





**CHARAKTERISIERUNG, METABOLISMUS  
UND INTERAKTIONSPOTENTIAL  
ZYTOSTATISCH WIRKSAMER  
6-AMINO BENZO[C]PHENANTHRIDINE**



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Inga Zebothsen**

Kiel 2005

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

HD Dr. T. Kunze

Tag der mündlichen Prüfungen:

12. Juli 2005

Zum Druck genehmigt:

Kiel, 13. Juli 2005

Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer  
(Dekan)

*Für meine Großmutter, die sich sehr mit mir über den Abschluss dieser Arbeit gefreut hätte.*

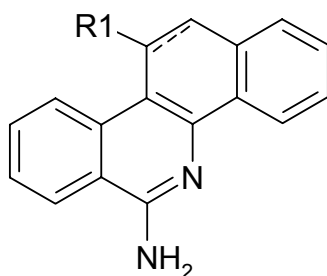


## Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
BCA	Bicinchonic acid (= 2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products
CYP	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzochinon
DDT	Dithiothreitol
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMPU	1,3-Dimethylhexahydropyrimidin-2-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Fluoreszenz-Emissionswellenlänge
EMA	The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ESI	Elektrosprayionisation
Ex	Fluoreszenz-Anregungswellenlänge
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Flavinmononukleotid
GI <sub>50</sub>	Growth Inhibition 50 %
HLM	Humane Lebermikrosomen
HLMt	Humane Lebermitochondrien
HPLC (LC)	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IC <sub>50</sub>	Inhibitor concentration 50%
k'	Retentionskoeffizient
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
log D-Wert	Oktanol/Phosphatpuffer-Verteilungskoeffizient

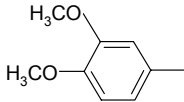
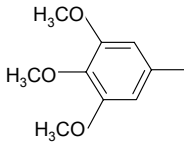
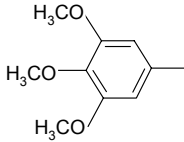
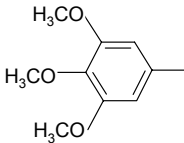
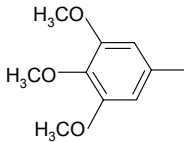
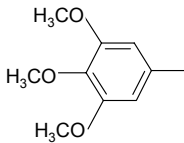
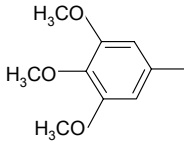
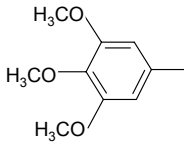
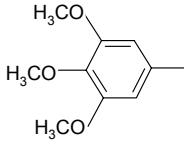
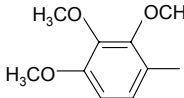
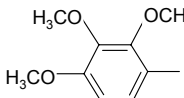
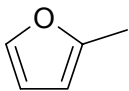
log P-Wert	Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
MG_MID	meangraph midpoint
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NCI	National Cancer Institute (Bethesda, Maryland, USA)
NMR	Kernresonanzspektroskopie
P450	Cytochrom P450
R <sup>2</sup>	Relativer Korrelationskoeffizient
SLM	Porcine Lebermikrosomen
SLMt	Porcine Lebermitochondrien
SOD	Superoxiddismutase
SPP	Sörensen-Phosphat-Puffer
Th	Thomson (m/z)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V <sub>max</sub>	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit

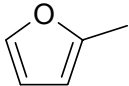
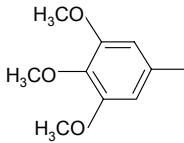
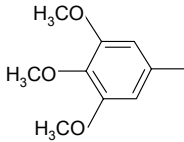
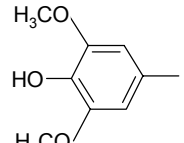
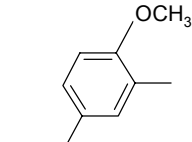
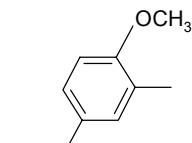
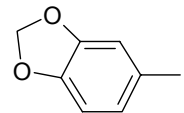
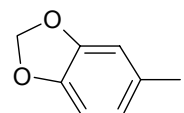
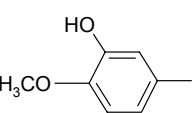
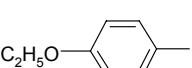
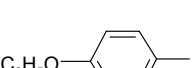
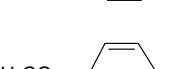


Strukturformeln der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridin-Derivate

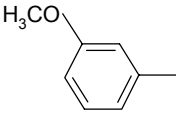
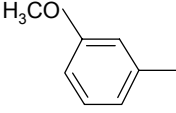
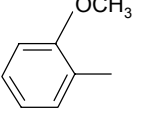
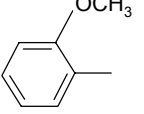
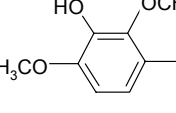
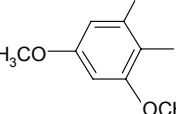
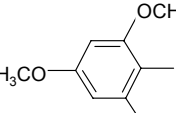
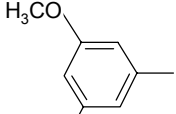
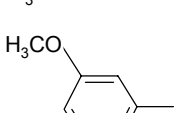
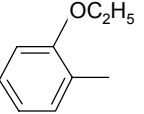
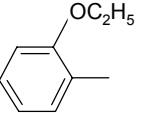
Code	Substituent in 11-Position R1	Name
<b>BP-1</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-phenylbenzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D1</b>		6-Amino-11-phenylbenzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-2</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-methoxyphenyl)benzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D2</b>		6-Amino-11-(4'-methoxyphenyl)benzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-3</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2',4'-dimethoxyphenyl)benzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D3</b>		6-Amino-11-(2',4'-dimethoxyphenyl)benzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-4</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-dimethylaminophenyl)benzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumdichlorid
<b>BP-D4</b>		6-Amino-11-(4'-dimethylaminophenyl)benzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-5</b>	-H	6-Amino-11,12-dihydrobenzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D5</b>	-H	6-Amino-benzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-6</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(3',4'-dimethoxyphenyl)benzo[ <i>c</i> ]phenanthridiniumchlorid

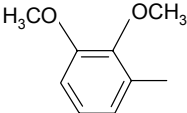
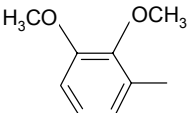
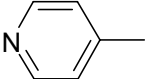
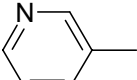
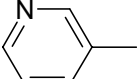
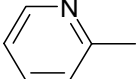
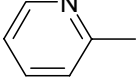
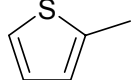
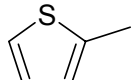
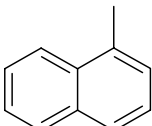
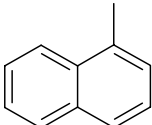
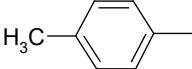
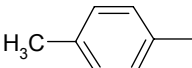
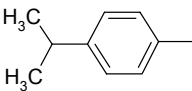
# Strukturformelverzeichnis

<b>BP-D6</b>		6-Amino-11-(3',4'-dimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-7</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D7</b>		6-Amino-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-NHOH7</b>		6-( <i>N</i> -Hydroxy)-amino-11,12-dihydro-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl) benzo[c]phenanthridin
<b>BP-DNHOH7</b>		6-( <i>N</i> -Hydroxy)-amino-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)benzo[c]phenanthridin
<b>BP-CI7</b>		6-Chlor-11,12-dihydro-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)benzo[c]phenanthridin
<b>BP-DCI7</b>		6-Chlor-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridin
<b>BP-O7</b>		5,6,11,12-Tetrahydro-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridin-6-on
<b>BP-DO7</b>		5,6-Dihydro-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridin-6-on
<b>BP-8</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D8</b>		6-Amino-11-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-9</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2'-furyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid

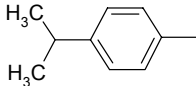
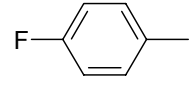
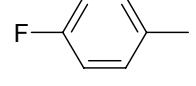
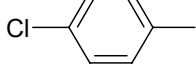
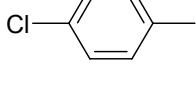
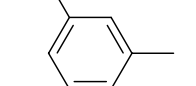
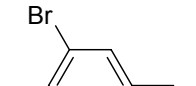
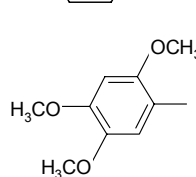
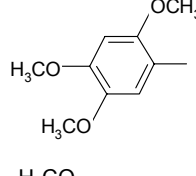
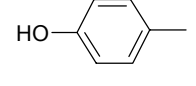
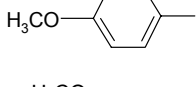
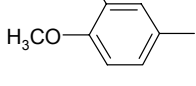
<b>BP-D9</b>		6-Amino-11-(2'-furyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-10</b>		6-Amino-11,12-dihydro-2,9-dimethoxy-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl) benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D10</b>		6-Amino-2,9-dimethoxy-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-11</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-hydroxy-3',5'-dimethoxyphenyl) benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-12</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2',5'-dimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D12</b>		6-Amino-11-(2',5'-dimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-13</b>	-H	6-Amino-11,12-dihydro-2,9-dimethoxy-benzo[c]phenanthridinium-chlorid
<b>BP-14</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D14</b>		6-Amino-11-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-15</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl) benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-16</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-ethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D16</b>		6-Amino-11-(4'-ethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-17</b>		6-Amino-11,12-dihydro-2,3,8,9-tetramethoxy-11-(4'-methoxyphenyl) benzo[c]phenanthridiniumchlorid

# Strukturformelverzeichnis

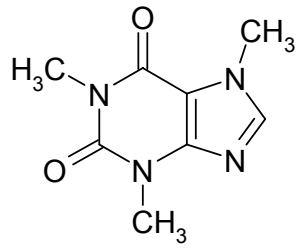
<b>BP-18</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(3'-methoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D18</b>		6-Amino-11-(3'-methoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-19</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2'-methoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D19</b>		6-Amino-11-(2'-methoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-20</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(3'-hydroxy-2',4'-dimethoxyphenyl) benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-21</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2',4',6'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D21</b>		6-Amino-11-(2',4',6'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-22</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(3',5'-dimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D22</b>		6-Amino-11-(3',5'-dimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-23</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2'-ethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D23</b>		6-Amino-11-(2'-ethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat

<b>BP-24</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2',3'-dimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D24</b>		6-Amino-11-(2',3'-dimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-25</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-pyridyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-26</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(3'-pyridyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D26</b>		6-Amino-11-(3'-pyridyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-27</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2'-pyridyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D27</b>		6-Amino-11-(2'-pyridyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-28</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2'-thienyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D28</b>		6-Amino-11-(2'-thienyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-29</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-naphthyl-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D29</b>		6-Amino-11-naphthyl-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-30</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-methylphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D30</b>		6-Amino-11-(4'-methylphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-31</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-isopropylphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid

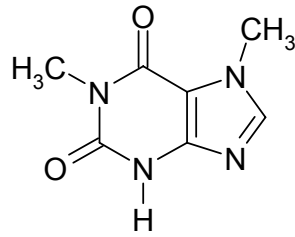
# Strukturformelverzeichnis

<b>BP-D31</b>		6-Amino-11-(4'-isopropylphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-32</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-fluorophenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D32</b>		6-Amino-11-(4'-fluorophenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-33</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-chlorophenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D33</b>		6-Amino-11-(4'-chlorophenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-34</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(3'-bromphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D34</b>		6-Amino-11-(3'-bromphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-35</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-D35</b>		6-Amino-11-(2',4',5'-trimethoxyphenyl)-benzo[c]phenanthridiniumperchlorat
<b>BP-36</b>		6-Amino-11,12-dihydro-11-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl) benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-37</b>		6-Amino-11,12-dihydro-2,9-dimethoxy-11-(4'-methoxyphenyl) benzo[c]phenanthridiniumchlorid
<b>BP-38</b>		6-Amino-11,12-dihydro-2,9-dimethoxy-11-(3',4'-dimethoxyphenyl) benzo[c]phenanthridiniumchlorid

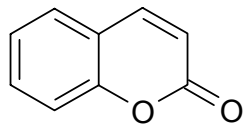
**Strukturformeln häufig zitierte Verbindungen**



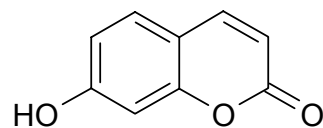
Coffein



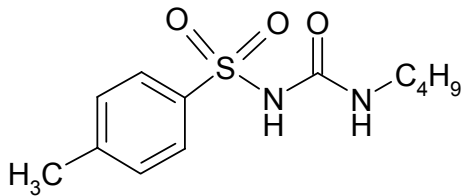
1,7-Dimethylxanthin  
(Demethylcoffein)



