spec-ec} \rangle$ möglich. Der Vergleich der Gesamtwechselwirkungen bestätigt die Annahme, wonach komplexierende Partnermoleküle zu signifikant geringeren Wechselwirkungsenergien im Cluster führen als nicht komplexierende Moleküle. Im Vergleich der beiden Komponenten begründet sich diese Tatsache aus einer unterschiedlich großen Coulomb-Komponente der spezifischen Wechselwirkungen. In bisherigen, empirischen Untersuchungen wurden neben hydrophoben hydrophile Funktionalitäten als erforderliche Strukturmerkmale der Partner für die Komplexierung gefunden [Murgas 1998]. Anhand der Modellrechnungen kann nun deren Einfluss erstmalig quantitativ beschrieben werden. Bei der Analyse der berechneten $\langle U_{spec-ec} \rangle$ und $\langle U_{spec-ev} \rangle$ zeigt sich, dass elektrostatische Wechselwirkungen den wesentlichen Anteil an der Komplexstabilisierung liefern. Die signifikante Differenzierung zwischen komplexbildenden und nicht komplexbildenden Partnermolekülen lässt das erarbeitete MC-Simulationsverfahren somit als geeignete Methode für das Pre-Screening neuer Komplexpartner erscheinen.

Die berechneten Wechselwirkungen in den homologen Reihen der Mono- und Dicarbonsäuren erklären die aus experimentellen Arbeiten von MURGAS [Murgas 1998] gewonnene Erkenntnis, wonach die Komplexierung nur mit den länger-kettigen Carbonsäuren möglich ist. Sowohl bei Monocarbonsäuren als auch bei Dicarbonsäuren nimmt die spezifische Stabilisierung mit steigender Kettenlänge des Komplexpartners zu. Bei Monocarbonsäuren steigt zusätzlich mit zunehmender Kettenlänge die GB/SA-Solvatationsenthalpie, während sich diese in der homologen Reihe der Dicarbonsäuren nur gering ändert. Dies weist auf eine zunehmende Hydrophobierung der Cluster von Cetorelix und Monocarbonsäuren mit deren wachsender Molekülgröße hin, die bei Dicarbonsäuren wegen deren zweiter Carboxyfunktion nicht möglich ist.

Bei der Analyse der GB/SA-Solvatationsenthalpie für die verschiedenen modellierten Cluster zeigen sich jedoch auch deutlich die Grenzen des gewählten 1:1- und 1:2-Clustermodells. Sind, wie im Fall des Komplexpartners Embonsäure, mehrere hydrophile Funktionalitäten vorhanden, wird die Möglichkeit der Bindung zweier Peptidmoleküle durch ein Molekül des Komplexpartners noch nicht berücksichtigt. Somit verbleibt ein Teil der Hydroxy- und Carboxygruppen der Embonsäure ungebunden und führt zu einer unerwartet hohen GB/SA-Solvatationsenthalpie. Daher sollten in zukünftigen Arbeiten auch Verfahren für größere Cluster mit mehreren Peptidmolekülen entwickelt werden.

5.4.3 Anwendung der Modellrechnungen auf Komplexe mit neuartigen Komplexpartnern

Die Modellierung der Komplexe mit aromatischen Hydroxycarbonsäuren (Tab. 15 und 16) lässt im Vergleich zur Referenz Embonsäure meist etwas geringere, im Fall der β -Acetoxynaphthoesäure jedoch teils höhere Komplexstabilisierungen erkennen. Die GB/SA-Solvatationsenthalpie zeigt hingegen bei allen neuen Komplexpartnern eine höhere Hydrophobie der 1:1- und 1:2-Cluster, verglichen mit dem Partnermolekül Embonsäure. Beide Erkenntnisse ließen durch Einsatz der vier aromatischen

Hydroxycarbonsäuren als potenzielle Komplexparker neuartige Komplexe mit, gegenüber Embonsäurekomplexen, veränderten Komplexierungs- und Freisetzungseigenschaften erwarten. Die Freisetzungsprofile der dynamischen Liberationen (Tab. 19) zeigten tatsächlich eine besonders lineare Freisetzung des Peptides aus dem Komplex mit Salicylsäure, selbst in Ammoniumacetat. In Ringerlösung zeigte darüber hinaus der Komplex mit Acetylsalicylsäure eine hohe Linearität, während die anderen Komplexparker zu Freisetzungen mit hoher Flächenänderung führten.

Die Modellierung von Komplexen mit diesen Dipeptiden als Partnermoleküle (Tab. 17 und 18) ließ beim Vergleich mit der Referenz Embonsäure eine teils geringere, teils deutlich höhere Stabilisierungsenergie in den Komplexen erkennen. Die GB/SA-Solvatationsenthalpien unterscheiden sich hingegen kaum von denen der Cluster mit Embonsäure. Auch mit Dipeptiden sind somit neuartige Komplexe mit gegenüber Embonsäure stark veränderten Freisetzungseigenschaften zu erwarten.

5.4.4 Herstellung und Charakterisierung der Komplexe von Cetrorelix mit aromatischen Hydroxycarbonsäuren

Bei der Herstellung der Komplexe überraschte deren unterschiedlicher Habitus. Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten der Komplexparker entstand mit Salicylsäure eine körnige, fast kristalline Substanz, während die Komplexe mit Acetylsalicylsäure, β -Hydroxynaphthoesäure und β -Acetoxynaphthoesäure sehr leicht und faserig wirkten. Dies lässt auf unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheiten und damit verschiedene Freisetzungsprofile schließen.

Die Auswertung der Stöchiometrieuntersuchungen für Komplexe mit Salicylsäure (Ergebnisse in Abb. 43 und Tab. 20) zeigt einen erheblichen Einfluss der Komplexzusammensetzung auf das Freisetzungsverhalten in Ammoniumacetatlösung. Hier besitzen nur der 1:1- und 1:2-Komplex einen ausgeprägten linearen Bereich der Cetrorelixfreisetzung. Unter den aggregierenden Bedingungen der Ringerlösung zeigen jedoch die Komplexe aller vier Stöchiometrien ein Freisetzungsprofil fast ohne Flächenänderung. Damit ist Salicylsäure ein hochinteressanter, potenzieller Partner für Komplexe mit auch in vivo linearen Freisetzungsraten.

5.4.5 Herstellung und Charakterisierung der Komplexe von Cetrorelix mit Dipeptiden

Die Komplexe mit Dipeptiden sind nach der Lyophilisierung teils gut handhabbare, körnige Substanzen, teils auch sehr leicht, flockig und schwer von der Gefäßoberfläche ablösbar. Somit lassen sich aufgrund der sehr verschiedenen Oberflächenbeschaffenheiten auch hier unterschiedliche Freisetzungsprofile erwarten.

Die Freisetzungsprofile der dynamischen Liberationen (Tab. 21) zeigen für das Liberationsmedium Ammoniumacetat einheitlich Freisetzungsprofile mit überwiegender Freisetzung unter Flächenabbau und nur geringer linearer Komponente. Lediglich die Komplexe mit Asp-Phe-OMe zeigen einen ausgeprägteren linearen Freisetzungsverlauf. Unter den aggregierenden Bedingungen der Ringerlösung hingegen lassen sich die Komplexe in zwei wesentliche Gruppen einteilen:

- linear dominierte Freisetzung mit hohen Freisetzungsraten ($c = 0,012 \dots 0,018$) liefern Komplexe mit Glu-Gly, Asp-Gly und Asp-Tyr, und
- linear dominierte Freisetzung mit niedrigen Freisetzungsraten ($c = 0,003 \dots 0,006$) liefern Komplexe mit Glu-Tyr, Asp-Val, Glu-Ala, Arg-Glu und Asp-Phe-OMe.

Von besonderer Bedeutung ist der bei allen Dipeptidkomplexen ausgeprägt lineare Freisetzungverlauf in Ringerlösung. Dieser Verlauf entspricht den pharmakologischen Anforderungen an ein Retardpräparat und sollte in späteren Untersuchungen *in vivo* überprüft werden. Ein Vergleich der Freisetzungsrates in Ringerlösung mit dem Habitus der Komplexe zeigt keinen ausgeprägten Zusammenhang. Daraus ist zu schließen, dass für die Komplexe mit Dipeptiden die makroskopischen Eigenschaften nicht direkt mit der Art des Flächenabbaus bei der Freisetzung in Verbindung stehen.

5.4.6 Fazit

Für die vorgestellten Komplexe von Cetrorelix und aromatischen Hydroxycarbonsäuren sowie Dipeptiden konnten die Komplexmodellierung sowie die Charakterisierung auf der Basis des neu entwickelten kinetischen Modells erstmalig erfolgreich angewandt werden.

Die Berechnung der Komplexwechselwirkungen mit dem neu entwickelten Modellierungsverfahren ermöglicht für bekannte und neuartige Komplexpartner die quantitative Beschreibung der Komplexstabilität, basierend auf der intra- und intermolekularen Wechselwirkungsenergie von Cetrorelix. Sie beinhaltet sowohl die Konformationsenergie des Peptidmoleküls als auch die Wechselwirkungsenergie mit dem Komplexpartner. Die berechneten Komplexstabilitäten erwiesen sich für nicht komplexbildende Partnermoleküle, verglichen mit den Komplexstabilitäten für bekannte oder potenzielle Komplexpartner, als signifikant geringer. Die Art und Größe der zwischenmolekularen Wechselwirkungen lassen sich anhand der spezifischen Wechselwirkungsenergien für Cetrorelix detailliert und quantitativ beschreiben. So zeigt sich beim Vergleich dieser Energien für Komplexe mit verschiedenen bekannten Komplexpartnern, dass neben den van der Waals- stets Coulomb-Wechselwirkungen entscheidend für die Komplexstabilisierung sind. Hierzu gehören Ionenpaarwechselwirkungen ebenso wie Wasserstoffbrückenbindungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Je nach molekularer und räumlicher Struktur der Komplexpartner differieren vor allem die elektrostatischen Wechselwirkungen. Ein besonders deutliches Beispiel hierfür ist in der homologen Reihe der Dicarbonsäuren die Malonsäure. Diese ermöglicht durch ihre räumliche Struktur und die beiden Carboxylgruppen eine besonders gute elektrostatische Wechselwirkung mit Cetrorelix. Es ist daher eine besonders gute Eignung der Malonsäure als hydrophile Komponente in Komplexpartnern für Cetrorelix zu postulieren. Derartige Erkenntnisse lassen sich zukünftig für die Entwicklung neuartiger Komplexpartner einsetzen und wurden nur mit Hilfe der vorgestellten Modellrechnungen zugänglich. Nach der Modellrechnung lassen sich nunmehr effektiv diejenigen Komplexe mit neuartigen Komplexpartnern zielgerichtet auswählen, die sich für eine experimentelle Analyse empfehlen.