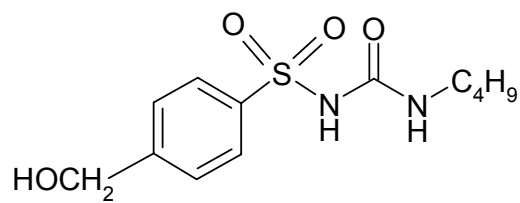
Cumarin



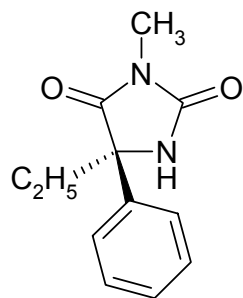
7-Hydroxycumarin



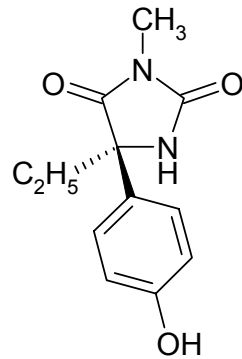
Tolbutamid



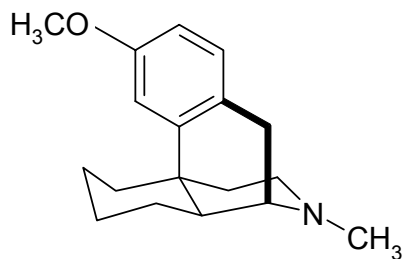
Hydroxytolbutamid



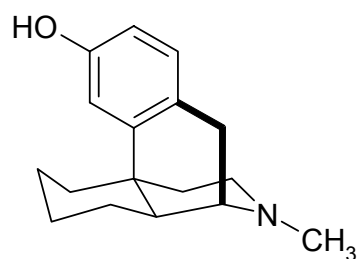
S-Mephennytoin



4'-Hydroxymephennytoin



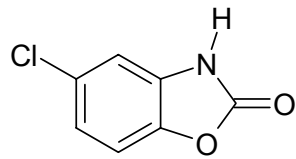
Dextromethorphan



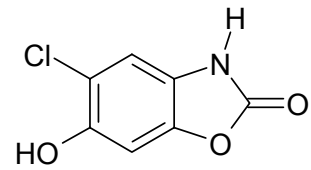
Dextrorphan

# Strukturformelverzeichnis

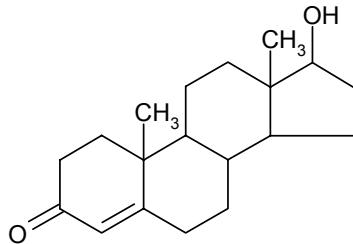
---



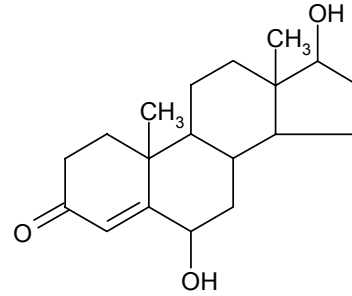
Chlorzoxazon



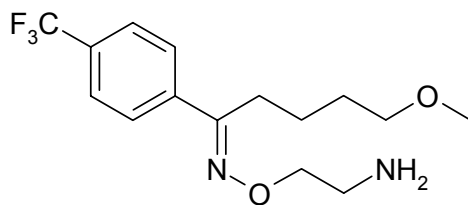
6-Hydroxychlorzoxazon



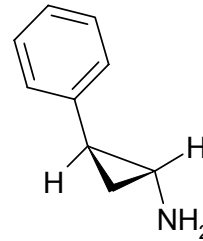
Testosteron



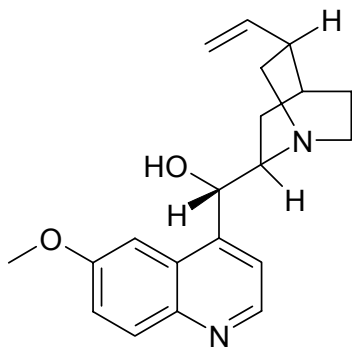
6β-Hydroxytestosteron



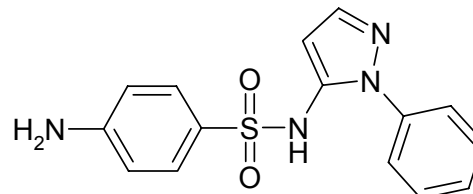
Fluvoxamin



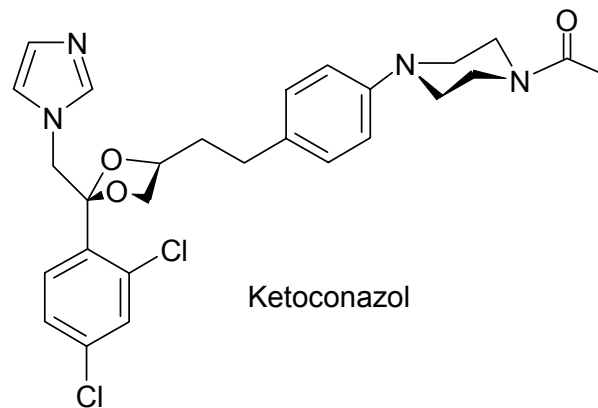
Tranylcypromin



Chinidin



Sulfaphenazol



Ketoconazol



---

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
1.1	Therapie maligner Erkrankungen	1
1.2	Benzo[ <i>c</i> ]phenanthridine	5
1.2.1	Naturstoffe	5
1.2.2	6-Aminobenzo[ <i>c</i> ]phenanthridine	6
1.3	Präklinische Untersuchungen	10
1.3.1	Biotransformation	10
1.3.1.1	Cytochrom P450-Enzyme	12
1.3.1.2	Metabolismusstudien	17
1.3.2	Interaktion	18
1.3.3	Physikochemische Charakterisierung	21
1.4	Zielsetzung	22
<b>2</b>	<b>Physikochemische Charakterisierung der 6-Aminobenzo[<i>c</i>]-phenanthridine</b>	<b>25</b>
2.1	Einleitung und Zielsetzung	25
2.2	Material und Methoden	26
2.2.1	Löslichkeit	26
2.2.1.1	Material und Geräte	26
2.2.1.2	Löslichkeit unter Zusatz von organischen Lösungsmitteln	27
2.2.1.3	Bestimmung der Löslichkeit in wässrigen Medien durch HPLC	27
2.2.2	pKa-Bestimmung	29
2.2.2.1	Material und Geräte	29
2.2.2.2	Photometrische Bestimmung	30
2.2.2.3	Bestimmung durch HPLC	30
2.2.3	Lipophilie	31
2.2.3.1	Material und Geräte	31
2.2.3.2	Bestimmung durch HPLC	32

2.3	Ergebnisse und Diskussion	33
2.3.1	Löslichkeit	33
2.3.1.1	Löslichkeit unter Verwendung von Cosolventien	33
2.3.1.2	Sättigungslöslichkeit in wässrigen Medien	34
2.3.2	Bestimmung der pKa-Werte	36
2.3.3	Lipophilie	41
2.4	Zusammenfassung und Ausblick	45
<b>3</b>	<b><i>In Vitro</i>-Interaktionsscreening</b>	<b>49</b>
3.1	Einleitung und Zielsetzung	49
3.2	Material und Methoden	50
3.2.1	Humane Lebermikrosomen	50
3.2.1.1	Material und Geräte	50
3.2.1.2	Gewinnung der Mikrosomenfraktionen durch fraktionierte Ultrazentrifugation	51
3.2.1.3	Charakterisierung der Mikrosomenfraktionen	52
3.2.1.3.1	Bestimmung des Proteingehalts	52
3.2.1.3.2	Bestimmung des Cytochrom P450 Gehalts	53
3.2.2	CYP1A2 Coffein- $\beta$ -Demethylierung	54
3.2.2.1	Material und Geräte	54
3.2.2.2	<i>In vitro</i> -Biotransformationsansätze	54
3.2.2.3	HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze	55
3.2.3	CYP2A6 Cumarin-7-Hydroxylierung	57
3.2.3.1	Material und Geräte	57
3.2.3.2	<i>In vitro</i> -Biotransformationsansätze	57
3.2.3.3	HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze	58
3.2.4	CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung	59
3.2.4.1	Material und Geräte	59
3.2.4.2	<i>In vitro</i> -Biotransformationsansätze	59

---

3.2.4.3	HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze	60
3.2.5	CYP2C19 S-Mephenytoin-4'-Hydroxylierung	61
3.2.5.1	Material und Geräte	61
3.2.5.2	<i>In vitro</i> -Biotransformationsansätze	62
3.2.5.3	HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze	62
3.2.6	CYP2D6 Dextromethorphan-O-Desalkylierung	64
3.2.6.1	Material und Geräte	64
3.2.6.2	<i>In vitro</i> -Biotransformationsansätze	64
3.2.6.3	HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze	65
3.2.7	CYP2E1 Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung	66
3.2.7.1	Material und Geräte	66
3.2.7.2	<i>In vitro</i> -Biotransformationsansätze	67
3.2.7.3	HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze	67
3.2.8	CYP3A4 Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung	69
3.2.8.1	Material und Geräte	69
3.2.8.2	<i>In vitro</i> -Biotransformationsansätze	69
3.2.8.3	HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze	70
3.3	Ergebnisse und Diskussion	71
3.3.1	Charakteristika der humanen Lebermikrosomen	73
3.3.1.1	Proteingehalt	73
3.3.1.2	Spezifischer Cytochrom P450 Gehalt	73
3.3.2	CYP1A2 Coffein-N $\beta$ -Demethylierung	73
3.3.2.1	Kalibrierung und Wiederfindung	73
3.3.2.2	<i>In vitro</i> -Biotransformation unter Benzo[ <i>c</i> ]phenanthridinzusatz	74
3.3.3	CYP2A6 Cumarin-7-Hydroxylierung	76
3.3.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung	76
3.3.3.2	<i>In vitro</i> -Biotransformation unter Benzo[ <i>c</i> ]phenanthridinzusatz	77
3.3.4	CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung	79
3.3.4.1	Kalibrierung und Wiederfindung	79
3.3.4.2	<i>In vitro</i> -Biotransformation unter Benzo[ <i>c</i> ]phenanthridinzusatz	80
3.3.5	CYP2C19 S-Mephenytoin-4'-Hydroxylierung	81

3.3.5.1	Kalibrierung und Wiederfindung	81
3.3.5.2	<i>In vitro</i> -Biotransformation unter Benzo[ <i>c</i> ]phenanthridinzusatz	82
3.3.6	CYP2D6 Dextromethorphan- <i>O</i> -Desalkylierung	84
3.3.6.1	Kalibrierung und Wiederfindung	84
3.3.6.2	<i>In vitro</i> -Biotransformation unter Benzo[ <i>c</i> ]phenanthridinzusatz	85
3.3.7	CYP2E1 Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung	87
3.3.7.1	Kalibrierung und Wiederfindung	87
3.3.7.2	<i>In vitro</i> -Biotransformation unter Benzo[ <i>c</i> ]phenanthridinzusatz	88
3.3.8	CYP3A4 Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung	90
3.3.8.1	Kalibrierung und Wiederfindung	90
3.3.8.2	<i>In vitro</i> -Biotransformation unter Benzo[ <i>c</i> ]phenanthridinzusatz	91
3.4	Zusammenfassung	93
<b>4</b>	<b>Charakterisierung der CYP450-Inhibition</b>	<b>95</b>
4.1	Einleitung und Zielsetzung	95
4.2	Material und Methoden	95
4.2.1	CYP1A2 Coffein- <i>N</i> $\beta$ -Demethylierung	95
4.2.2	CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung	96
4.2.3	CYP2D6 Dextromethorphan- <i>O</i> -Desalkylierung	96
4.2.4	CYP3A4 Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung	97
4.3	Ergebnisse und Diskussion	98
4.3.1	Bestimmung der $K_M$ - und $V_{max}$ -Werte	98
4.3.2	Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte	101
4.3.3	Charakterisierung der Inhibition	104
4.3.3.1	CYP1A2 Coffein- <i>N</i> $\beta$ -Demethylierung	104
4.3.3.2	CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung	107
4.3.3.3	CYP2D6 Dextromethorphan- <i>O</i> -Desalkylierung	109
4.3.3.4	CYP3A4 Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung	111
4.4	Zusammenfassung	115

---

<b>5</b>	<b>Synthese verwendeter Verbindungen</b>	<b>117</b>
5.1	Einleitung und Zielsetzung	117
5.2	Material und Methoden	117
5.2.1	Material und Geräte	117
5.2.2	Synthese von 6- <i>N</i> -Hydroxy-BP-7	118
5.2.3	Synthese von 6- <i>N</i> -Hydroxy-BP-D7	119
5.3	Ergebnisse und Diskussion	121
5.3.1	Synthese von 6- <i>N</i> -Hydroxy-BP-7	121
5.3.2	Synthese von 6- <i>N</i> -Hydroxy-BP-D7	122
5.4	Zusammenfassung	123
<b>6</b>	<b><i>In vitro</i>-Metabolismus ausgewählter 6-Aminobenzo[<i>c</i>]-phenanthridine</b>	<b>124</b>
6.1	Einleitung und Zielsetzung	124
6.2	Material und Methoden	125
6.2.1	Enzymquellen	125
6.2.1.1	Material und Geräte	125
6.2.1.2	Porcine Lebermikrosomen	125
6.2.1.3	Humane Lebermikrosomen	126
6.2.1.4	Porcine Lebermitochondrien	126
6.2.1.5	Humane Lebermitochondrien	127
6.2.1.6	Humane Cytochrom P450-Isoenzyme	127
6.2.1.7	Charakterisierung der humanen und porcinen Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen	127
6.2.1.7.1	Bestimmung des Proteingehalts	127
6.2.1.7.2	Bestimmung des Cytochrom P450 Gehalts	128
6.2.2	Inkubationsbedingungen	128
6.2.2.1	Material und Geräte	128