Auch die Hydrophilie der durch die Komplexbildung entstehenden Molekülcluster lässt sich durch die Modellrechnungen ermitteln. Wegen des hohen Rechenaufwandes für eine explizite Solvatisation mit Wassermolekülen wurde vorerst das wesentlich einfachere Kontinuum-Modell der GB/SA-Solvatation gewählt. Beim Vergleich dieser GB/SA-Solvatationsenthalpien mit den dynamischen Liberationsgeschwindigkeiten für Komplexpartner der homologen Reihe der Monocarbonsäuren zeigte sich, dass die mit steigender Kettenlänge der Carbonsäure abnehmenden Solvatationsenthalpien mit den sinkenden Freisetzungsgeschwindigkeiten gut übereinstimmen. Jedoch wurden auch unerwartet hohe GB/SA-Enthalpien für den hydrophoben Komplex mit Embonsäure gefunden. Die Ursache dieses Widerspruchs konnte in der Art des Modells gefunden werden. Es kann mit seiner 1:1- oder 1:2-Stöchiometrie zwischen Peptid und Komplexpartner die Hydrophobizität derjenigen Komplexe gut reproduzieren, deren Komplexpartner nur eine oder mehrere, benachbarte, polare funktionelle Gruppen besitzen. Größere Komplexpartner, wie die länger-kettigen, aliphatischen Dicarbonsäuren mit weit entfernten polaren Gruppen, können mit mehreren Peptidmolekülen wechselwirken. Die Modellierung

derartiger Komplexe setzt ein Berechnungsverfahren mit größeren Clustern aus mehreren Molekülen des Komplexpartners sowie des Peptides voraus. In zukünftigen Arbeiten werden derartige Modelle zu entwickeln und anzuwenden sein.

Die Herstellung und Charakterisierung der Komplexe mit den neuartigen Partnern bestätigte die durch die Modellierung postulierte Stabilität dieser Komplexe. Alle untersuchten neuartigen Komplexpartner führten zu einer verzögerten Freisetzung des Wirkstoffs in einer jeweils spezifischen Freisetzungskinetik. Deren Vorherberechnung war durch die beschränkte Aussagekraft der GB/SA-Solvatation im 1:1- und 1:2-Modell und durch die derzeit nicht zu berechnende, aber für die Freisetzung sehr wesentliche, Oberflächenbeschaffenheit des Komplexes noch nicht möglich. Somit stellt die dynamische Liberationsanalyse weiterhin eine nicht zu ersetzende Charakterisierungsmethode für Peptidkomplexe dar. Deren Auswertung konnte mit Hilfe des neu erarbeiteten kinetischen Modells jedoch deutlich verbessert werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Beiträge zur Entwicklung neuer Depot- und Applikationsformen von Cetrorelix vorgestellt, die auf Erfahrungen mit dem Verfahren der nichtkovalenten Komplexbildung von Peptiden mit neuartigen Partnermolekülen beruhen.

Zur Erreichung dieses Zieles wurden zuerst die Erkenntnisse und Vorstellungen über die Raumstruktur von Cetrorelix, die Natur der Aggregationsprozesse sowie Struktur und Wechselwirkungen der Komplexe durch spektroskopische Untersuchungen sowie Modellrechnungen erweitert. Ein so verbessertes Verständnis der Komplexbildung sollte zu einer effizienten Entwicklung neuartiger, biokompatibler Komplexpartner mit „maßgeschneiderten“ Aggregations- und Freisetzungseigenschaften führen.

Für die Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Cetrorelix wurden FTIR-Spektroskopie und Modellrechnungen zur Konformationsuche erfolgreich eingesetzt. Die spektroskopischen Analysen haben die aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gewonnene Annahme bestätigen können, nach der dieses Peptidmolekül keine vorherrschende und bevorzugte Sekundärstruktur aufweist, sondern eine Vielzahl meist ungeordneter Raumstrukturen einnehmen kann. Die FTIR-Spektren des reinen Feststoffs sowie in wässriger Lösung zeigten jedoch eine bislang unbekannte Orientierung der Peptidmoleküle zu β -Faltblatt-reichen Strukturen. Dieser Befund konnte als Aggregation der Moleküle zu größeren Einheiten interpretiert werden und korrespondiert mit der makroskopisch zu beobachtenden Gelbildung von Cetrorelixlösungen. Die Ursache für das Fehlen einer Vorzugskonformation des nicht aggregierten Cetrorelix konnte durch Modellrechnungen in der Koexistenz vielfältiger, intramolekular stabiler und energetisch äquivalenter Raumstrukturen mit stark variierenden Gyrationen gefunden werden.

Die Aggregation von Cetrorelix erwies sich nicht nur als Einflussgröße für die Strukturuntersuchungen, sondern auch als unerwünschter Nebeneffekt der *in vivo*-Applikation von Cetrorelix und dessen Komplexen. Daher wurde die Aggregation eingehend mit FTIR-, CD- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Mit Hilfe von FTIR- und CD-Spektroskopie konnten die mit der Aggregation verbundene Sekundärstrukturveränderungen des Cetrorelix quantifiziert und deren Geschwindigkeit bei verschiedenen Konzentrationen in wässriger Lösung untersucht werden. Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglichte erstmalig derartige Untersuchungen in stark verdünnten wässrigen Cetrorelixlösungen, in denen die Aggregation wesentlich von den Umgebungsbedingungen beeinflusst wird. So konnten detaillierte Daten über den Einfluss von Cetrorelixkonzentration, Temperatur, Elektrolytart und -konzentration auf die Geschwindigkeit der Aggregation gewonnen werden. Mit ihrer Hilfe ist die Aggregation nunmehr besser charakterisierbar und es lassen sich auf diesen Erkenntnissen aufbauend zukünftig Verfahren zu ihrer Kontrolle und Vermeidung entwickeln.

Die bisherigen Vorstellungen zur Struktur und Zusammensetzung von Cetrorelix-Komplexen ließen sich aufgrund der FTIR-spektroskopischen sowie dynamischen Relaxationsanalysen klar bestätigen: Cetrorelix-Komplexe unterliegen keiner festgelegten Stöchiometrie, sondern lassen sich in einem großen, kontinuierlichen Bereich der Zusammensetzung synthetisieren und charakterisieren. Die Stabilisierung derartiger Molekülaggregate konnte auf polare und hydrophobe Wechselwirkungen zurückgeführt werden. Auch bei der Komplexbildung wurde die Zunahme geordneter Sekundärstrukturen der Cetrorelix-Moleküle beobachtet. Dies ist mit der Ausbildung spezifischer Bindungsstellen für polare und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Molekülen von Cetrorelix und Komplexpartner zu erklären.

Die Methoden zur Charakterisierung der Freisetzungseigenschaften von Cetrorelix-Komplexen konnten gegenüber bisherigen Arbeiten wesentlich erweitert werden: So wurden ein *in vivo*-näheres Frei-

setzungsmedium eingeführt und ein weitgehend automatisiertes und standardisiertes Datenerfassungs- und Auswertungsverfahren erarbeitet und erprobt. Dessen Kern ist die pharmakokinetische Modellierung der Freisetzungseigenschaften von Cetrorelix-Komplexen. Es zeigte sich, dass für die Liberationseigenschaften der Komplexe zwei parallel ablaufende Elementarprozesse verantwortlich sind: ohne Flächenänderung verlaufende Ablösung des Wirkstoffs sowie unter Flächenabbau verlaufende Auflösung des Komplexfestkörpers. Mit einem dafür formulierten, kombinierten Zeitgesetz ist erstmalig die Quantifizierung dieser Vorgänge möglich.

Für die Erarbeitung neuartiger Peptidkomplexe kamen bisher Screeningverfahren mit manueller Auswahl potenzieller Komplexpartner auf der Basis empirisch gewonnener Erkenntnisse über Stärke und Art der Komplexwechselwirkungen zum Einsatz. Für Cetrorelix bedeutete dies die Auswahl von Komplexpartnern mit hydrophilen, sauren sowie hydrophoben Bereichen im Molekül. In der vorliegenden Arbeit wurde der Screeningprozess bezüglich der Selektion potenzieller Komplexpartner erweitert. Erstmals wurde vor der experimentellen Darstellung und Charakterisierung neuer Komplexe mit Hilfe eines neu entwickelten Modellierungsverfahrens die zu erwartenden Komplexwechselwirkungen berechnet. Dies führte neben einem wesentlich verbesserten, quantitativen Verständnis der Komplexstruktur zu Komplexen mit neuartigen, biokompatiblen Komplexpartnern. So konnten mit aromatischen Hydroxycarbonsäuren und Dipeptiden stabile Komplexe dargestellt werden, deren Freisetzungseigenschaften unter aggregierenden, in vivo-nahen Bedingungen von meist linearer Wirkstoffabgabe mit spezifischen, sehr verschiedenen Freisetzungsraten geprägt ist. Einige dieser Komplexe besitzen daher ein großes Potenzial für eine lineare, charakteristische Freisetzung des Wirkstoffs auch bei vivo-Untersuchungen als Basis für einen künftigen Einsatz als neuartige Depotformen für Cetrorelix.