6.2.2.2	Ansätze für die enzymatische Dehydrierung von BP-7	129
6.2.2.3	Ansätze für die Reduktion von 6- <i>N</i> -Hydroxy-BP-D7 zu BP-D7	129
6.2.2.4	Ansätze zur Strukturaufklärung der Metaboliten durch LC-MS	130
6.2.2.5	Ansätze mit rekombinanten humanen CYP450-Isoenzymen	130
6.2.2.6	Ansätze unter Zusatz von Superoxiddismutase und Katalase	131
6.2.2.7	Ansätze für die präparative LC-MS-Trennung zur Strukturaufklärung von BP-7-Metaboliten	131
6.2.3	Analytik	132
6.2.3.1	Material und Geräte	132
6.2.3.2	Auswertung der enzymatischen Dehydrierung von BP-7	132
6.2.3.3	Reduktion von 6- <i>N</i> -Hydroxy-BP-D7 zu BP-D7	134
6.2.3.4	LC-MS-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze	135
6.2.3.5	LC-MS-analytische Suche nach den 6-Oxo- bzw. 6- <i>N</i> -Hydroxy-Derivaten	136
6.2.3.6	Präparative LC-MS-Trennung für die Strukturaufklärung von BP-7-Metaboliten	137
6.3	Ergebnisse und Diskussion	138
6.3.1	Charakteristika der Enzymquellen	138
6.3.1.1	Proteingehalt	138
6.3.1.2	Spezifischer Cytochrom P450 Gehalt	138
6.3.2	Enzymatische Dehydrierung von BP-7	138
6.3.3	Reduktion von 6- <i>N</i> -Hydroxy-BP-D7 zu BP-D7	141
6.3.4	Strukturaufklärung der Metaboliten durch LC-MS-Analytik	144
6.3.4.1	MS-Fragmentierung der 6-Aminobenzo[ <i>c</i> ]phenanthridine	145
6.3.4.2	Demethylierte Metaboliten	148
6.3.4.3	Metaboliten durch aromatische Hydroxylierung im Ringgerüst	150
6.3.4.4	Metaboliten durch aliphatische Hydroxylierung	151
6.3.4.5	Zweifache aromatische Hydroxylierung im Ringgerüst	155
6.3.4.6	Biotransformation durch Oxidation der 6-Aminofunktion	158
6.3.4.7	6-Oxo-Derivate als potentielle Metaboliten	162

---

6.3.5	Metaboliten nach Inkubation mit rekombinanten humanen CYP450-Isoenzymen	163
6.3.6	Einfluss von Superoxiddismutase und Katalase	165
6.3.7	Präparative LC-MS-Analytik und NMR-Spektroskopie des isolierten Metaboliten von BP-7	166
6.4	Zusammenfassung und Ausblick	166
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>169</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>173</b>





# 1 EINFÜHRUNG

## 1.1 Therapie maligner Erkrankungen

In den Industrienationen stellen Tumorerkrankungen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Jährlich erkranken in Deutschland rund 395.000 Menschen neu an Krebs. Dabei bilden bei Frauen Mammakarzinome (24,4%) und bei Männern Prostatakarzinome (20,3%) die häufigsten Erkrankungsarten. Im Jahr 2000 starben in Deutschland rund 210.000 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung. Da die Inzidenz von Tumorerkrankungen mit höherem Lebensalter zunimmt, ist durch den generellen Anstieg der Lebenserwartung mit einer weiteren Vergrößerung der Fallzahlen in den nächsten Jahren zu rechnen. Daraus resultiert die Bedeutung der Entwicklung neuer Ansätze zur Therapie von Tumorerkrankungen, da trotz neuer Therapien und Substanzen der letzten Jahre die relative 5-Jahres-Überlebensrate bis jetzt nur etwa 50% beträgt [Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland; Bertz *et al.*, 2004].

Wichtige Therapieprinzipien sind neben der Chemotherapie durch Anwendung von Zytostatika die chirurgische Exzision, vor allem bei klar abgegrenzten Tumoren sowie die lokal begrenzte Bestrahlung bei eher diffusen Tumoren [Kojda, 1997]. Die Behandlung mit Zytostatika kann zusätzlich zu den vorgenannten Therapieprinzipien erfolgen (adjuvante Chemotherapie) oder die alleinige Therapieform darstellen. Bei einer Behandlung, die die vollständige Heilung zum Ziel hat, spricht man von kurativer Chemotherapie. Häufig kann durch die Chemotherapie aber nur eine Linderung tumorbedingter Symptome und eine begrenzte Lebenszeitverlängerung erreicht werden (palliative Chemotherapie) [Forth *et al.*, 2001 b].

Maligne Tumore sind durch unkontrolliertes Wachstum gekennzeichnet, wobei die Erhöhung der Zellzahl durch ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Zellreplikation und Apoptose hervorgerufen wird. Ansätze für die Therapie sind daher die Hemmung des Wachstums der Krebszellen oder ihre Abtötung. Die meisten bisherigen Zytostatika schädigen allerdings nicht nur Tumorzellen sondern alle schnell proliferierenden

Zellen. Besonders starke Nebenwirkungen haben Zytostatika daher an Geweben mit hoher physiologischer Proliferationsrate. Infolge der Schädigung dieser Gewebe kommt es zu Defiziten im blutbildenden System mit Leuko- und Thrombopenien, woraus eine Schwächung des Immunsystems und eine erhöhte Blutungsneigung resultiert. Auch eine Anämie durch Beeinträchtigung der Erythrozytenproduktion kann auftreten. Ebenfalls betroffen sind die Schleimhäute des Gastro-Intestinaltrakts mit Symptomen wie Erbrechen, Durchfall und Mukositis der Mundhöhle. Haarausfall ist ein weiteres häufiges Symptom [Mutschler *et al.*, 2001 b]. Da normalerweise die Regenerationszeit des Tumorgewebes gegenüber gesundem Gewebe erhöht ist, kann durch Anwendung einer intermittierenden Therapie die Erholung des Knochenmarks in den Therapiepausen gewährleistet werden. Die Behandlung mit Zytostatika erfolgt meist in Form einer Kombinationstherapie, um die Resistenzentwicklung der Tumorzellen zu verzögern und eine synergistische Wirkungssteigerung ohne Erhöhung der Toxizität zu erreichen [Mutschler *et al.*, 2001 b].

Die Einteilung der Zytostatika erfolgt meist nach ihrem Wirkmechanismus. Zytostatika können in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus angreifen, wobei einige Wirkstoffgruppen wie die Mitosehemmstoffe, Antimetaboliten und Topoisomerasehemmstoffe nur in einer Phase des Zyklus wirken, wogegen Alkylantien und Antibiotika eine phasenunspezifische Wirksamkeit zeigen. Zur Anwendung kommen außerdem Hormone und in zunehmendem Maße neuartige Substanzen wie Antikörper. Antisense-Oligonukleotide werden zur Zeit intensiv beforscht [Mutschler *et al.*, 2001 b].

Mitosehemmstoffe bewirken eine Hemmung des Zellzyklus durch Störung der Spindelbildung. Dabei kann entweder der Aufbau des Spindelapparates durch Bindung an das Tubulin gehemmt oder der Abbau blockiert werden. Zur ersten Gruppe, die den korrekten Ablauf der Mitose verhindern, gehören z.B. das Colchicin und die Vinca-Alkaloide Vinblastin, Vincristin und Vindesin. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite des Colchicins können aber nur die Vinca-Alkaloide als Zytostatika eingesetzt werden. Dagegen hemmen die Taxane den Abbau der

Mikrotubuli und bewirken damit eine Arretierung des Zellzyklus, wodurch die Zellen schließlich absterben [Mutschler *et al.*, 2001 b].

Antimetaboliten verdrängen natürliche Stoffwechselbausteine und führen zur Bildung von funktionsuntüchtigen Makromolekülen oder blockieren Enzyme durch Komplexbildung, wodurch Stoffwechsel und Zellteilung gestört werden. Vertreter dieser Gruppe ist zum einen das Methotrexat als Folsäureantagonist und zum anderen Purin- und Pyrimidin-Basen-Antagonisten wie Fludarabin, Mercaptopurin, Fluorouracil und Cytarabin. Während Methotrexat durch Störung der Nukleinsäuresynthese wirkt, können die Nukleinbasenantagonisten die DNA-Synthese hemmen oder nach Einbau in die DNA die korrekte Proteinbiosynthese inhibieren. Obwohl die Antimetaboliten durch ihren Wirkmechanismus eine unspezifische Wirkung mit hohem Nebenwirkungsrisiko besitzen, werden sie bei vielen verschiedenen Tumorerkrankungen eingesetzt [Mutschler *et al.*, 2001 b].

Topoisomerasen kontrollieren die Topologie der DNA und sind essentiell bei Reaktionen, bei denen sich die DNA-Helix-Windungen ändern und Verdrillungen wie bei der Transkription und der Rekombination auftreten. Beim Menschen sind zwei Enzymsysteme, die Topoisomerase I (Einzelstrangbruch) und II (Doppelstrangbruch) bekannt, die als reversible Nukleasen das Öffnen und Schließen von DNA-Strängen katalysieren. Die Hemmung der Topoisomerasen bewirkt durch die Stabilisierung des Enzym-DNA-Komplexes Strangbrüche der DNA und damit die Induktion der Apoptose. Als Zytostatika verwendet werden die Topoisomerase-I-Inhibitoren Topotecan und Irinotecan, die Derivate des Camptothecins darstellen, eines Naturstoffes, der selbst aufgrund hoher Toxizität nicht als Therapeutikum eingesetzt werden kann. Außerdem finden die Derivate des Podophyllotoxins Etoposid und Teniposid als Topoisomerase-II-Inhibitoren Anwendung bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen [Forth *et al.*, 2001 b].

Die phasenunspezifische Wirkung der Alkylantien beruht auf der Alkylierung von Zellbestandteilen. Nach Bildung hochreaktiver, intermediärer Metaboliten (z.B.

Carbeniumionen) reagieren diese Stoffe unter Bildung kovalenter Bindungen mit elektronenreichen Verbindungen. Außer Proteinen werden vor allem Nukleotidbasen wie Guanin angegriffen, was zu multiplen DNA-Veränderungen führt. Dadurch wird die DNA-Replikation und damit die Zellteilung beeinträchtigt. Zur Gruppe dieser Verbindungen gehören u.a. die Stickstofflost-Derivate, die *N*-Nitrosoharnstoff-derivate und die Platinkomplexe [Kojda, 1997].

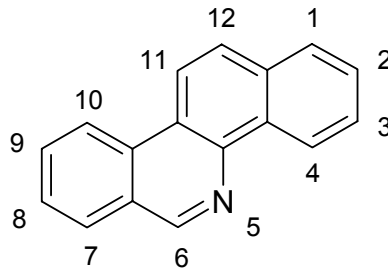
Einige Antibiotika, die wegen ihrer toxischen Eigenschaften nicht zur Behandlung bakterieller Infektionen verwendet werden, haben Eingang in die Therapie als Zytostatika gefunden. Hierzu gehören Actinomycine, Anthracycline (Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin und Epirubicin), Bleomycin und Mitoxantron und Amsacrin, wobei die beiden letzteren synthetischen Ursprungs sind. Die Antibiotika wirken durch DNA-Interkalation bzw. DNA-Komplexbildung sowie durch Hemmung der Topoisomerase [Mutschler *et al.*, 2001 b].

Hormone und Hormonantagonisten sind keine Zytostatika im eigentlichen Sinne, trotzdem können sie mit Erfolg bei solchen Tumoren eingesetzt werden, deren Wachstum hormonabhängig ist. Dies trifft vor allem für Prostata-, Mamma-, und Korpuskarzinome des Uterus zu, sofern die Tumorzellen noch Hormonrezeptoren besitzen. Ein Einfluss auf den Hormonhaushalt ist durch die Unterdrückung der Hormonproduktion oder die Gabe von Antagonisten möglich. Als Antiestrogene werden Estrogenrezeptor-Antagonisten wie Tamoxifen und Aromatasehemmer wie Aminogluthethimid eingesetzt, wogegen Cyproteronacetat und Flutamid Antiandrogene darstellen [Mutschler *et al.*, 2001 b].