Die Übertragung der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden zur Charakterisierung und Modellierung von Peptidkomplexen auf weitere Peptidhormone kann den herkömmlichen Entwicklungsprozess neuer Komplexe zukünftig ergänzen und erweitern.

7 Quellenverzeichnis

- [Abkevich et al. 1995] ABKEVICH, V. I. ; GUTIN, A. M. ; SHAKHNOVICH, E. I.: Impact of local and non-local interactions on thermodynamics and kinetics of protein folding. In: *J. Mol. Biol.* 252 (1995), 460–471
- [Albano et al. 1997] ALBANO, C. ; SMITZ, J. ; CAMUS, M. ; RIETHMULLER-WINZEN, H. ; VAN-STEIRTEGHEM, A. ; DEVROEY, P.: Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. In: *Fertil. Steril.* 67 (1997), 917–922
- [Albano et al. 1996] ALBANO, C. ; SMITZ, J. ; CAMUS, M. ; RIETHMULLERWINZEN, H. ; SIEBERT-WEIGEL, M. ; DIEDRICH, K. ; VANSTEIRTEGHEM, A. C. ; DEVROEY, P.: Hormonal profile during the follicular phase in cycles stimulated with a combination of human menopausal gonadotrophin and gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix). In: *Hum. Reprod.* 11 (1996), 2114–2118
- [Allinger et al. 1989] ALLINGER, N. L. ; YUH, Y. H. ; LIU, J. -H.: Molecular Mechanics. The MM3 Force Field for Hydrocarbons. In: *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989), 8551
- [von Angerer 1996] ANGERER, E. von: Entwicklungsstrategien für Arzneistoffe zur Therapie hormonabhängiger Tumoren. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 25 (1996), 74–84
- [Asta Medica 1994] ASTA MEDICA: Cetrorelix. In: *Drugs Fut.* 19 (1994), 228–237
- [Asta Medica 1996] ASTA MEDICA: Cetrorelix. In: *Drugs Fut.* 21 (1996), 307
- [Asta Medica and Nippon Kayaku Shionogi 1997] ASTA MEDICA AND NIPPON KAYAKU SHIONOGI: Cetrorelix. In: *Drugs Fut.* 22 (1997), 301
- [Bajusz et al. 1988] BAJUSZ, S. ; CSERNUS, V. J. ; JANAKY, T. ; BOKSER, L. ; FEKETE, M. ; SCHALLY, A. V.: New antagonists of LHRH. II. Inhibition and potentiation of LHRH by closely related analogues. In: *Int. J. Pept. Protein Res.* 32 (1988), 425–435
- [Bauer et al. 1994] BAUER, H. H. ; MÜLLER, M. ; GOETTE, J. ; MERKLE, H. P. ; FRINGELI, U. P.: Interfacial adsorption and aggregation associated changes in secondary structure of human calcitonin monitored by ATR-FTIR spectroscopy. In: *Biochemistry* 33 (1994), 12276–12282
- [Bernhardt & Comba 1992] BERNHARDT, P. V. ; COMBA, P.: Molecular mechanics calculations of transition metal complexes. In: *Inorg. Chem.* 31 (1992), 2638
- [Bernkop-Schnurch et al. 1997] BERNKOP-SCHNURCH, A. ; BRATENGEYER, I. ; VALENTA, C.: Development and in vitro evaluation of a drug delivery system protecting from trypsinic degradation. In: *Int. J. Pharm.* 157 (1997), 17–25
- [Bhatia et al. 1997] BHATIA, K. S. ; GAO, S. ; SINGH, J.: Effect of penetration enhancers and iontophoresis on the FT-IR spectroscopy and LHRH permeability through porcine skin. In: *J. Control. Release* 47 (1997), 81–89

- [Bhatia & Singh 1997] BHATIA, K. S. ; SINGH, J.: Percutaneous absorption of LHRH through porcine skin: Effect of N-methyl 2-pyrrolidone and isopropyl myristate. In: *Drug Develop. Ind. Pharm.* 23 (1997), 1111–1114
- [Billeter et al. 1997] BILLETER, M. ; RIEK, R. ; WIDER, G. ; HORNEMANN, S. ; GLOCKSHUBER, R. ; WUTHRICH, K.: Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 7281–7285
- [Bixon & Lifson 1967] BIXON, M. ; LIFSON, S.: Potential Functions and Conformations in Cycloalkanes. In: *Tetrahedron* 23 (1967), 769
- [Blanco 1991] BLANCO, M.: Molecular Silverware. In: *J. Comp. Chem.* 12 (1991), 237
- [Braun 1991] BRAUN, K.: *Wirkungsmodifizierung von [D-Phe6]GnRH durch Komplexbildung mit Polyaminosäuren und FTIR-spektroskopische Untersuchungen zu Peptidhormon-Polyaminosäurekomplexen.* Fakultät für Naturwissenschaften und Mathematik, Technische Universität Dresden, Dissertation, 1991
- [Brooks et al. 1983] BROOKS, B. R. ; BRUCCOLERI, R. E. ; OLAFSON, B. D. ; STATES, D. J. ; SWAMINATHAN, S. ; KARPLUS, M.: CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations. In: *J. Comput. Chem.* 4 (1983), 187–217
- [Carlson et al. 1993] CARLSON, H. A. ; NGUYEN, T. B. ; OROZCO, M. ; JORGENSEN, W. L.: Accuracy of free energies of hydration for organic molecules from 6-31G*-derived partial charges. In: *J. Comp. Chem.* 14 (1993), 1240–1249
- [Carlsson 1998] CARLSSON, P.: *Evaluation of a GB/SA implementation for solvation free energy calculations using quantum and molecular mechanics.* Biomedical Centre, Uppsala University School of Engineering, Master's degree project, 1998
- [Cawello 1997] CAWELLO, W.: Connection of pharmacokinetics and pharmacodynamics - how does it work? In: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 35 (1997), 414–417
- [Cawello & Antonucci 1997] CAWELLO, W. ; ANTONUCCI, T.: The correlation between pharmacodynamics and pharmacokinetics: Basics of pharmacokinetics-pharmacodynamics modeling. In: *J. Clin. Pharmacol.* 37 (1997), 65–69
- [Chess 1998] CHESS, R.: Economics of drug delivery. In: *Pharm. Res.* 15 (1998), 172–174
- [Clark & Murray 1995] CLARK, D. E. ; MURRAY, C. W.: PRO-LIGAND An approach to de novo molecular design. 5. Tools for the analysis of generated structures. In: *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 35 (1995), 914–923
- [Clark et al. 1989] CLARK, M. ; CRAMER III, R. D. ; OPDENBOSCH, N. van: Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field. In: *J. Comp. Chem.* 10 (1989), 982–1012
- [Collins & Hughes 1995] COLLINS, J. A. ; HUGHES, E. G.: Pharmacological interventions for the induction of ovulation. In: *Drugs* 50 (1995), 480–494
- [Creighton 1995] CREIGHTON, T.: Disulphide-coupled protein folding pathways. In: *Philos. Trans. R Soc. Lond. [Biol.]* 1323 (1995), 5–10

- [Csernus et al. 1990] CSERNUS, V. J. ; SZENDE, B. ; GROOT, K. ; REDDING, T. W. ; SCHALLY, A. V.: Development of radioimmunoassay for a potent Luteinizing Hormone-Releasing Hormone antagonist. In: *Arzneim. -Forsch. /Drug Res.* 40 (1990), 111–118
- [Deger et al.] DEGER, W. ; LOOSZ, A. ; WOLF-HEUSS, E. ; ENGEL, J. ; SCHALLY, A. V.: *Stability of Cetrorelix acetate under the influence of proteolytic enzymes.* – Mitteilung der ASTA MEDICA
- [Didi et al. 1991] DIDI, M. A. ; MAKI, A. K. T. ; MOSTAFA, M. M.: Spectroscopic studies of 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl and its derivatives and the role of hydrogen bonding on the asymmetry of binaphthyl-I. In: *Spectrochim. Acta* 47 (1991), 667–670
- [Diem 1995] DIEM, M.: Determining the solution conformation of biological molecules by infrared circular dichroism. In: *Spectroscopy - Eugene, Oreg.* 10 (1995), 38–43
- [Dluhy & Mendelsohn 1988] DLUHY, R. A. ; MENDELSON, R.: Emerging techniques in biological FT-IR. In: *Anal. Chem.* 60 (1988), 269A–278A
- [Dousseau & Pezolet 1990] DOUSSEAU, F. ; PEZOLET, M.: Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. In: *Biochemistry* 29 (1990), 8771–8779
- [Drache et al. 1999] DRACHE, M. ; WEBER, T. ; SCHMIDT-NAAKE, G.: Conformation analysis of poly(styrene-alt-maleic anhydride) in solvents. In: *Angew. Macromol. Chem.* 273 (1999), 69–74
- [Duijkers et al. 1997] DUIJKERS, I. J. M. ; KLIPPING, C. ; MULDER, T. M. T. ; OUT, H. J. ; BENNINK, H. J. T. C. ; VEMER, H. M.: Pharmacodynamics and pharmacokinetics after repeated subcutaneous administration of three gonadotrophin preparations. In: *Hum. Reprod.* 12 (1997), 2379–2384
- [Dutta et al. 1989] DUTTA, A. S. ; GORMLEY, J. J. ; MCLACHLAN, P. F. ; WOODBURN, J. R.: Conformationally restrained cyclic peptides as antagonists of Luteinizing hormone-Releasing hormone. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 (1989), 1114–1120
- [Dutta et al. 1993] DUTTA, A. S. ; GORMLEY, J. J. ; WOODBURN, J. R. ; PAUL, P. K. ; OSGUTHORPE, D. J. ; CAMPBELL, M. M.: Antagonists of Luteinizing hormone-Releasing hormone (LHRH). Progress towards non-peptide leads. In: *Bioorg. Medicinal Chem. Letter* 3 (1993), 943–948
- [Eidne & Anderson 1996] EIDNE, K. A. ; ANDERSON, L.: *Gonadotropin-releasing hormone and its receptor.* Cambridge : Cambridge University Press, 1996 102–134
- [Engel et al.] ENGEL, J. ; DEGER, W. ; REISSMANN, T. ; LOSSE, G. ; NAUMANN, W. ; MURGAS, S.: Immobilisierte und aktivitätssteigernde Komplexe von LHRH-Antagonisten und Verfahren zu deren Herstellung / DE 197 12 718 C2 A 61 K38/08 (1999). – Patent
- [Fabian et al. 1994] FABIAN, H. ; SCHULTZ, C. ; BRACKMANN, J. ; HAHN, U. ; SAENGER, W. ; MANTSCH, H. H. ; NAUMANN, D.: Impact of point mutation on the structure and thermal stability of ribonuclease T1 in aqueous solution probed by Fourier transform infrared spectroscopy. In: *Biochemistry* 33 (1994), 10725–10730

- [Felberbaum et al. 1995] FELBERBAUM, R. E. ; REISSMANN, T. ; KUEPKER, W. ; BAUER, O. ; HANANI, S. A. ; DIEDRICH, C. ; DIEDRICH, K.: Preserved pituitary response under ovarian stimulation with HMG and GnRH antagonists (Cetrorelix) in women with tubal infertility. In: *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 61 (1995), 151–155
- [Fleischhauer 1997] FLEISCHHAUER, J.: *Modellvorstellungen an Polymeren - Molecular Modeling*, Technische Universität Clausthal-Zellerfeld, Dissertation, 1997
- [Flinn et al. 1996a] FLINN, N. ; COPPARD, S. ; TOTH, I.: Oral absorption studies of lipidic conjugates of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). In: *Int. J. Pharm.* 137 (1996), 33–39
- [Flinn et al. 1996b] FLINN, N. ; HUSSAIN, I. ; SHAW, A. ; ARTURSSON, P. ; GIBBONS, W. A. ; TOTH, I.: Oral absorption studies of lipid-polylysine conjugates of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LHRH). In: *Int. J. Pharm.* 143 (1996), 127–134
- [Folkers et al. 1987] FOLKERS, K. ; BOWERS, C. ; TANG, P. -F. L. ; FENG, D. ; OKAMOTO, T. ; ZHANG, Y. ; LJUNGQVIST, A.: *Specificity of design to achieve antagonists of LHRH of increasing effectiveness in therapeutic activity*. B. H. : Vickery, 1987 25–36
- [Freidinger et al. 1980] FREIDINGER, R. M. ; VEBER, D. F. ; SCHWENK-PERLOW, D. ; BROOKS, J. R. ; SAPERSTEIN, R.: Bioactive conformation of Luteinizing hormone-Releasing hormone: Evidence from a conformationally constrained analogue. In: *Science* 210 (1980), 656–658
- [Galla & Müller 1988] GALLA, H. J. ; MÜLLER, H. J.: *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Stuttgart : G. -Thieme-Verlag, 1988
- [Geiger 1984] GEIGER, R.: *Design and synthesis of LH-RH agonists and antagonists*. Bd. 656. Int. Congr. Ser. - Excerpta Medica (LHRH and its analogues), 1984 36–49
- [Golan et al. 1997] GOLAN, R. ; COOPER, T. G. ; OSCHRY, Y. ; WEINBAUER, G. F. ; SHOCHAT, L. ; LEWIN, L. M.: Epididymal maturation of chromatin in spermatozoa from control monkeys (*Macaca fascicularis*) and those treated with cetrorelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist. In: *Biol. Reprod.* 57 (1997), 354–359
- [Greenfield 1996] GREENFIELD, N. J.: Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. In: *Anal. Biochem.* 235 (1996), 1–10
- [van Gunsteren et al. 1998] GUNSTEREN, W. F. van ; DAURA, X. ; MARK, A. E.: GROMOS force field. In: *Encyclopaedia of Computational Chemistry* 2 (1998), 1211–1216
- [Hadden et al. 1995] HADDEN, J. M. ; CHAPMAN, D. ; LEE, D. C.: A comparison of infrared spectra of proteins in solution and crystalline forms. In: *Protein Struct. Mol. Enzym.* 1248 (1995), 115–122
- [Halgren 1992] HALGREN, T. A.: Representation of van der Waals (vdW) Interactions in Molecular Mechanics Force Fields: Potential Form, Combination Rules, and vdW Parameters. In: *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992), 7827–7843
- [Haris & Chapman 1988] HARIS, P. I. ; CHAPMAN, D.: FT-IR in biochemistry and medicine. In: *Chem. Br.* 24 (1988), 1015–1018

- [Haris & Chapman 1995] HARIS, P. I. ; CHAPMAN, D.: The conformational analysis of peptides using fourier transform IR spectroscopy. In: *Biopolymers* 37 (1995), 251–263
- [Hasel et al. 1988] HASEL, W. ; HENDRICKSON, T. F. ; STILL, W. C.: A Rapid Approximation to the Solvent Accessible Surface Areas of Atoms. In: *Tetrahedron Comput. Methodol.* 1 (1988), 103
- [Haviv et al. 1993] HAVIV, F. ; FITZPATRICK, T. D. ; NICHOLS, C. J. ; SWENSON, R. E. ; MORT, N. A. ; BUSH, E. N. ; DIAZ, G. ; NGUYEN, A. T. ; HOLST, M. R. ; CUBYLSKI, V. A. ; LEAL, J. A. ; BAMMERT, G. ; RHUTASEL, N. S. ; GODGE, P. W. ; JOHNSON, E. S. ; CANNON, J. B. ; KNITTLE, J. ; GREER, J.: The effect of NMeTyr5 substitution in Luteinizing Hormone-Releasing Hormone antagonists. In: *J. Med. Chem.* 36 (1993), 928–933
- [Hermann 1997] HERMANN, R. B.: Modeling Hydrophobic solvation of nonspherical systems: Comparison of molecular surface area with accessible surface area. In: *J. Comp. Chem.* 18 (1997), 115–125
- [Holtzer & Hawkins 1996] HOLTZER, A. ; HAWKINS, R. B.: The state of aggregation of alpha-helical poly(l-glutamic acid) in aqueous salt solutions. In: *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996), 4220–4221
- [Horvath et al. 1995] HORVATH, J. E. ; ERTL, T. ; QIN, Y. F. ; GROOT, K. ; SCHALLY, A. V.: LH-RH and its antagonist cetrorelix inhibit growth of JAR human choriocarcinoma cells in vitro. In: *Int. J. Oncol.* 6 (1995), 969–975
- [Hutchinson & Thornton 1994] HUTCHINSON, E. G. ; THORNTON, J. M.: A revised set of potentials for beta-turn formations in proteins. In: *Protein Sci.* 3 (1994), 2207–2216
- [Jaenicke 1995] JAENICKE, R.: Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins. In: *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 348 (1995), 97–105
- [Jankowsky 1995] JANKOWSKY, R.: *Untersuchungen zur Stabilität verschiedener LHRH-Analoga gegenüber proteolytischem Abbau*, Technische Universität Dresden, Diplomarbeit, 1995
- [Jayakumar et al. 1997] JAYAKUMAR, R. ; JAYANTHY, C. ; GOMATHY, L.: Peptide aggregates: a novel model system to study self-assembly of peptides. In: *Int. J. Peptide Protein Res.* 45 (1997), 129–137
- [Jennings et al. 1996] JENNINGS, J. C. ; MORELAND, K. ; PETERSON, C. M.: In vitro fertilisation - a review of drug therapy and clinical management. In: *Drugs* 52 (1996), 313–343
- [Jorgensen & Tirado-Rives 1988] JORGENSEN, W. L. ; TIRADO-RIVES, J.: The OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. In: *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988), 1657–1666
- [Juban et al. 1997] JUBAN, M. M. ; JAVADPOUR, M. M. ; BARKLEY, M. D.: Circular dichroism studies of secondary structure of peptides. In: *Antibact. Pept. Prot.* 78 (1997), 73–78
- [Jungwirth et al. 1997] JUNGWIRTH, A. ; GALVAN, G. ; PINSKI, J. ; HALMOS, G. ; SZEPESHAZI, K. ; CAI, R. Z. ; GROOT, K. ; SCHALLY, A. V.: Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix (SB-75) and bombesin antagonist RC-3940-II inhibit the growth of androgen-independent PC-3 prostate cancer in nude mice. In: *Prostate* 32 (1997), 164–172