Da die bisherigen Behandlungsmöglichkeiten von Tumorerkrankungen bei weitem nicht ausreichen, wird außer nach neuen Zytostatika auch nach neuen Therapieformen gesucht, indem man neue Erkenntnisse über die Molekularbiologie von Tumorzellen ausnutzt. Dabei werden unter anderem Antikörper gegen Oberflächenantigene von Krebszellen und Zytokine mit immunmodulierenden, antiproliferativen oder zytotoxischen Eigenschaften eingesetzt [Forth *et al.*, 2001 b].

## 1.2 Benzo[*c*]phenanthridine

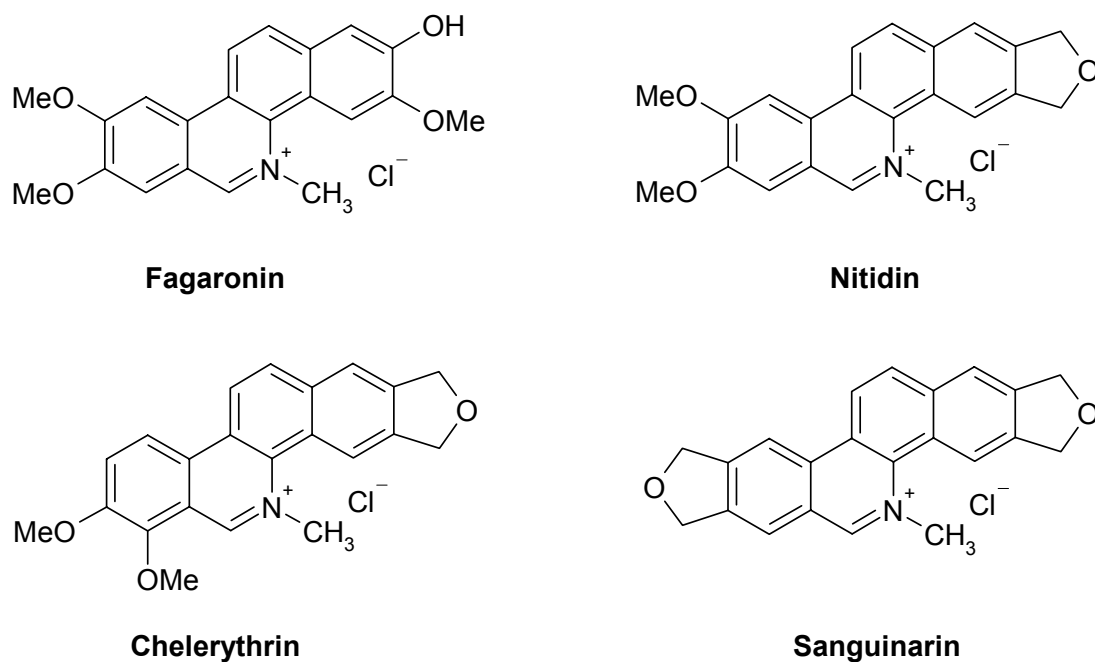
Benzo[*c*]phenanthridine besitzen eine Vielzahl pharmakologischer Eigenschaften. Das Grundgerüst besteht aus einem planaren aromatischen System aus vier Sechsringen mit heterozyklischem Stickstoffatom (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Benzo[*c*]phenanthridin.

### 1.2.1 Naturstoffe

In der Literatur werden mehrere natürlich vorkommende Alkaloide mit einem solchen Grundgerüst und bekanntem Wirkungsspektrum erwähnt [Simeon *et al.*, 1989]. Besonders zu nennen sind in dieser Gruppe Fagaronin, Nitidin, Chelerythrin und Sanguinarin, die neben anderen Effekten alle eine zytotoxische und antitumorale Wirksamkeit zeigen (Abb. 1.2).



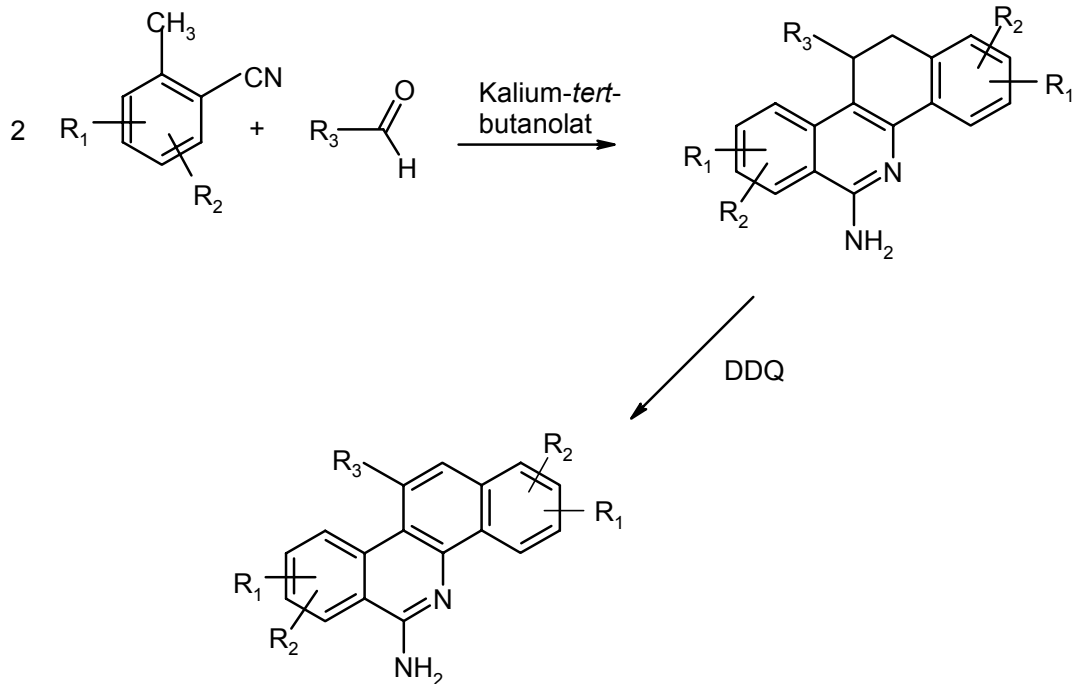
**Abb. 1.2: Antitumoral wirksame Benzo[*c*]phenanthridin-Alkaloide.**

Der Vergleich dieser Verbindungen zeigt, dass offenbar definierte Strukturelemente für die Wirksamkeit verantwortlich sind, da das unsubstituierte Benzo[*c*]phenanthridin pharmakologisch deutlich weniger effizient ist. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Umgebung des heterocyclischen Stickstoffatoms sowie Methoxy- bzw. Methylendioxy-Substituenten an ausgewählten Positionen des Ringsystems. Eine Vielzahl von Derivaten der Benzo[*c*]phenanthridine ist mittlerweile synthetisch zugänglich, allerdings konnten Verbindungen mit Substituenten in direkter Nachbarschaft zum heterozyklischen Stickstoffatom nur sehr umständlich synthetisiert werden.

### 1.2.2 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine

Benzo[*c*]phenanthridin-Derivate mit einer exozyklischen Aminogruppe in 6-Position lassen sich über einen sehr kurzen Syntheseweg herstellen, der von Weide und Clement gefunden wurde [Clement *et al.*, 2005]. Hierbei wird ein substituiertes *o*-

Tolunitril mit einer Aldehydkomponente in Gegenwart einer Base zum 6-Amino-11,12-dihydrobenzo[*c*]phenanthridin kondensiert. Durch anschließende Dehydrierung wird dann ein 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridin erhalten (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Syntheseweg für substituierte 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine.**

Da der von Weide und Clement gefundene Syntheseweg einen schnellen und effizienten Zugang zu einer Verbindungsklasse ermöglicht, die ein großes Potential pharmakologischer Aktivität in sich birgt, wurde diese 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridin-Synthese in Deutschland und ebenfalls international als Patent angemeldet, die Patenterteilungen liegen inzwischen vor [Clement *et* Weide, 1995]. Seit 1994 wurden auf diesem Weg von Weide, Wolschendorf und Kock bereits mehr als 50 Derivate synthetisiert. Besonders gute Ausbeuten wurden dabei mit aromatisch substituierten Aldehydkomponenten erhalten, wobei in 11-Position substituierte 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine entstehen. Durch den Einsatz von substituierten Benzaldehyden konnte eine Vielzahl von Produkten hergestellt werden. Ein positiver Einfluss auf die Ausbeute war durch Verwendung von

methoxysubstituierten Benzaldehyden zu verzeichnen, erreicht wurden Werte zwischen 36 und 81% d. Th. [Kock *et al.*, 2005].

Um Informationen über die zytostatische Effizienz der vorhandenen Verbindungen zu erhalten, wurden zunächst eine Auswahl der zur Verfügung stehenden Substanzen am National Cancer Institute (NCI), Bethesda, Maryland, USA in *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen auf Wirksamkeit getestet. Für die *in vitro*-Untersuchungen wurde die Wirkung der Substanzen auf verschiedene humane Tumorzelllinien getestet und über die Vitalität der Zellen zytostatische oder zytotoxische Eigenschaften in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt. Für die *in vivo*-Experimente wurden im „*in vivo*-hollow fiber assay“ humane Tumorzelllinien in substanz- nicht aber zelldurchlässigen Hohlfasern Mäusen entweder intraperitoneal (IP) oder subkutan (SC) implantiert und den Tieren Lösungen verschiedener Konzentrationen der Substanzen appliziert. Beurteilt wurde die Erhöhung der Überlebenszeit, Veränderungen der Tumorzellzahlen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und aufgetretene toxische Effekte der Substanzen. Zunächst wurden folgende Substanzen dem „*in vitro* anticancer screening“ unterzogen: BP-3, BP-D3, BP-6, BP-D6, BP-7, BP-D7, BP-8, BP-D8, BP-9, BP-D9 und BP-11. Die dehydrierten Derivate sowie BP-7 und BP-8 wurden außerdem im „*in vivo*-hollow fiber assay“ getestet.

Bei allen untersuchten Verbindungen konnte eine ausgeprägte antitumorale Aktivität beobachtet werden. Die Abstufung der Wirksamkeit der Substanzen variierte allerdings deutlich zwischen den *in vitro* und *in vivo* Testsystemen. Unter Berücksichtigung aller *in vitro*-Testdaten [Kock *et al.*, 2005, Wolschendorf, 2000], war BP-7 von den getesteten hydrierten Verbindungen am wirksamsten, ein Effekt trat meist ab einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l auf. Die Reihenfolge für die zytotoxische Aktivität dieser Verbindungen ist: **BP-7 > BP-6 > BP-8 = BP-9.**

Dagegen wiesen die dehydrierten Derivate bereits bei zehnfach bzw. hundertfach kleinerer Konzentration ( $10^{-7}$ - $10^{-8}$  mol/l) eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum auf. Die Aktivitätsabstufung stellt sich hier folgendermaßen dar: **BP-D6 > BP-D7 > BP-D3 ≥ BP-D8 >> BP-D9.**



Dabei wiesen die einzelnen Krebsarten ein unterschiedliches Ansprechverhalten auf die getesteten Substanzen auf. Eine sehr deutliche Selektivität zeigten die 6-Aminobenzo[*c*]-phenanthridine für Leukämie, Brust- und Prostatakrebs [Kock *et al.*, 2005].

Beim „*In vivo*-hollow fiber assay“ werden die Effekte der eingesetzten Substanzen nach einem Punktesystem beurteilt. Die eingesetzten Substanzen erreichten dabei je nach Substituent in 11-Position sehr unterschiedliche Werte (Tab. 1.1) [Kock *et al.*, 2005]. Die Reihenfolge der Wirksamkeit stellte sich hier wie folgt dar: **BP-D7 > BP-8 > BP-7 > BP-D9 > BP-D8 > BP-D3 > BP-D6.**

Substanz	Punkte (gesamt)	Punkte (IP)	Punkte (SC)	zelltötende Eigenschaften
BP-D7	28	14	14	ja
BP-8	20	10	10	ja
BP-7	16	6	10	ja
BP-D9	14	6	8	nein
BP-D8	12	4	8	ja
BP-D3	10	2	8	ja
BP-D6	8	6	2	nein

**Tab. 1.1: Testergebnisse der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine im „*in vivo*-hollow fiber assay“. IP: intraperitoneal; SC: subkutan.**

Dabei erzielten die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine mit Trimethoxyphenylresten in 11-Position deutlich bessere Ergebnisse als die Dimethoxyphenylderivate und hatten zudem auch immer zytotoxische Eigenschaften. Sogar die *in vitro* als schlechter eingestuft dihydrierten Trimethoxyphenylderivate zeigten eine höhere Aktivität als die dehydrierte Verbindungen mit anderen Substituenten. Der Grund hierfür könnte evtl. in einem bisher ungeklärten Wirkmechanismus der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine liegen. Denkbar wäre aber auch, dass bei dem *in vivo*-Experiment die dihydrierten Verbindungen über Biotransformationsvorgänge in die dehydrierten

Derivate umgewandelt werden. Die Untersuchung, ob dieser Weg möglich ist, sollte einen Bereich dieser Arbeit darstellen.