- [Jungwirth et al. 1998] JUNGWIRTH, A. ; SCHALLY, A. V. ; HALMOS, G. ; GROOT, K. ; SZEPESHAZI, K. ; PINSKI, J. ; ARMATIS, P.: Inhibition of the growth of caki-I human renal adenocarcinoma in vivo by luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix, somatostatin analog RC-160, and bombesin antagonist RC-3940-II. In: *Cancer* 82 (1998), 909–917
- [Kamijo et al. 1996] KAMIJO, A. ; KAMEI, S. ; SAIKAWA, A. ; IGARI, Y. ; OGAWA, Y.: In vitro release test system of (d,l-lactic-glycolic) acid copolymer microcapsules for sustained release of LHRH agonist (leuprorelin). In: *J. Control. Release* 40 (1996), 269–276
- [Kanaoka 1977] KANAOKA, Y.: Organische Fluoreszenzreagentien für die Untersuchung von Enzymen und Proteinen. In: *Angew. Chem.* 89 (1977), 142–152
- [Kleemann et al. 1991] KLEEMANN, A. ; DRAUZ, K. ; ENGEL, J. ; KUTSCHER, B. ; WÜNSCH, E.: *Cetrorelix - a new long acting LHRH antagonist with a very long histaminergic potential.* Akabori-Konferenz (Schriftenreihe), 1991
- [Kouwijzer & Grootenhuys 1995] KOUWIJZER, M. L. C. E. ; GROOTENHUIS, P. D. J.: CHEAT95. In: *J. Phys. Chem.* 99 (1995), 13426–13436
- [Kristof 1979] KRISTOF, W.: *Leicht polarisierbare Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen von Proteinen*, Dissertation, 1979. – München
- [Kutscher et al. 1997] KUTSCHER, B. ; BERND, M. ; BECKERS, T. ; POLYMEROPOULOS, E. E. ; ENGEL, J.: Chemistry and molecular biology in the search for new LHRH antagonists. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 36 (1997), 2149–2162
- [Lang 1998] LANG, A.: *Untersuchungen zum Komplezierungs- und Aggregationsverhalten von Cetrorelix*, Technische Universität Dresden, Diplomarbeit, 1998
- [Lee & Chien 1995] LEE, Y. L. ; CHIEN, Y. W.: Oral mucosa controlled delivery of LHRH by bilayer mucoadhesive polymer systems. In: *J. Control. Release* 37 (1995), 251–261
- [Lehninger 1987] LEHNINGER, A. L.: *Biochemie.* 2. Aufl. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1987 105
- [Lehninger 1994] LEHNINGER, A. L.: *Prinzipien der Biochemie.* 2. Aufl. Heidelberg, Berlin : Spektrum Akademischer Verlag, 1994
- [Lemer et al. 1995] LEMER, C. M. R. ; ROOMAN, M. J. ; WODAK, S. J.: Protein structure prediction by threading methods: evaluation of current techniques. In: *Protein-Struct. Funct. Genet.* 23 (1995), 337–355
- [Leonard et al. 1995] LEONARD, D. M. ; REILY, M. D. ; DUNBAR, J. B. ; HOLUB, K. E. ; CODY, W. L. ; HILL, K. E. ; WELCH, K. M. ; FLYNN, M. A. ; REYNOLDS, E. E. ; DOHERTY, A. M.: Structure-activity and biophysical studies of the c-terminal hexapeptide of endothelin. In: *Bioorg. Medicinal Chem. Letter* 5 (1995), 967–972
- [Lewis et al. 1973] LEWIS, P. N. ; MOMANY, F. A. ; SCHERAGA, H. A.: Chain reversals in proteins. In: *Biochim. Biophys. Acta* 303 (1973), 211–229
- [Leyendecker & Wildt 1996] LEYENDECKER, G. ; WILDT, L.: From physiology to clinics - 20 years of experience with pulsatile GnRH. In: *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 65 (1996), 3–12

- [Liu & Zhou 1995] LIU, Z. J. ; ZHOU, J. M.: Spin-labeling probe on conformational change at the active sites of creatine kinase during denaturation by guanidine hydrochloride. In: *Protein Struct. Mol. Enzym.* 1253 (1995), 63–68
- [Mantsch 1991] MANTSCH, H. H.: Bioanalytical applications of FT-IR spectroscopy. In: *Kem. Kemi* 18 (1991), 183–185
- [Marquardt 1963] MARQUARDT, D. W.: An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. In: *J. Soc. Industr. Appl. Math.* 11 (1963), 431–441
- [Marraud & Aubry 1996] MARRAUD, M. ; AUBRY, A.: Crystal structures of peptides and modified peptides. In: *Biopolymers* 40 (1996), 45–83
- [Marshall 1993a] MARSHALL, G. R.: Conformation-function relationships in LHRH analogs. I. Conformations of LHRH peptide backbone. In: *Int. J. Pept. Protein Res.* 42 (1993), 171–180
- [Marshall 1993b] MARSHALL, G. R.: Conformation-function relationships in LHRH analogs. II. Conformations of LHRH peptide agonists and antagonists. In: *Int. J. Pept. Protein Res.* 42 (1993), 181–193
- [Marshall et al. 1995] MARSHALL, G. R. ; BEUSEN, D. D. ; NIKIFOROVICH, G. V.: Peptide conformation: stability and dynamics. In: *Peptides* (1995), 193–245
- [Mascres & Bonner 1976] MASCRES, C. ; BONNER, M.: Action of acetylsalicylic acid administered by different routes on the blood and buccal tissues of rats. In: *Rev. Can. Biol.* 35 (1976), 193–197
- [Mayo et al. 1990] MAYO, S. ; OLAFSON, B. ; GODDARD III, W.: A Generic Force Field for Molecular Simulations. In: *J. Chem. Phys.* 94 (1990), 8897
- [Meibohm & Derendorf 1997] MEIBOHM, B. ; DERENDORF, H.: Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. In: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 35 (1997), 401–413
- [Michell et al. 1994] MICHELL, J. B. ; NANDI, C. L. ; MCDONALD, I. K. ; THORNTON, J. M. ; PRICE, S. L.: Amino/aromatic interactions in proteins: Is the evidence stacked against hydrogen bonding? In: *J. Mol. Biol.* 239 (1994), 315–331
- [Miyazawa & Blout 1961] MIYAZAWA, T. ; BLOUT, E. R.: The infrared spectra of polypeptides in various conformations: Amide I and II bands. In: *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961), 712–719
- [Müller et al. 1994] MÜLLER, A. ; BUSKER, E. ; ENGEL, J. ; KUTSCHER, B. ; BERND, M. ; SCHALLY, A. V.: Structural investigation of Cetrorelix, a new potent and long-acting LH-RH antagonist. In: *Int. J. Pept. Protein Res.* 43 (1994), 264–270
- [Müller & Knaack] MÜLLER, A. ; KNAACK, M.: *Bericht zur Untersuchung der Salzbindung von Cetrorelix und Embonsäure mit der NMR-Spektroskopie.* – Interner Bericht der ASTA MEDICA, Bef. -Nr. 95/21227
- [Momany 1976a] MOMANY, F. A.: Conformational energy analysis of the molecule Luteinizing hormone-Releasing hormone. 1. Native decapeptide. In: *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976), 2990–2996

- [Momany 1976b] MOMANY, F. A.: Conformational energy analysis of the molecule Luteinizing hormone-Releasing hormone. 2. Tetrapeptide and decapeptide analogues. In: *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976), 2996–3000
- [Momany 1978] MOMANY, F. A.: Conformational analysis of the molecule Luteinizing hormone-Releasing hormone. 3. Analogue inhibitors and antagonists. In: *J. Med. Chem.* 21 (1978), 63–68
- [Momany et al. 1975] MOMANY, F. A. ; MCGUIRE, R. F. ; BURGESS, A. W. ; SCHERAGA, H. A.: Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interactions and intrinsic torsional potentials for the naturally occurring amino acids. In: *J. Phys. Chem.* 79 (1975), 2361–2381
- [Morgan et al. 1996] MORGAN, S. M. ; SUBR, V. ; ULBRICH, K. ; WOODLEY, J. F. ; DUNCAN, R.: Evaluation of n-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-peptide conjugates as potential oral vaccines. Studies on their degradation by isolated rat small intestinal peptidases and their uptake by adult rat small intestinal tissue in vitro. In: *Int. J. Pharm.* 128 (1996), 99–111
- [Murgas 1998] MURGAS, S.: *Wirkungsmodifizierung von Cetroreolis durch Komplexierung mit Polyaminosäuren und Carbonsäuren als mögliche Depotpräparate für die Tumorthherapie*. Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Technische Universität Dresden, Dissertation, 1998
- [Naumann et al. 1991] NAUMANN, W. ; BRAUN, K. ; LOSSE, G.: Dosisminderung von D-Phe6-GnRH bei der Ovulationsregulierung durch Komplexierung mit Polyglycin. In: *Pharmazie* 46 (1991), 795–797
- [Naumann et al.] NAUMANN, W. ; LOSSE, G. ; BRAUN, K.: Verfahren zur Herstellung von immobilisierten und aktivitätsstabilisierten Präparaten des Gonadotropin-Releasing-Hormons oder dessen Analoga mit Polyaminosäuren / DD 299265 A5. – Patent
- [Nestor et al. a] NESTOR, J. J. ; JONES, G. H. ; VICKERY, B. H.: Nonapeptide and decapeptide agonists of luteinizing hormone releasing hormone containing heterocyclic amino acid residues, methods for their preparation, pharmaceutical compounds containing them, and their pharmaceutical use / EP 0042753 A1, C 07 C 103/52 (1981). – Patent
- [Nestor et al. b] NESTOR, J. J. ; JONES, G. H. ; VICKERY, B. H.: Nonapeptide and decapeptide analogs of LHRH usefull as LHRH antagonists, methods of making them, and their pharmaceutical use / EP 0049628 A2, C 07 C 103/52 (1981). – Patent
- [Nestor & Vickery] NESTOR, J. J. ; VICKERY, B. H.: Nonapeptide and decapeptide analogs of LHRH as LHRH antagonists / EP 0049628 A2, C 07 C 103/52 (1981). – Patent
- [Nikiforovich 1994] NIKIFOROVICH, G. V.: ECEPP. In: *Int. J. Pept. Prot. Res.* 44 (1994), 513–531
- [Nishida et al. 1994] NISHIDA, K. ; KIDO, M. ; SASAKI, H. ; NAKAMURA, J.: Pharmacokinetic analysis of in vivo metabolism of amino acid or dipeptide conjugate of salicylic acid in rabbit intestinal microorganisms. In: *Pharm. Res.* 11 (1994), 160–174
- [Nuhn & Strecker 1974] NUHN, P. ; STRECKER, M.: Darstellung von Salicylsäure-Albumin- und -Globulin-Konjugaten. In: *Pharmazie* 29 (1974), 689–691

- [Okuyama & Ohuchi 1996] OKUYAMA, K. ; OHUCHI, S.: Recent structural studies of peptides in Japan. In: *Biopolymers* 40 (1996), 85–103
- [Olma et al. 1994] OLMA, A. ; NIKIFOROVICH, G. V. ; NOCK, B. ; MARSHALL, G. R.: *Chimeric amino acids in cyclic GnRH antagonists*. B. S. : Hodges, 1994 684–686
- [Paul et al. 1989] PAUL, P. K. ; DAUBER-OSGUTHORPE, P. ; CAMPBELL, M. M. ; OSGUTHORPE, D. J.: A novel b-turn location in an LHRH antagonist: a combined conformational search and molecular dynamics study. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165 (1989), 1051–1058
- [Pinski et al. 1996] PINSKI, J. ; LAMHARZI, N. ; HALMOS, G. ; GROOT, K. ; JUNGWIRTH, A. ; VADILLOBUENFIL, M. ; KAKAR, S. S. ; SCHALLY, A. V.: Chronic administration of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetrorelix decreases gonadotrope responsiveness and pituitary LHRH receptor messenger ribonucleic acid levels in rats. In: *Endocrinology* 137 (1996), 3430–3436
- [Pinski et al. 1992] PINSKI, J. ; YANO, T. ; GROOT, K. ; MILOVANOVIC, S. ; SCHALLY, A. V.: Comparison of biological effects of a sustained delivery system and nonencapsulated LH-RH antagonist SB-75 in rats. In: *Peptides* 13 (1992), 905–911
- [Rabenstein 2000] RABENSTEIN, B.: *Monte-Carlo-Methoden zur Simulation der Faltung und Titration von Proteinen*. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin, Dissertation, 2000
- [Rappe' et al. 1992] RAPPE', A. K. ; CASEWIT, C. J. ; COLWELL, K. S. ; GODDARD, W. A. ; SKIFF, W. M.: UFF, a Rule-Based Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. In: *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992), 10025
- [Rappe' & Goddard 1991] RAPPE', A. K. ; GODDARD, W. A.: Charge equilibration for molecular dynamics simulations. In: *J. Phys. Chem.* 95 (1991), 3358–3363
- [Rarey et al. 1997] RAREY, M. ; KRAMER, B. ; LENGAUER, T.: Multiple automatic base selection: Protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention. In: *J. Comp. Aid. Mol. Design* 11 (1997), 369–384
- [Rattei 1995] RATTEI, T.: *Beiträge zur Aufklärung der chemischen Natur von Cetrorelix-Polyaminosäure- bzw. Cetrorelix-Carbonsäurekomplexen sowie zu deren quantitativer Bestimmung mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie*, Technische Universität Dresden, Diplomarbeit, 1995
- [Reichel 2001] REICHEL, J.: *Intermolekulare Komplexierung durch Wasserstoffbrückenbindungen in Polymerblends - Einfluss des Lösungsmittels*, Technische Universität Clausthal, Diplomarbeit, 2001
- [Richardson 1981] RICHARDSON, J. S.: The anatomy and taxonomy of protein structure. In: *Advan. Protein Chem.* 34 (1981), 167–339
- [Rivier et al. 1988] RIVIER, J. E. ; KUPRYSZEWSKI, G. ; VARGA, J. ; PORTER, J. ; RIVIER, C. ; PERRIN, M. ; HAGLER, A. T. ; STRUTHERS, R. S. ; CORRIGAN, A. ; VALE, W.: Design of potent cyclic Gonadotropin Releasing hormone antagonists. In: *J. Med. Chem.* 31 (1988), 677–682

- [Rivier et al. 1990] RIVIER, J. E. ; RIVIER, C. ; VALE, W. ; KOERBER, S. C. ; CORRIGAN, A. ; PORTER, J. ; GIERASCH, L. M. ; HAGLER, A. T.: *Bicyclic gonadotropin releasing hormone (GnRH) antagonists*. La Jolla : ESCOM Science Publishers, 1990 33–37
- [Rivier et al. 1984] RIVIER, J. E. ; VARGA, J. ; PORTER, J. ; PERRIN, M. ; RIVIER, C. ; VALE, W. ; STRUTHERS, R. S. ; HAGLER, A. T.: *Design of cyclic GnRH analogs*. F. : Labrie, 1984 19–23
- [Rizo et al. 1992] RIZO, J. ; KOERBER, S. C. ; BIENSTOCK, R. J. ; RIVIER, J. E. ; HAGLER, A. T. ; GIERASCH, L. M.: Conformational analysis of a highly potent, constrained Gonadotropin-Releasing hormone antagonist. 2. Molecular dynamics simulation. In: *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992), 2860–2871
- [Roe & Kuntz 1995] ROE, D. C. ; KUNTZ, I. D.: BUILDER v2: improving the chemistry of a de novo design strategy. In: *J. Comput. Aid. Molec. Design* 9 (1995), 269–282
- [Sarver Jr. & Krueger 1991a] SARVER JR., R. W. ; KRUEGER, C. W.: An infrared and circular dichroism combined approach to the analysis of protein secondary structure. In: *Anal. Biochem.* 199 (1991), 61–67
- [Sarver Jr. & Krueger 1991b] SARVER JR., R. W. ; KRUEGER, C. W.: Protein secondary structure from fourier transform infrared spectroscopy: A data base analysis. In: *Anal. Biochem.* 194 (1991), 89–100
- [Schally et al. 1971] SCHALLY, A. V. ; KASTIN, A. J. ; ARIMURA, A.: Hypothalamic Follicle-stimulating hormone (FSH) and Luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies. In: *Fertil. Steril.* 22 (1971), 703
- [Schambach et al. 1986] SCHAMBACH, H. ; KNAPPE, G. ; CAROL, W.: *Hormontherapie in der Praxis*. Berlin : VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1986 346–352
- [Scheler 1989] SCHELER, W.: *Grundlagen der allgemeinen Pharmakologie*. 3. Aufl. Jena : VEB Gustav Fischer Verlag, 1989
- [Schmidt-Naake et al. 1998] SCHMIDT-NAAKE, G. ; DRACHE, M. ; LEONHARDT, K.: The influence of charge-transfer complexes on the copolymerization behavior of cyclic maleic acid derivatives with donor monomers. In: *Macromol. Chem. Phys.* 199 (1998), 353–361
- [Schrödinger 1999] SCHRÖDINGER, Inc.: *GB/SA Solvation*. MacroModel, Interactive Molecular Modeling System, Technical Manual, Version 7. 0, 1999
- [Schwabe 1975] SCHWABE, K.: *Physikalische Chemie, 1. Band*. 2. Aufl. Berlin : Akademie-Verlag, 1975
- [Schwetlick et al. 1982] SCHWETLICK, K. ; DUNKEN, H. ; PRETZSCHNER, G. ; SCHERZER, K. ; TILLER, H. -J.: *Chemische Kinetik*. Leipzig : VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1982
- [Sealfon & Millar 1995] SEALFON, S. C. ; MILLAR, R. P.: Functional domains of the gonadotropin-releasing hormone receptor. In: *Cell. Mol. Neurobiol.* 15 (1995), 25–42
- [Sepredi et al. 1978] SEPRODI, J. ; COY, D. H. ; VILCHEZ-MARTINEZ, J. A. ; PEDROZA, E. ; HUANG, W. -Y. ; SCHALLY, A. V.: Cyclic analogues of Luteinizing hormone-Releasing hormone with significant biological activities. In: *J. Med. Chem.* 21 (1978), 993–995

- [Smith & Regan 1995] SMITH, C. K. ; REGAN, L.: Guidelines for protein design: The energies of beta-sheet side chain interactions. In: *Science* 270 (1995), 980–982
- [Smith & Garry] SMITH, M. J. ; GARRY, M. C.: *Structural analysis of amino acids by FT-Raman and FT-IR spectroscopy*. – Information des Spectroscopy Research Center AN-8928, Nicolet Instrument Corporation, Madison, WI 53711
- [Steinberg 1971] STEINBERG, I. Z.: Long-range nonradiative transfer of electronic excitation energy in proteins and polypeptides. In: *Annu. Rev. Biochem.* 40 (1971), 83–114
- [Still et al. 1990] STILL, W. C. ; TEMPCZYK, A. ; HAWLEY, R. C. ; HENDRICKSON, T.: Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. In: *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990), 6127–6129
- [Stolnik et al. 1995] STOLNIK, S. ; ILLUM, L. ; DAVIS, S. S.: Long circulating microparticulate drug carriers. In: *Advan. Drug. Delivery Rev.* 16 (1995), 195–214
- [Struthers et al. 1990] STRUTHERS, R. S. ; TANAKA, G. ; KOERBER, S. C. ; SOLMAJER, T. ; BANIAK, E. L. ; GIERASCH, L. M. ; VALE, W. ; RIVIER, J. E. ; HAGLER, A. T.: Design of biologically active, conformationally constrained GnRH antagonists. In: *Proteins: Struct., Funct. Genet.* 8 (1990), 295–304
- [Swamy et al. 1996] SWAMY, M. J. ; HEIMBURG, T. ; MARSH, D.: Fourier-transform infrared spectroscopic studies on avidin secondary structure and complexation with biotin and biotin-lipid assemblies. In: *Biophys. J.* 71 (1996), 840–847
- [Thevenaz & Unser 1998] THEVENAZ, P. ; UNSER, M.: An efficient mutual information optimizer for multiresolution image registration. In: *Proceedings of the 1998 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP'98), Chicago IL, USA I* (1998), 833–837
- [Thornton et al. 1995] THORNTON, J. M. ; JONES, D. T. ; MACARTHUR, M. W. ; ORENGO, C. M. ; SWINDELLS, M. B.: Protein folds: towards understanding folding from inspection of native structures. In: *Philos. Trans. R Soc. Lond. [Biol.]* 1323 (1995), 71–79
- [Torchilin & Trubetskoy 1995] TORCHILIN, V. P. ; TRUBETSKOY, V. S.: Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? In: *Advan. Drug. Delivery Rev.* 2-3 (1995), 141–155
- [Torres et al. 1995] TORRES, J. ; SEPULCRE, F. ; PADROS, E.: Conformational changes in bacteriorhodopsin associated with protein-protein interactions: a functional alpha(i)-alpha(II) helix switch? In: *Biochemistry* 34 (1995), 16320–16326
- [Tracy 1998] TRACY, M. A.: Development and scale-up of a microsphere protein delivery system. In: *Biotechnol. Progr.* 14 (1998), 108–115
- [Ugarova et al. 1995] UGAROVA, T. ; AGBANYO, F. R. ; PLOW, E. F.: Conformational changes in adhesive proteins modulate their adhesive function. In: *Thromb. Haemost.* 74 (1995), 253–257
- [Vedani 1988] VEDANI, A.: YETI: An Interactive Molecular Mechanics Program for Small-Molecular Protein Complexes. In: *J. Comp. Chem.* 9 (1988), 269–280