### **1.3 Präklinische Untersuchungen**

Die Wirkung eines Arzneimittels ist das Ergebnis zahlreicher, meist sehr komplexer Vorgänge im Organismus. Neben der Prüfung auf Effektivität müssen daher neue Wirkstoffe in Rahmen der präklinischen Untersuchungen, also vor der ersten Anwendung am Menschen, weiteren Tests unterzogen werden, um die Sicherheit des neuen Medikaments zu gewährleisten und seine Eigenschaften zu optimieren. Zu diesen Tests gehören neben Toxizitätstests Untersuchungen zur Biotransformation, um Geschwindigkeit und Ausmaß der Umsetzung der neuen Struktur durch den Organismus und gegebenenfalls die Bildung toxischer Produkte abschätzen und bei der weiteren Entwicklung berücksichtigen zu können. Ebenso müssen bereits im Vorfeld der Einnahme durch den Menschen Erkenntnisse zum Interaktionspotential mit bereits etablierten Arzneistoffen gewonnen werden. Dies gilt in zunehmendem Maße, da die generelle Erhöhung der Lebenserwartung in den Industrienationen meist mit dem gleichzeitigen Auftreten verschiedener Krankheitsbilder verbunden ist, wodurch die parallele Applikation mehrerer Medikamente unvermeidlich wird. Ebenfalls eng mit der Entwicklung neuer Substanzen verknüpft sind Untersuchungen zur physikochemischen Charakterisierung, da diese Stoffeigenschaften wie Wasserlöslichkeit, Lipophilie und Ionisationsgrad in physiologischen Medien entscheidenden Einfluss darauf haben, ob aus einer wirksamen Substanz ein Arzneistoff werden kann [Lipinski *et al.*, 2001].

#### **1.3.1 Biotransformation**

Als Biotransformation bezeichnet man die Umwandlung von Xenobiotika (körperfremder Stoffe), die der Körper nicht zur Energiegewinnung oder als Vitamine

benötigt, durch den Organismus. Außer Arzneistoffen gehören auch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, Chemikalien, Nahrungszusätze, Umweltgifte und andere Schadstoffe zu diesen Xenobiotika [Testa, 1995 a].

Da lipophile Substanzen schlecht ausgeschieden werden können, besteht die Gefahr einer Akkumulation im Körper. Die Biotransformation dient der Entgiftung des Körpers durch Umwandlung dieser Stoffe in hydrophilere Verbindungen, die leichter ausgeschieden werden können. Die abbauenden Enzyme haben aufgrund der chemischen Divergenz der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe eine sehr geringe Substratspezifität, so dass auch neue Verbindungen wie beispielsweise Arzneistoffe umgesetzt werden können. Bei Arzneistoffen kann es durch die Biotransformation zu Änderungen der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften kommen. Die Biotransformation kann eine Deaktivierung bewirken, es ist aber auch eine Toxifizierung möglich. Pharmakologisch inaktive Verbindungen, bei denen erst der Metabolit das eigentliche Wirkprinzip darstellt, werden als Prodrugs bezeichnet [Ettmayer *et al.*, 2004].

In der Biotransformation können erhebliche interindividuelle Unterschiede auftreten, die die Verträglichkeit von Arzneimitteln stark beeinflussen. Gründe hierfür können neben genetischen Polymorphismen auch Alter, Geschlecht, Umweltfaktoren, Krankheiten, Ernährung sowie Rauch- und Trinkgewohnheiten der Patienten sein [Testa, 1995 a]. Da die meisten Arzneistoffe durch Biotransformation aus dem Organismus eliminiert werden, treten häufig pharmakokinetische Interaktionen durch Hemmung oder Induktion des metabolisierenden Enzymsystems auf. Arzneistoffe, die Inhibitoren fremdstoffmetabolisierender Enzyme darstellen, können die Plasmaspiegel gleichzeitig gegebener Substanzen auf toxische Konzentrationen erhöhen. Dagegen kann durch Enzyminduktoren die Wirksamkeit parallel gegebener Arzneistoffe durch beschleunigte Ausscheidung stark verringert sein [Forth *et al.*, 2001 a]. Für neue Arzneistoffe sind daher sowohl die Metabolismuswege als auch inhibierende bzw. induzierende Eigenschaften von großem Interesse.

Der Prozess der Biotransformation erfolgt vor allem in der Leber und meist untergeordnet in anderen Organen, wie dem Darm, der Niere, der Lunge, der Haut oder im Blut [Mutschler *et al.*, 2001 a]. Die an der Biotransformation beteiligten

Enzyme liegen entweder strukturgebunden, wie die Monooxygenasen und Glucuronyltransferasen in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien oder als lösliche Enzyme, wie Esterasen, oder Sulfotransferasen vor. Da die beteiligten Enzyme meist eine geringe Substratspezifität besitzen, katalysieren sie neben Biotransformationsreaktionen oft auch Umsetzungen körpereigener Verbindungen [Mutschler *et al.*, 2001 a]. Bei den Reaktionen, die die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme katalysieren, wird zwischen Phase-I- und Phase-II-Reaktionen unterschieden. Die Phase-I-Reaktionen sind Funktionalisierungsreaktionen, sie führen funktionelle Gruppen in das Molekül ein oder legen entsprechende Gruppen frei. Typische Phase-I-Reaktionen sind Oxidationen, Reduktionen und Hydrolyse. Die Phase-II-Reaktionen sind Konjugationsreaktionen, die durch Transferasen katalysiert werden. Im Rahmen dieser Reaktionen werden die funktionellen Gruppen der Xenobiotika, die durch die Phase-I-Reaktionen gebildet wurden oder schon vorher im Molekül vorhanden waren, mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen gekoppelt. Wichtige Phase-II-Reaktionen sind Glucuronidierung, Sulfatierung, sowie die Konjugation mit Aminosäuren und Gluthathion. Methylierungen und Acetylierungen sind eher selten und nehmen eine Mittelstellung zwischen Phase I und Phase II ein. Während Phase-I-Metaboliten häufig noch eine pharmakologische Aktivität aufweisen, sind Phase-II-Metaboliten meistens unwirksam und werden schnell ausgeschieden [Forth *et al.*, 2001 a].

### **1.3.1.1 Cytochrom P450-Enzyme**

Für den oxidativen Phase-I-Metabolismus sind die Monooxygenasen die zentralen Enzyme, die eine Vielzahl von Funktionalisierungsreaktionen katalysieren. Hierzu gehören besonders die Cytochrom P450-Enzyme. Die charakteristischen Bestandteile sind Hämoproteine, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert sind und aufgrund ihres Absorptionsverhaltens als Cytochrom P450-Enzyme bezeichnet werden [Forth *et al.*, 2001 a]. Im Menschen sind die Cytochrom P450-Enzyme für mehr als 90% des Arzneistoffmetabolismus verantwortlich [Lewis, 2003]. Die Cytochrom P450-Enzyme bestehen aus einem Apoprotein und einer Häm-

---

Domäne, dem Eisen-Potoporphyrin IX Gerüst, als prosthetischer Gruppe [Testa, 1995 c]. Das Eisen-Zentralatom bildet vier koordinative Bindungen zu den Stickstoffen des Protoporphyrins aus, während der fünfte Ligand eine Thiolat-Gruppe einer Cysteinseitenkette des Proteins darstellt. Im Ruhezustand des Enzyms bilden Wasser oder Hydroxylgruppen des Apoproteins den sechsten Liganden [Testa, 1995 c], können aber nach Reduktion durch Sauerstoff, Kohlenmonoxid, Cyanid und andere heteroatomhaltige Verbindungen ersetzt werden.

Nach Reduktion und Bindung von Kohlenmonoxid als sechstem Liganden zeigt das Cytochrom ein Differenzspektrum mit einem Maximum bei 450 nm, was sowohl zur Namensgebung geführt hat [Forth *et al.*, 2001 a], als auch für die Gehaltsbestimmung herangezogen wird [Omura *et Sato*, 1964].

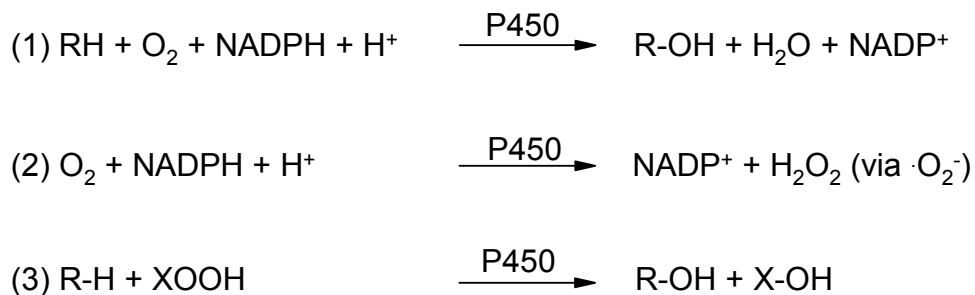
In den bisher untersuchten Spezies sind bereits mehr als 2000 Mitglieder der Superfamilie der Cytochrom P450-Enzyme bekannt. Die Klassifikation der Enzyme erfolgt anhand ihrer Aminosäuresequenzen. Nach einigen Vorarbeiten gibt es seit 1993 eine endgültige Nomenklatur, die bis heute verwendet wird [Nelson *et al.*, 1996]. Nach diesen Vorgaben werden Cytochrom P450-Enzyme mit CYP abgekürzt. Darauf folgen für die Kennzeichnung der Familie eine arabische Ziffer und ein Großbuchstabe für die Subfamilie. Eine weitere arabische Zahl bezeichnet das jeweilige Isoenzym [Nelson *et al.*, 1996]. P450-Isoenzyme einer Familie haben eine Homologie von mehr als 40% der Aminosäuresequenz, innerhalb der Subfamilien sind es mehr als 59% [Ruckpaul, 1993].

Die einzelnen CYP450-Isoenzyme unterscheiden sich außerdem durch ihre teilweise überlappende Substratspezifität. Obwohl ein Substrat von mehreren Isoenzymen umgesetzt werden kann, gibt es jeweils eines, welches am potentesten ist [Testa, 1995 c]. Durch Verwendung von Markersubstraten können somit die Aktivitäten der einzelnen Isoenzyme in einem Gemisch wie z.B. Mikrosomen bestimmt werden. Die wichtigsten CYP 450-Isoenzyme für den Arzneistoffmetabolismus sind CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1 und CYP3A4, wobei der prozentuale Anteil an der Biotransformation der Arzneimittel im Menschen sehr unterschiedlich ist (Tab. 1.2) [Lewis, 2003].

Cytochrom P450-Isoenzyme	Anteil der CYP450-katalysierten-Arzneistoffoxidationsreaktionen im Menschen [%]
CYP2D6	34
CYP3A4	19
CYP2C8/9	16
CYP1A2	8
CYP2C19	8
CYP2E1	4
CYP2B6	3
CYP2A6	2,5
CYP2F1	1

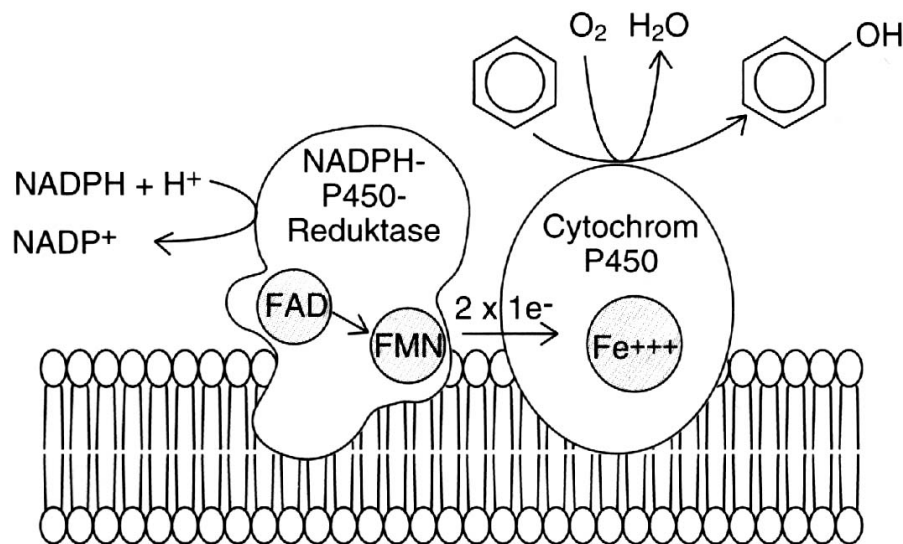
**Tab. 1.2: Prozentualer Anteil der häufigsten fremdstoffmetabolisierenden Cytochrom P450-Enzyme am Gesamtmetabolismus im Menschen [Lewis, 2003].**

Cytochrom P450-Enzyme übertragen als Monooxygenasen ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff auf das jeweilige Substrat, während das andere zu Wasser reduziert wird. Unter bestimmten Voraussetzungen können aber auch Oxidase- und Peroxidaseaktivitäten beobachtet werden (Abb. 1.4) [Guengerich, 1991].