- [Vijayan 1996] VIJAYAN, E.: Gonadotropin releasing hormone (GnRH): an overview. In: *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B* 66 (1996), 293–305
- [Visser 1992] VISSER, H.: *Protein interactions*. Weinheim, New York : VCH, 1992
- [Voet & Voet 1992] VOET, D. ; VOET, J. G.: *Biochemie*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge : VCH, 1992
- [Voigt 1993] VOIGT, R.: *Pharmazeutische Technologie*. Berlin : Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, 1993
- [Waszkowycz et al. 1994] WASZKOWYCZ, B. ; CLARK, D. E. ; FRENKEL, D. ; LI, J. ; MURRAY, C. W. ; ROBSON, B. ; WESTHEAD, D. R.: PRO-LIGAND An approach to de novo molecular design. 2. Design of novel molecules from molecular field analysis (MFA) models and pharmacophores. In: *J. Med. Chem.* 37 (1994), 3994–4002
- [Weber 1997] WEBER, T.: *Quantifizierung von Struktur-Eigenschafts-Beziehungen durch atomistische Monte-Carlo-Simulationen an Polymeren*, Technische Universität Clausthal, Diplomarbeit, 1997
- [Weiner & Kollman 1981] WEINER, P. K. ; KOLLMAN, P. A.: Assisted Model Building with Energy Refinement. A General Program for Modeling Molecules and Their Interactions. In: *J. Comput. Chem.* 2 (1981), 287
- [Wimley et al. 1998] WIMLEY, W. C. ; HRISTOVA, K. ; LADOKHIN, A. S. ; SILVESTRO, L. ; AXELSEN, P. H. ; WHITE, S. H.: Folding of beta-sheet membrane proteins: a hydrophobic hexapeptide model. In: *J. Mol. Biol.* 277 (1998), 1091–1110
- [Woody 1996] WOODY, R. W.: Theory of circular dichroism of proteins. In: *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (1996), 25–67
- [Xie et al. 1995] XIE, P. ; ZHOU, Q. ; DIEM, M.: IR circular dichroism of turns in small peptides. In: *Faraday Discuss.* (1995), 233–243
- [Yan et al. 1995] YAN, Y. ; ERICKSON, B. W. ; TROPSHA, A.: Free energies for folding and refolding of four types of beta-turns: Simulation of the role of D/L-chirality. In: *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995), 7592–7599
- [Yang et al. 1996] YANG, A. S. ; HITZ, B. ; HONIG, B.: Free energy determinants of secondary structure formation . 3. beta-turns and their role in protein folding. In: *J. Mol. Biol.* 259 (1996), 873–882
- [Yang et al. 1986] YANG, J. T. ; WU, C. -S. C. ; MARTINEZ, H. M.: Calculation of protein conformation from circular dichroism. In: *Methods. Enzymol.* 130 (1986), 208–269
- [You & Bashford 1995] YOU, T. ; BASHFORD, D.: An analytical algorithm for the rapid determination of the solvent accessibility of points in a three-dimensional lattice around a solute molecule. In: *J. Comp. Chem.* 16 (1995), 743–757
- [Young 2001] YOUNG, D. C.: *Computational Chemistry*. New York : John Wiley & Sons Inc., 2001
- [Zalipsky 1995] ZALIPSKY, S.: Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. In: *Advan. Drug. Delivery Rev.* 16 (1995), 157–182

- [Zauhar 1995] ZAUHAR, R. J.: SMART: A solvent-accessible triangulated surface generator for molecular graphics and boundary element applications. In: *J Computer-Aided Mol. Design* 9 (1995), 149–159

8 Abbildungsverzeichnis**Abbildungsverzeichnis**

1	Vereinfachter Wirkungsmechanismus von GnRH im menschlichen Organismus [Voet & Voet 1992]	10
2	Aminosäuresequenz von GnRH	12
3	Aminosäuresequenz von Cetrorelix	12
4	Indikationen und Anwendungsgebiete für den klinischen Einsatz von Cetrorelix (Quelle: ASTA MEDICA AG)	13
5	Vorgänge nach Applikation eines Pharmakons im Organismus [Scheler 1989]	14
6	Zusammenhänge zwischen Pharmakokinetik (PK) und Pharmakodynamik (PD) [Cawello & Antonucci 1997]	17
7	Schematische Darstellung der typischen Wechselwirkungen innerhalb und zwischen Peptiden und Proteinen [Visser 1992]	18
8	Raumstrukturen und Ramachandran-Plots der 4 häufigsten β -turns in einem Tetra-Gly-Fragment [Yang et al. 1996]	23
9	Dominierende Schwingungszustände im Rückgrat von Peptiden und Proteinen [Galla & Müller 1988]	25
10	Schematischer Aufbau von statischen und dynamischen Liberationssystemen	30
11	Dynamische Liberation von Cetrorelix-Acetat in Ammoniumacetat und Ringerlösung	31
12	Beispiele für Freisetzungstypen in dynamischen Liberationen	34
13	Schematische Darstellung des angewandten Modellierungsverfahrens für Peptidkomplexe (Details zur eingesetzten Rechentechnik und Software siehe S.56)	46
14	Visualisierung der spezifisch mit dem Komplexpartner wechselwirkenden Cetrorelix-Atome durch farbliche Kennzeichnung (Komplex Cetrorelix-Embonsäure im molaren Verhältnis 1:1), dargestellt mit MSI WebLabViewer	47
15	Als neue Komplexpartner ausgewählte aromatische Carbonsäuren	49
16	Als neue Komplexpartner ausgewählte Dipeptide	50
17	Spektrum von festem Cetrorelix-Acetat in KBr mit Diffuser Reflexion (DRIFT) als Gesamtspektrum	78
18	Fourier-Selbstentfaltung der Amid I- und II-Banden (FSD mit Parametern $K=2,2$ und $\lambda=20,2 \text{ cm}^{-1}$) des Spektrums von festem Cetrorelix-Acetat in KBr	79
19	Vergleich der Spektren von Cetrorelix-Acetat in KBr in Diffuser Reflexion (DRIFT) sowie rein in Abgeschwächter Totalreflexion (Diamant-HATR) als Gesamtspektren .	81
20	Vergleich der Spektren von Cetrorelix-Acetat fest und in 2,5 M wässriger Lösung in Abgeschwächter Totalreflexion (Aufnahme auf Diamant-HATR)	82

21	Raumstruktur des Asn-Asn-Asp-Gly-Konformers mit minimaler Konformationsenergie aus Random Sampling und MM3-Minimierung, gekennzeichnet ist die Asx-turn stabilisierende Wasserstoffbrücke vom CO der Asn _n -Seitenkette zu NH _{n+2} (a), die auch in Kristallstrukturen gefunden wurde [Marraud & Aubry 1996].	84
22	Raumstruktur der energetisch günstigsten, α -helikalen Konformation von Polyalanin (Dekamer) aus Random Sampling und MM3-Minimierung	85
23	Verteilung der Konformationsenergien (links) sowie Zusammenhang von Konformationsenergie und Gyrationradius (rechts) bei Cetrorelix-Konformeren aus Random-Sampling und MM3-Minimierung	87
24	Modell eines Cetrorelix-Konformers (Stabdarstellung) mit 0,6 nm dicker Solvathülle aus Wasser (Strichdarstellung)	87
25	Intermolekulare Stabilisierung einer geknäuelten (links) und gestreckten (rechts) Cetrorelix-Konformation in 0,6 nm-Solvathülle mit Wasser, berechnet mit EVOCAP	88
26	Absolute freie GB/SA-Hydratationsenthalpie des Cetrorelix-Konformationssets in Abhängigkeit vom Gyrationradius der Konformere	88
27	FTIR-Spektren einer 10 ⁻² M, wässrigen Cetrorelixlösung auf einem ZnSe-HATR-Kristall in zeitlicher Auflösung von Messbeginn bis zu 330 Stunden	89
28	FTIR-Spektren einer 10 ⁻⁴ M, wässrigen Cetrorelixlösung auf einem Diamant-HATR-Kristall in zeitlicher Auflösung von Messbeginn bis zu 17 Stunden	90
29	Strukturformel von Embonsäure (4,4'-Methylenbis-[3-hydroxynaphthalin-carbonsäure-(2)])	91
30	Freisetzungskinetik von Cetrorelix sowie Cetrorelix-Embonsäure-Komplexen verschiedener Stöchiometrie mit je 10 mg Cetrorelixgehalt	92
31	Sekundärstrukturanteile von Cetrorelix als Acetat (links) sowie im 1:2-Komplex mit Embonsäure (rechts)	93
32	Sekundärstrukturanteile von Cetrorelix in 1:1-Komplexen mit aliphatischen Carbonsäuren	93
33	Massenbruch des Embonates an Cetrorelix-Embonsäurekomplexen der Zusammensetzung 2:1 bis 1:4	94
34	Vergleich der FTIR-Spektren von Cetrorelix, Embonsäure und Ammoniumembonat	94
35	Vergleich der FTIR-Spektren von Cetrorelix-Embonsäure-Gemischen (oben) und -Komplexen (unten) im Bereich der Embonsäurebande bei 1290 cm ⁻¹	95
36	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-Embonsäure-Komplexes	98
37	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-Polyasparaginsäure-Komplexes	99
38	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-Polyglutaminsäure-Komplexes	100
39	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-Salicylsäure-Komplexes	106
40	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-Acetylsalicylsäure-Komplexes	107
41	Freisetzungskinetik des Cetrorelix- β -Hydroxynaphthoesäure-Komplexes	108