**Abb. 1.4: Cytochrom P450-katalysierte Reaktionen [Guengerich 1991] (1) Monooxygenase-, (2) Oxidase-, (3) Peroxidase-Funktion.**

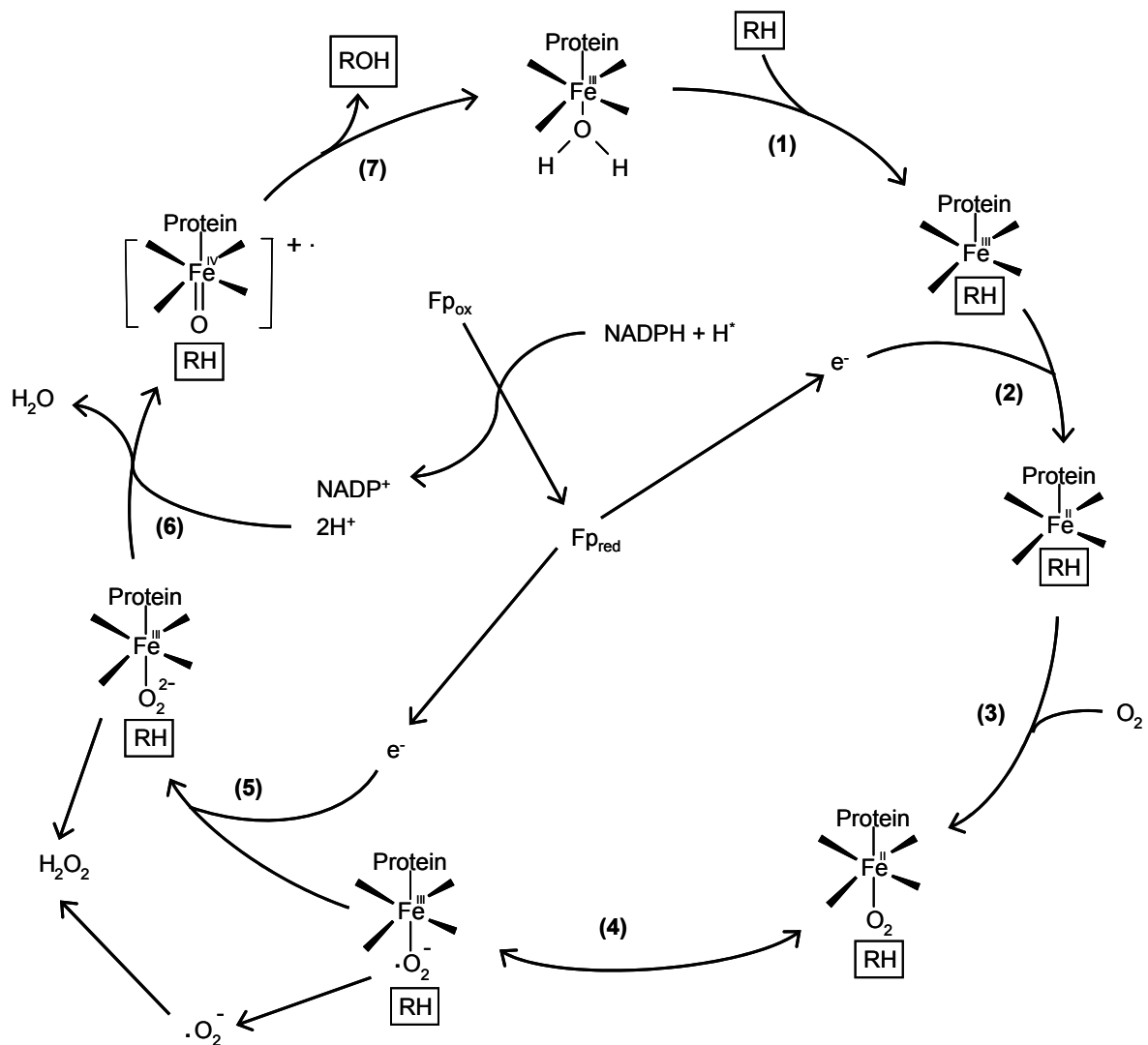
Die überwiegende Reaktion ist aber die Monooxygenierung, wofür die Elektronen schrittweise vom NADPH durch die NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase, die ebenfalls in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert ist, auf das CYP450 übertragen werden (Abb. 1.5) [Forth *et al.*, 2001 a].



**Abb. 1.5: Schematischer Ablauf der mikrosomalen Monooxygenasereaktionen [Forth *et al.*, 2001].**

Die Monooxygenierungsreaktion der Substrate läuft in einem katalytischen Zyklus ab (Abb. 1.6). Zunächst lagert sich das Substrat (RH) an eine Bindungsstelle in der Nähe des aktiven Zentrums an, wodurch der Ligand (Wasser) aus der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens verdrängt wird (1). Daraufhin wechselt das Fe(III) vom *low spin* in den *high spin* Zustand, wodurch eine Erhöhung des Redoxpotentials zustande kommt. Aus diesem Grund wird die Übertragung eines Elektrons (2) von NADPH über die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase auf das Eisen erleichtert, welches dadurch zum Fe(II) reduziert wird. Das Zentralatom ist nun in der Lage, molekularen Sauerstoff anzulagern (3), der ein Elektron des Eisens übernimmt, so dass ein reaktiver Oxo-Komplex entsteht (4). Dieser Komplex nimmt ein weiteres von der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase bereitgestelltes Elektron auf (5) und spaltet mit zwei Protonen des oxidierten Flavoproteins Wasser ab, wobei ein reaktiver Oxo-Komplex entsteht (6). Nach Übertragung des reaktiven Sauerstoff-

atoms auf das Substrat kehrt das Enzym durch Abspaltung des Substrats in seinen Ausgangszustand zurück (7) und steht für einen neuen Zyklus zur Verfügung. Das Fehlen eines geeigneten Substrats oder die Instabilität des Enzym-O<sub>2</sub>-Komplexes kann zur Entkopplung des Reaktionszyklus führen, wobei nach Schritt (4) ein Superoxidanionradikal oder nach Schritt (5) Wasserstoffperoxid entsteht [Coon *et al.*, 1992].



**Abb. 1.6: Katalytischer Zyklus der oxidativen Substratumsetzung durch Cytochrom P450 (modifiziert nach Coon *et al.* 1992).**

*Fe = Häm-Eisen im katalytischen Zentrum, Fp = Flavoprotein (NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), RH = Substrat, ROH = monoxygeniertes Produkt.*



### 1.3.1.2 Metabolismusstudien

Bei Arzneistoffen, deren Exkretion im Wesentlichen über Metabolismus stattfindet, können die Metabolismuswege einen signifikanten Einfluss auf die Effektivität und Unbedenklichkeit haben. Die Kenntnis von Metabolismuswegen und potentiellen Interaktionen kann gegebenenfalls den Einsatz eines Arzneistoffs ermöglichen, der ein zu hohes Toxizitätsrisiko hätte, wenn die Blutspiegel nicht vorhersagbar wären. Zudem können Kenntnisse über das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Biotransformation einer Substanz eine Dosisfindung für klinische Studien so beeinflussen, dass in diesen ein positiver Effekt festgestellt werden kann [FDA, 1997].

Das Ziel von Metabolismusstudien ist somit die Aufklärung der Hauptwege des Metabolismus, wobei sowohl die Metaboliten als auch die beteiligten Enzyme von Interesse sind. Um das Ausmaß von Tierversuchen möglichst gering zu halten, werden üblicherweise zunächst *in vitro*-Studien durchgeführt, auf deren Ergebnisse weiterführende *in vivo*-Untersuchungen basieren. Mögliche Enzymquellen für *in vitro*-Studien stellen rekombinant gewonnene Enzyme, subzelluläre Fraktionen, isolierte Zellen oder Organe bzw. deren Teile dar. Da die meisten Metabolismuswege auf der Umsetzung durch Cytochrom P450-Enzyme beruhen, die im rauen Teil des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, stellen gepoolte, humane Lebermikrosomen auch aufgrund ihrer guten Lagerungsstabilität die gängigste Enzymquelle dar [FDA, 1997].

Um die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit humanen Lebermikrosomen zu bestätigen, können rekombinant gewonnene CYP450-Isoenzyme eingesetzt werden. Das vollständigste Bild des hepatischen Metabolismus kann durch die Verwendung intakter Lebersysteme wie isolierter Hepatozyten und Organdünnschnitten erhalten werden, da in diesen auch Phase-II-Reaktionen stattfinden können, wobei das zentrale Problem aber in der Verfügbarkeit und Lebensdauer der entsprechenden Enzymquellen liegt [FDA, 1997].

Mit Hilfe der Daten aus den *in vitro*-Experimenten kann der Aufbau der *in vivo*-Untersuchungen geplant und optimiert werden, um die erforderlichen Tierversuche

auf ein Mindestmaß zu reduzieren. Unvermeidlich sind *in vivo*-Tests, um das Ausmaß der verschiedenen Eliminationswege wie Metabolismus kontra renaler oder hepatischer Exkretion zu untersuchen. Da aber in der Regel nur leicht zugängliche Medien wie Urin, Blut, Galle oder Fäzes auf potentielle Metaboliten untersucht werden können, sind reaktive oder instabile Metaboliten sowie solche, die nur in geringen Mengen gebildet werden oder eine hohe Plasmaproteinbindung aufweisen, nur sehr schwer oder gar nicht bei *in vivo*-Studien zu identifizieren. Zudem sind die Ergebnisse der Tierversuche aufgrund der Speziesunterschiede nicht unmittelbar auf den Menschen übertragbar, so dass meist mehrere Tierarten untersucht und die Experimente aufwendig validiert werden müssen [FDA, 1997]. Obwohl diese Speziesunterschiede im Metabolismus die Aussagekraft für den sicheren Einsatz im Menschen verringern, sollte bei abweichenden *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen den letzteren mehr Bedeutung zugemessen werden. Trotzdem bleiben *in vitro*-Untersuchungen gerade in den frühen Stadien der Arzneistoffentwicklung unverzichtbar [FDA, 1997].

### **1.3.2 Interaktion**

Neben der Kenntnis der Biotransformationswege ist für neue Arzneistoffe von großer Bedeutung, wie hoch ihr Interaktionspotential mit anderen, bereits etablierten Arzneistoffen ist, da die gleichzeitige Gabe mehrerer Arzneistoffe häufig der Fall ist [Lin *et al.*, 1997]. Diese Interaktionen sind generell durch pharmakodynamische und/oder pharmakokinetische Prozesse möglich, wobei allerdings die Interaktionen mit pharmakokinetischer Ursache überwiegen [Lin *et al.*, 1997]. Arzneistoffwechselwirkungen vom pharmakodynamischen Typ können oft bei der pharmakologischen Testung von Kombinationen erkannt werden, wogegen sich Interaktionen vom pharmakokinetischen Typ häufig erst bei breiter Anwendung der betreffenden Substanz erkennen lassen [Auterhoff *et al.*, 1999].

Pharmakodynamische Interaktionen beruhen meist auf direkten oder funktionellen Antagonismen, wogegen pharmakokinetische Interaktionen durch wechselseitige Beeinflussung von Absorption, Verteilung und Elimination auftreten. Interaktionen im

Bereich der Absorption können unter anderem durch Änderungen der Verweilzeit im Gastrointestinaltrakt oder die Hemmung bzw. Induktion von Transportern auftreten, wogegen Interaktionen der Verteilung vor allem durch gegenseitiges Verdrängen aus der Plasmaproteinbindung beobachtet werden.

Im Bereich der Elimination finden sich Interaktionen im Wesentlichen im Bereich des Metabolismus. Neue Substanzen können durch Hemmung der Enzyme, die andere Xenobiotika metabolisieren, die Ausscheidung stark vermindern, wodurch toxische Plasmaspiegel erreicht werden. Die Wechselwirkungen können umso gravierendere Effekte haben, je enger die therapeutische Breite der Substanzen ist. Ein besonders hohes Risiko besteht beispielsweise bei Antikoagulantien vom Cumarintyp, bei denen eine Hemmung der abbauenden Enzyme tödliche Folgen haben kann [Lin *et al.*, 1997]. Die Hemmung kann dabei kompetitiver oder nicht-kompetitiver Art sein, außerdem kann Enzymhemmung durch sogenannte Suizid-Inhibitoren auftreten, bei denen der Inhibitor durch das Enzym in einen reaktiven Metaboliten überführt wird, der irreversibel an das Enzym bindet und zu dessen Funktionsverlust führt.

Andererseits kann durch Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme der Abbau von Arzneistoffen beschleunigt und damit ihre Wirksamkeit verringert werden. In der Praxis führt vor allem eine Inhibition des Isoenzym CYP3A4 zu klinisch relevanten Interaktionen. Eine Übersicht von bekannten Inhibitoren und Induktoren zeigt Tab. 1.3 [Forth *et al.*, 2001 a].

Reversible Inhibition	Irreversible Inhibition	Induktion
Cimetidin	Grapefruitsaft	Barbiturate
Clarithomycin	Bergamottin	Carbamazepin
Ciclosporin	Dihydroxybergamottin	Dexamethason
Erythromycin		Phenytoin
Fluoxetin		Rifampicin
Ketoconazol		
Mibefradil		
Ritonavir		

**Tab. 1.3: Klinisch wichtige CYP3A4-Inhibitoren und -Induktoren [mod. nach Forth et al., 2001].**

Aufgrund der klinischen Bedeutung von Biotransformationsinteraktionen empfehlen sowohl die europäische Arzneimittelaufsichtsbehörde EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) als auch die amerikanische FDA (Food and Drug Administration) eine frühzeitige *in vitro*-Testung auf Interaktionen im Bereich des Metabolismus [CPMP 1997, FDA 1997]. Für diese *in vitro*-Tests werden bevorzugt Inkubationen humaner Mikrosomen mit Markersubstraten und Zusatz der neuen Substanz für Inhibitionsuntersuchungen verwendet. Dagegen müssen für Induktionsuntersuchungen humane Hepatozyten oder Tierversuche genutzt werden. Obwohl die *in vitro*-Ergebnisse in der Regel eine gute Aussagekraft für die *in vivo*-Situation haben [Lin et Lu, 1997], müssen bei Beobachtung von *in vitro*-Interaktionen weitere *in vivo*-Versuche angeschlossen werden, um das Interaktionspotential näher beurteilen zu können. Die Beurteilung des Interaktionspotentials erfolgt generell aufgrund einer Risiko-Nutzen-Analyse. Dabei können je nach Bedeutung der neuen Substanz und Ausmaß bzw. Schwere der zu erwartenden Interaktionen neben dem Rückzug der neuen Substanz auch strukturelle Modifikationen oder auch nur Warnhinweise für die Kombination mit bestimmten anderen Pharmaka erforderlich sein [FDA, 1997].

### 1.3.3 Physikochemische Charakterisierung

Die physikochemische Charakterisierung spielt eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Arzneistoffentwicklung, da Substanzeigenschaften wie Löslichkeit in wässrigen Medien, Ionisationskonstanten und Lipophilie einen entscheidenden Einfluss auf Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik haben.

Da durch den Einsatz kombinatorischer Chemie neue Arzneistoffkandidaten in großen Stückzahlen produziert werden können, wurde eine Automatisierung der pharmakologischen Testsysteme erforderlich. In den Assays dieser „high-throughput screenings“ werden die neuen Verbindungen meist in Form von Stammlösungen in DMSO eingesetzt. Dabei weichen die beobachteten Löslichkeiten stark von denen unter physiologischen Bedingungen ab, so dass Entscheidungen im Rahmen der Arzneistoffentwicklung, die nur auf die gefundenen Effektivitäten ausgerichtet sind, später oft aufgrund unzureichender pharmakokinetischer Eigenschaften korrigiert werden müssen [Lipinski *et al.*, 2001]. Je früher den physikochemischen Eigenschaften im Laufe der Entwicklung neuer Arzneistoffe Aufmerksamkeit geschenkt wird und mangelhafte Charakteristika in der weiteren Entwicklung berücksichtigt werden, desto eher lassen sich wirtschaftliche Risiken minimieren [Lipper, 1999].

Von den physikochemischen Parametern beeinflussen vor allem Lipophilie und Wasserlöslichkeit die Resorption der Arzneistoffe, da eine Permeation durch die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran nur lipophilen Stoffen in gelöster Form möglich ist [Lin *et al.*, 1997]. Die Aufnahme von ungelösten Substanzen durch Phagozytose spielt dagegen für Arzneistoffe eine eher untergeordnete Rolle [Forth *et al.*, 2001 a]. Da Ionen generell eine niedrige Lipophilie besitzen, spielen auch die pKa-Werte eine entscheidende Rolle für die Prognose der Membrangängigkeit unter physiologischen Bedingungen.

Um der großen Anzahl der Verbindungen, die der kombinatorischen Chemie entstammen, gerecht zu werden, wurde in den letzten Jahren auch im Bereich der physikochemischen Charakterisierung der Versuch der Automatisierung der Untersuchungen unternommen. In diesem Zusammenhang wurden Methoden

entwickelt, die durch Verwendung von HPLC-Gradientenverfahren [Kaup, 1996; Krass *et al.*, 1997] eine deutlich schnellere Bestimmung des Oktanol-Wasser-Koeffizienten als Maß für die Lipophilie als die früheren Methoden des Ausschüttelns gestatten. Für die Bestimmung des pKa wurden sowohl HPLC-Verfahren [Bartolini *et al.*, 2002; Manderscheid *et* Eichinger, 2003] als auch automatisierte spektralphotometrische Verfahren [Tam *et* Takacs-Novak, 2001] entwickelt. Dabei nutzen die HPLC-Verfahren die Abhängigkeit der Retentionskoeffizienten vom pH-Wert der mobilen Phase, während die photometrischen Verfahren auf Absorptionsdifferenzen von neutraler und ionisierter Form des Analyten beruhen. Ebenfalls zum Einsatz kommen Verfahren, die potentiometrische Titrations durchführen [Avdeef *et al.*, 1993].

Auf dem gleichen Prinzip beruhen Möglichkeiten zur Bestimmung der Löslichkeit ionisierbarer Substanzen, bei denen pH-Löslichkeitsprofile erstellt werden [Avdeef *et* Berger, 2001]. Weitere Möglichkeiten der Löslichkeitsmessung stellen turbidimetrische Methoden [Lipinski *et al.*, 2001] und HPLC-Verfahren [Bergström *et al.*, 2002] dar.

Auch wenn in zunehmendem Maße Computersimulationen zur Beurteilung neuer Strukturen eingesetzt werden, ist der Nutzen dieser Systeme stark von der Qualität der Daten abhängig, die zu ihrer Erstellung verwendet wurden, so dass auch hier zur Validierung zunächst eine aussagekräftige Analytik benötigt wird.

### **1.4 Zielsetzung**

Da in den Einleitungen der folgenden Kapitel jeweils eine detaillierte Beschreibung der Zielsetzung erfolgt, soll an dieser Stelle nur ein Überblick gegeben werden.

Den angeführten Ergebnissen der bisherigen Testungen [Kock *et al.*, 2005] ist zu entnehmen, dass es sich bei den 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridinen um eine Gruppe von Verbindungen handelt, die bereits ihr zytostatisches Potential unter Beweis gestellt haben. Aus diesem Grund waren im Hinblick auf eine mögliche Verwendung als Arzneistoffe Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Charakterisierung, zur Biotransformation sowie zum pharmakokinetischen Interaktionspotential der

Substanzen notwendig, da diese einen entscheidenden Teil der präklinischen Untersuchungen potentieller neuer Arzneistoffe darstellen.

Von besonderem Interesse waren hierbei ausgewählte Di- und Trimethoxyphenylderivate, die sich in den Tests als die wirksamsten Substanzen herausgestellt haben [Kock *et al.*, 2005]. Auffällig waren vor allem die Unterschiede in der Effektivitäts-Hierarchie der Substanzen beim Vergleich von *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten. Um eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen zu finden, sollten nach Inkubationen mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies die Ansätze daraufhin überprüft werden, ob die dehydrierten Verbindungen als Metaboliten der entsprechenden Dihydroderivate gebildet würden, und somit eine Art Prodrug-Prinzip zum Tragen käme. Für alle ausgewählten Substanzen, also neben den dihydrierten auch die dehydrierten Verbindungen, sollten *in vitro*-Metabolismusstudien in Form von Inkubationen mit humanen und porcinen Lebermikrosomen durchgeführt werden. Als Analytik wurden hier LC-MS<sup>n</sup>-Verfahren ausgewählt, um möglichst detaillierte Aussagen zur Struktur der Metaboliten treffen zu können. Desweiteren sollten potentielle Metaboliten in Form der *N*-oxidierten Verbindungen synthetisiert und die Umsetzung dieser Strukturen durch verschiedene Enzymquellen mit der Fähigkeit zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen untersucht werden.

Das Interaktionspotential sollte für ausgewählte 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine wie von der EMEA empfohlen durch Inkubationen mit gepoolten humanen Lebermikrosomen und Markersubstraten unter Zusatz der Testsubstanzen untersucht werden [CPMP, 1997]. Bei den Isoenzymen, die in Vortests unter optimierten Inkubationsbedingungen eine Hemmung zeigten, sollten zur Charakterisierung der Inhibitionskinetik weitere Untersuchungen unter Variation der Substrat- und Inhibitorkonzentrationen folgen.

Die erforderliche physikochemische Charakterisierung umfasst Untersuchungen zur Löslichkeit, Lipophilie und Säurestärke, um daraus Schlüsse auf die Bioverfügbarkeit der Substanzen zu ziehen. Da in den Vorgängerarbeiten [Kock, 2003; Wolschendorf,

2000] eine schlechte Wasserlöslichkeit der Verbindungen beschrieben wurde, sollten zunächst diese Beobachtungen durch Verwendung einer HPLC-Analytik konkretisiert werden. Ebenfalls über den Einsatz einer HPLC-Analytik sollten Lipophilie und pKa-Werte bestimmt werden, um eine Beurteilung der Substanzen anhand der „rule of five“ [Lipinski *et al.*, 2001] zu ermöglichen.



## 2 PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER 6-AMINOBENZO[C]PHENANTHRIDINE

### 2.1 Einleitung und Zielsetzung

Ein wichtiger Teil der präklinischen Untersuchungen neuer Wirkstoffe ist die physikochemische Charakterisierung. Diese Substanzeigenschaften wie Löslichkeit in wässrigen Medien, pKa-Werte und Lipophilie haben einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit. Deshalb wird diesen physikochemischen Eigenschaften in zunehmendem Maße im Laufe der Entwicklung neuer Arzneistoffe möglichst frühe Aufmerksamkeit geschenkt. Es entstehen umso größere wirtschaftliche Risiken, je später die Entwicklung eines Arzneistoffkandidaten aufgrund mangelnder biopharmazeutischer Eigenschaften gestoppt werden muss [Lipper, 1999]. Von 319 neuen Wirkstoffen, die in den Jahren 1964-1985 in Großbritannien am Menschen erprobt wurden, wurde die weitere Entwicklung bei 62% dieser Stoffe abgebrochen. Der Hauptgrund waren mit 39,4% ungeeignete pharmakokinetische Eigenschaften [Prentis *et al.*, 1988]. Diese entscheiden somit nicht nur über mögliche Darreichungsformen, sondern auch darüber, ob eine wirksame Substanz überhaupt ein neuer Arzneistoff werden kann. Trotzdem wird, wenn möglich, eine orale Gabe angestrebt, da generell nicht-invasive Applikationsarten aufgrund einer geringeren Belastung der Patienten bevorzugt werden. Gerade bei Zytostatika lässt sich aber häufig eine parenterale Gabe nicht vermeiden, hierzu muss sich der Arzneistoff in einem wässrigen Medium lösen lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Untersuchungen zur Löslichkeit in wässrigen Medien sowie unter Lösungsmittelzusatz, die Bestimmung des pKa-Wertes und der Lipophilie für ausgewählte Vertreter der Substanzklasse durchgeführt werden. Eine Bestimmung der Löslichkeit kann entweder mit Hilfe einer HPLC-Analytik durchgeführt werden [Bergström *et al.*, 2002] oder indem nach Zugabe des Lösungsmittels auf Trübungen geachtet bzw. auf vollständige Lösung geprüft wird. Beide Verfahren sollten im Zuge der Untersuchungen zum Einsatz kommen. Für die Bestimmung des

pKa-Wertes sind viele verschiedene Methoden entwickelt worden. Darunter finden sich photometrische Verfahren in nahezu reinen wässrigen Medien [Albert *et al.*, 1984], potentiometrische Verfahren, die mit wechselnden Anteilen organischer Lösungsmittel arbeiten [Fini *et al.*, 1987; Khan *et al.*, 2000] und HPLC-Methoden [Bartolini *et al.*, 2002; Manderscheid *et al.*, 2003].

Eine Weiterentwicklung der photometrischen Verfahren stellt der automatisierte Messapparat Sirius Profiler dar [Tam *et al.*, 2001]. Im Verlauf der Untersuchungen für die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine sollten zunächst photometrische Verfahren zum Einsatz kommen und anschließend die Ergebnisse unter Verwendung einer HPLC-Methode überprüft werden.

Für die Bestimmung der Lipophilie haben chromatographische Verfahren die Bestimmung durch Ausschütteln mit Oktanol zur Bestimmung des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten weitgehend abgelöst. Unter den chromatographischen Verfahren finden sich solche, die mit oktanolgesättigten Phosphatpuffern arbeiten [Kaup, 1996] und solche, die Reversed-Phase-HPLC-Verfahren unter Gradientenelution verwenden [Krass *et al.*, 1997]. Bei beiden Verfahren erfolgt die Bestimmung über den Vergleich mit Standardsubstanzen bekannter Lipophilie. Für die zu untersuchenden Substanzen war eine hohe Lipophilie zu erwarten. Das Oktanol-Verfahren mit begrenztem Messbereich sollte daher nur für wenige Verbindungen getestet werden, während der überwiegende Teil der Messungen mit dem Gradientenelutionsverfahren durchgeführt werden sollte.