42	Freisetzungskinetik des Cetrorelix- β -Acetoxynaphthoesäure-Komplexes	109
43	Freisetzungskinetik von Cetrorelix-Salicylsäurekomplexen verschiedener Stöchiometrie	110
44	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Asp-Tyr)-Komplexes	112
45	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Asp-Phe-OMe)-Komplexes	113
46	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Asp-Gly)-Komplexes	114
47	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Arg-Glu)-Komplexes	115
48	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Glu-Ala)-Komplexes	116
49	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Asp-Val)-Komplexes	117
50	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Glu-Tyr)-Komplexes	118
51	Freisetzungskinetik des Cetrorelix-(Glu-Gly)-Komplexes	119
52	Ramachandran-Auftragung der Torsionswinkel ϕ/ψ [Rattei 1995] im Peptidrückgrat der 25 energetisch minimalen Konformere aus Random-Sampling und MM3-Minimierung von Polyalanin (links) und Cetrorelix (rechts)	121
53	Grad der Variation der Partialladungen in den Cetrorelix-Konformeren aus Random-Sampling und MM3-Minimierung, dargestellt als Färbungsintensität der Atome . . .	122
54	Darstellung ausgewählter Raumstrukturen von Cetrorelix mit verschiedenen Gyrationenradien, entnommen aus dem Cetrorelix-Konformationsset	123
55	Links: Charakteristische CD-Kurvenverläufe von Proteinen mit verschiedenen Sekundärstrukturen [Woody 1996, Yang et al. 1986], rechts: CD-Spektren von Cetrorelix in 10^{-3} M, wässriger Lösung zu Messbeginn sowie nach 28 Stunden	124
56	Durch Modellrechnungen ermittelte Polarität der Umgebung der Ringzentren 1, 2, 3, 4, 4a, 8a (links) und 5, 6, 7, 8, 8a, 4a (rechts) der Naphthylalanyl-Seitenkette in den verschiedenen Cetrorelix-Konformationen	125
57	Fluoreszenzspektren von Cetrorelix (Anregung) bei einer Emissionswellenlänge von 337 nm, 22°C, Lösung in 10mM NH_4Ac (pH=7,0) nach 1, 3, 24 Stunden [Lang 1998]	126
58	Temperaturabhängigkeit (links) und Zeitabhängigkeit (rechts) der Fluoreszenzintensität von Cetrorelix bei einer Emissionswellenlänge von 337 nm, Lösung in 10mM NH_4Ac (pH=7,0) [Lang 1998]	127
59	Vorschlag einer Modellstruktur eines Cetrorelixaggregates in ausgerichteter β -Faltblattkonformation, erstellt mit einem ausgewählten Konformer des Cetrorelix-Konformationssets	128
60	Vorschlag einer Modellstruktur eines Cetrorelixkomplexes mit Embonsäure (gelb eingefärbt) in geordneter Konformation des Peptides, zusammengestellt aus je einem ausgewählten Konformer der Cetrorelix- und Embonsäure-Konformationssets im molekularen Verhältnis 2:3	131
61	Gesamtwechselwirkung (links) und spezifische Wechselwirkungsenergien (rechts) von Cetrorelix im 1:1-Cluster mit Naphthalin sowie Embonsäure	132
62	Abhängigkeit der Cetrorelix-Wechselwirkungsenergien vom Gyrationenradius des Cetrorelixkonformers im 1:1-Cluster mit Naphthalin (links) sowie Embonsäure (rechts)	132

9 Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Aminosäuresequenzen von GnRH und ausgewählten GnRH-Analoga (dargestellt sind die gegenüber dem natürlichen GnRH veränderten Aminosäuren [von Angerer 1996, Kutscher et al. 1997]).	11
2	Überblick über wichtige Applikationsarten für Pharmaka [Scheler 1989]	15
3	Überblick über verbreitete PK/PD-Modelle für stationäre Systeme [Meibohm & Drendorf 1997, Cawello 1997]	17
4	Diederwinkel der häufigsten β -turns in einem Tetra-Gly-Fragment [Yang et al. 1996]	22
5	Abhängigkeit der Lage und Halbwertsbreite der Amid A-Bande in IR-Spektren von der Sekundärstruktur in Polyaminosäuren und Proteinen [Kristof 1979]	25
6	Lage der Amid I-Bandenmaxima und <i>Amid II-Bandenmaxima</i> in Abhängigkeit von der Sekundärstruktur nach GALLA [Galla & Müller 1988], MANTSCH [Mantsch 1991] und MIYAZAWA [Miyazawa & Blout 1961], Angaben in cm^{-1}	26
7	Schema der Sammlung und Quantifizierung der Fraktionen in dynamischen Liberationen	30
8	Freisetzungstypen in dynamischen Liberationen und Beispiele ihrer Parameter a , b und c ihrer kombinierten Zeitgesetze (t_{50} lässt sich für den kombinierten Freisetzungstyp nur mit numerischen Modellen ermitteln)	34
9	Konformationsenergien und Torsionswinkel ϕ/ψ des Peptid-Rückgrates [Rattei 1995] der 5 energetisch günstigsten Sekundärstrukturen von Polyalanin (Dekamer) aus Random Sampling und MM3-Minimierung	84
10	Komponenten der MM3-Kraftfeldenergien [Allinger et al. 1989] von 9167 Cetrorelixkonformationen aus Random-Sampling und MM3-Minimierung	86
11	Freisetzungparameter der dynamischen Liberationen von Cetrorelix-Embonsäure-Komplexen verschiedener Stöchiometrie in Ammoniumacetat und Ringerlösung . . .	91
12	Freisetzungparameter der dynamische Liberationen von Cetrorelix-Embonsäure- und Cetrorelix-Polyaminosäurekomplexen in Ammoniumacetat und Ringerlösung	101
13	Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelix und Aromaten, Carbonsäuren und Embonsäure in der Stöchiometrie 1:1	102
14	Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelix und Aromaten, Carbonsäuren und Embonsäure in der Stöchiometrie 1:2	103
15	Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelix und aromatischen Hydroxycarbonsäuren in der Stöchiometrie 1:1	104
16	Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelix und aromatischen Hydroxycarbonsäuren in der Stöchiometrie 1:2	104
17	Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelix und Dipeptiden in der Stöchiometrie 1:1	104

18	Wechselwirkungsenergien und GB/SA-Solvatationsenthalpien der Cluster von Cetrorelix und Dipeptiden in der Stöchiometrie 1:2	105
19	Freisetzungparameter der dynamischen Liberationen von Cetrorelix-Carbonsäurekomplexen in Ammoniumacetat und Ringerlösung	105
20	Freisetzungparameter der dynamische Liberationen von Cetrorelix-Salicylsäurekomplexen verschiedener Stöchiometrie in Ammoniumacetat und Ringerlösung	111
21	Freisetzungparameter der dynamische Liberationen von Cetrorelix-Dipeptidkomplexen in Ammoniumacetat und Ringerlösung	111
22	Zusammenstellung von Parametern und ihrem Einfluss auf die Aggregation von Cetrorelix [Lang 1998]	126

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliches

Name: Thomas Rattei
Geburtsdatum: 23. Mai 1969
Geburtsort: Dresden
Wohnsitz: Tassiloweg 2, 85399 Hallbergmoos

Schulischer Werdegang

1975-1985 Polytechnische Oberschule in Dresden
1985-1987 Berufsausbildung Laborant in Radebeul
1989-1990 Abitur an der TH Merseburg
1990-1995 Chemiestudium an der TU Dresden
Diplom am Institut für Biochemie zum Thema „Beiträge zur Aufklärung der chemischen Natur von Cetrorelix-Polyaminosäure- bzw. Cetrorelix-Carbonsäurekomplexen sowie zu deren quantitativer Bestimmung mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie“

Beruflicher Werdegang

1987-1989 Arzneimittelwerk Dresden:
Lehrkraft für den berufstheoretischen Unterricht sowie Wehrdienst in der NVA
1995-1999 Institut für Biochemie der TU Dresden:
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
1999-2001 RATTEI. EDV-Service:
Selbständige Tätigkeit als Geschäftsführer
seit 2001 Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik
am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TU München:
Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Zertifizierungen

letztmalig 2001 Microsoft Certified Systems Engineer (MCSE)

Wissenschaftliche Vorträge und Tagungsposter

Vortrag zum Nicolet users meeting, Offenbach, 1995 Erfahrungen bei der quantitativen Bestimmung von Peptidhormonkomplexen mit der FTIR-Spektroskopie
Vortrag zum Nicolet users meeting, Offenbach, 1996 Erfahrungen beim Einsatz von Diamant-HATR-Technik und PLS-Quantifizierungsmethoden
Poster zum 3. Deutsches Peptidkolloquium, Konstanz, 1997 T. Rattei, W. Naumann, K.-H. van Peé, M. Drache, W. Deger: Untersuchungen zu Struktur und Zusammensetzung von Peptidhormonkomplexen
Poster zum Workshop „Peptide Modification by Non-Natural Amino Acids“, Leipzig, 1997 T. Rattei, W. Naumann, K.-H. van Peé, M. Drache, W. Deger: Untersuchungen zu Struktur und Zusammensetzung von Peptidhormonkomplexen
Poster zur GDCh-Jahrestagung, Würzburg, 2001 A. Lang, W. Naumann, T. Rattei, K.-H. van Peé, M. Drache: Screening von Peptid-Komplexen mit atomistischen Monte-Carlo-Simulationen

Erklärung

Die vorliegende Dissertation und die darin vorgestellten theoretischen und praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biochemie der Technischen Universität Dresden unter Betreuung von Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée und Dr. Wolfgang Naumann angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher noch keinerlei Promotionsgesuche eingereicht habe.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden erkenne ich hiermit an.