## **2.2 Material und Methoden**

### **2.2.1 Löslichkeit**

#### **2.2.1.1 Material und Geräte**

Dikaliumhydrogenphosphat, Dimethylsulfoxid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Methanol, Phosphorsäure (Fa. Merck, Darmstadt), Acetonitril (Fa.

Promochem, Wesel), Spritzenfilter Filtropur S 0,2  $\mu\text{M}$  (Fa. Sarstedt, Nümbrecht)

Die Suspendierung der Ansätze erfolgte mit einem Vibrationsmischer IKA-Vibrax VXR (Fa. Jahnke & Kunkel, Staufen) und einem Ultraschallbad Sonorex Super (Fa. Bandelin, Berlin). Für die Messung der pH-Werte wurde ein Microprozessor pH-mV-Meter pH 537 der Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland) mit der Elektrode Blue Line 16 pH der Firma Schott (Mainz, Deutschland) verwendet. Die Abtrennung ungelöster Substanz erfolgte mit einer Mikroliterzentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen).

Weitere Angaben zu Chemikalien und Geräten, die zur Charakterisierung verwendet wurden, erfolgen bei der Beschreibung der jeweiligen Methode.

### **2.2.1.2 Löslichkeit unter Zusatz von organischen Lösungsmitteln**

Es wurden Löslichkeitsversuche unter Zusatz organischer Lösungsmittel zu wässrigen Medien durchgeführt, um die optimalen Parameter und größtmöglichen Konzentrationen für Interaktions- und Biotransformationsversuche zu bestimmen. Dazu wurden unter Zuhilfenahme des Ultraschallbads und des Vibrationsmischers Stammlösungen von BP-7 in organischen Lösungsmitteln hergestellt und dann mit Aqua bidest oder Phosphatpuffer 100 mM verdünnt, wobei auf das Auftreten einer Trübung geachtet wurde. Als Cosolventien wurden DMSO, Methanol und Acetonitril verwendet, der pH-Wert des Phosphatpuffers variierte von pH 5,0 bis 7,0. Die BP-7-Konzentration wurde je nach Menge des zugesetzten Lösungsmittels von 0,1 bis 10 mM variiert.

### **2.2.1.3 Bestimmung der Löslichkeit in wässrigen Medien durch HPLC**

Die Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe:	Waters 510 Doppelkolbenpumpe (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor:	W486 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler:	WISP 710 Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator:	W 746 Data Module (Integrator) und NEC PC-Power-Mate 2 <sup>®</sup> , Maxima <sup>®</sup> Steuer- und Auswertesoftware (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase:	LiChrocart, LiChrospher 60, RP-select B, 5 µm, 250 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Vorsäule 4 x 4 mm
Mobile Phase:	Phosphatpuffer 100 mM pH 3,5: Acetonitril 60:40 (v/v)
Flussrate:	1 ml/min
Detektion:	$\lambda = 330 \text{ nm}$
Injektionsvolumen:	100 µl

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurden die Substanzen dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 100 µM) zugesetzt.

Die Substanzen (BP-3, BP-D3, BP-6, BP-D6, BP-7, BP-D7, BP-8, BP-D8, BP-9, BP-D9, BP-10, BP-D10, BP-11) wurden in je vier Ansätzen durch Behandlung mit

Ultraschallbad und Vibrationsmischer bei Raumtemperatur in Phosphatpuffer 100 mM pH 7,0 suspendiert und 12 Stunden zum Erreichen der Sättigungslöslichkeit bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dabei wurden die 11,12-Dihydro-Verbindungen in Form des Hydrochlorids und die Dehydro-Verbindungen als Perchlorate eingesetzt. Die Suspension wurde 10 min bei 12.000g zentrifugiert und 200 µl des Überstands nach Zugabe von 200 µl Acetonitril für die HPLC-Analytik verwendet. Alternativ erfolgte eine Filtration durch Spritzenfilter zur Abtrennung ungelöster Substanzpartikel, hier wurde das Filtrat nach Zugabe von Acetonitril für die HPLC-Analytik verwendet. Die Zugabe von Acetonitril erfolgte, um ein Ausfallen der gelösten Substanz im Probengefäß durch Temperaturschwankungen während der Analytik zu vermeiden.

## **2.2.2 pKa-Bestimmung**

### **2.2.2.1 Material und Geräte**

Bernsteinsäure, Dikaliumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Methanol, Phosphorsäure, Salzsäure, Triethylamin, Zitronensäure (Fa. Merck, Darmstadt), Acetonitril (Fa. Promochem, Wesel).

Die pH-Wert Bestimmung der Puffer erfolgte mit einem Microprozessor pH-mV-Meter pH 537 der Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland) mit der Elektrode Blue Line 16 pH der Firma Schott (Mainz, Deutschland), die Suspendierung der Ansätze mit einem IKA-Vibrax-VXR der Firma Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland). Für die Messung der UV-VIS-Absorption wurde ein Photodiodenarrayspektralphotometer (Fa. Beckman, München) verwendet. Die HPLC-Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters Breeze™ HPLC Systems.

### 2.2.2.2 Photometrische Bestimmung

Die Vorgehensweise entsprach der von Albert *et Serjeant* [1984] beschriebenen. Als Stammlösung wurde eine 200  $\mu\text{M}$  Lösung in Aqua bidest unter Zusatz von 1% Methanol verwendet. Die UV-VIS-Spektren, die in 0,1 N Salzsäure bei pH 1,0 gemessen wurden, dienten als Referenzspektren der reinen Salze und die in 0,1 N KOH bei pH 13,0 aufgenommen wurden, als Referenzspektren der reinen Base. Die Bestimmung wurde für BP-3, BP-7 und BP-11 durchgeführt. Als analytische Wellenlänge wurde 346 nm ausgewählt.

### 2.2.2.3 Bestimmung durch HPLC

Die Analytik erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Bartolini *et al.* [2002] unter Verwendung eines Waters Breeze™ HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe:	Waters 1525 binäre Pumpe (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor:	Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator:	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20) (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase:	LiChrocart, LiChrospher 60, RP-select B, 5 $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Vorsäule 4 x 4 mm
Mobile Phase:	A: 50 mM Triethylamin, 50 mM Phosphorsäure; pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 oder 7,0 B: Acetonitril 35, 40, oder 45 % (V/V)

Flussrate: 1 ml/min

Detektion:  $\lambda = 330 \text{ nm}$

Injektionsvolumen: 20  $\mu\text{l}$

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45  $\mu\text{m}$  Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

Die Substanzen BP-7, BP-D7, BP-8 und BP-D8 wurden in Fließmittel gelöst. Für jede Kombination aus den Parametern pH-Wert und Acetonitrilgehalt des Fließmittels wurde die Retentionszeit jeder Substanz dreimal vermessen.

## **2.2.3 Lipophilie**

### **2.2.3.1 Material und Geräte**

Butylbenzol, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethylbenzol, Kaliumdihydrogenphosphat, Pentylbenzol, p-Methylbenzaldehyd, Propylbenzol, Toluol, Uracil (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland), Hexylbenzol (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz), Heptylbenzol (Lancaster, Frankfurt, Deutschland).

Für die Messung der pH-Werte wurde ein Microprozessor pH-mV-Meter pH 537 der Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland) mit der Elektrode Blue Line 16 pH der Firma Schott (Mainz, Deutschland) verwendet.

Weitere Angaben zu Chemikalien und Geräten, die zur Charakterisierung verwendet wurden, erfolgen bei der Beschreibung der jeweiligen Methode.

### 2.2.3.2 Bestimmung durch HPLC

Die Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters Breeze™ HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe:	Waters 1525 binäre Pumpe (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor:	Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator:	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20) (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase:	Kromasil 100 RP-18, 5 µm, 60 x 4,6 mm (VDS-Optilab Chromatographie Technik GmbH, Berlin, Deutschland)
Mobile Phase:	A: Sörensen-Phosphatpuffer (SPP) 22 mM pH 7,4 B: Acetonitril
Flussrate:	1 ml/min
Gradient:	0 min 30% B 0 bis 64 min auf 74% B 64 bis 65 min auf 0% B 65 bis 75 min 0%B
Detektion:	λ= 210 nm (Standards) 330 nm (6-Aminobenzo[c]phenanthridine)



Injektionsvolumen: 50  $\mu$ l

Retentionszeiten:	Uracil	0,61 $\pm$ 0,01 min
	p-Methylbenzaldehyd	5,93 $\pm$ 0,05 min
	Toluol	14,07 $\pm$ 0,08 min
	Ethylbenzol	20,86 $\pm$ 0,08 min
	Propylbenzol	28,95 $\pm$ 0,08 min
	Butylbenzol	36,60 $\pm$ 0,07 min
	Pentylbenzol	44,02 $\pm$ 0,06 min
	Hexylbenzol	51,40 $\pm$ 0,06 min
	Heptylbenzol	58,77 $\pm$ 0,05 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45  $\mu$ m Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und 15 min im Ultraschallbad entgast.

Die Standards wurden in SPP : Acetonitril 1:1 gelöst und die Lösungen in gleichen Anteilen gemischt. Für jede untersuchte Substanz wurden zu 1000  $\mu$ l dieser Mischung 100  $\mu$ l 6-Aminobenzo[c]phenanthridinlösung im gleichen Medium gegeben und das Gemisch dreifach analysiert.

## 2.3 Ergebnisse und Diskussion

### 2.3.1 Löslichkeit

#### 2.3.1.1 Löslichkeit unter Verwendung von Cosolventien

Die Löslichkeit der 6-Aminobenzo[c]phenanthridine unter Zusatz organischer Lösungsmittel zu den wässrigen Medien sollte untersucht werden, um mit möglichst geringen Cosolvensmengen ausreichende Konzentrationen für Interaktions- und Biotransformationsstudien zu erzielen. Es wurden Stammlösungen verschiedener

Konzentrationen von BP-7 in den Lösungsmitteln DMSO, Methanol und Acetonitril hergestellt, die dann mit Aqua bidest oder 100 mM Phosphatpuffer versetzt wurden. Dabei wurde mit geringen Lösungsmittelanteilen begonnen und die Lösungsmittelkonzentrationen immer weiter erhöht, bis eine vollständige Lösung erreicht wurde. Generell mussten hohe Lösungsmittelkonzentrationen eingesetzt werden, um Lösungen mit BP-7-Konzentrationen im millimolaren Bereich zu erhalten. Der Zusatz von 50% Lösungsmittel erlaubte bei jedem pH-Wert sowohl mit DMSO als auch mit Methanol eine Lösung mit der Konzentration 10 mM BP-7 herzustellen. Bei weiterer Zugabe des wässrigen Mediums sank die Löslichkeit aber beträchtlich, 1% Methanol war für 0,2 mM BP-7 nicht ausreichend.

Durch die Basizität der untersuchten Verbindung konnte bei Verwendung des Puffers mit pH 5,0 die Cosolvensmenge reduziert werden, für eine BP-7-Konzentration von 0,2 mM waren bereits 2% DMSO ausreichend, bei Verwendung von Methanol wurden dagegen 10% benötigt. In einem solch sauren Milieu ist allerdings die Aktivität der meisten enzymatischen Umsetzungen stark vermindert. Bei Erhöhung des pH-Werts wurden deutlich höhere DMSO-Mengen benötigt, für pH 5,8 betragen diese 15% und für pH 6,6 20% DMSO für 0,2 mM BP-7. Bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes auf pH 7,0 und unter Beschränkung auf maximal 3% Lösungsmittel, die laut Literatur von den meisten Cytochrom P450-Isoenzymen toleriert werden können [Busby *et al.* 1999, Chauret *et al.* 1998, Easterbrook *et al.* 2001, Hickman *et al.* 1998], konnten nur geringere 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridinkonzentrationen erzielt werden. Die maximale Konzentration lag hier z.B. für BP-D7 bei 20  $\mu$ M.

### **2.3.1.2 Sättigungslöslichkeit in wässrigen Medien**

Die Kalibrierung erfolgte im Anschluss an die unter 2.2.1.3 beschriebene HPLC-Analytik durch Bestimmung der Flächen der durch das jeweilige 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridin resultierenden Signale. Die Funktionen der Kalibrierungen ( $R^2 > 0,99$ ;  $N=32$ ) waren in dem Konzentrationsbereich von 0,005 bis 100  $\mu$ M linear.

Die Werte, die bei Abtrennung der ungelösten Substanz durch Zentrifugation ermittelt wurden, zeigten sehr große Schwankungen (Tab. 2.1). Diese waren vermutlich auf eine ungenügende Abtrennung ungelöster Partikel zurückzuführen, die sich bei Zugabe des Acetonitrils lösten.

	Sättigungslöslichkeit in Phosphatpuffer pH 7,0 [ $\mu\text{M}$ ]	Relative Standardabweichung [%]
BP-3	6,3 $\pm$ 4,7	74,2
BP-D3	13,8 $\pm$ 13,5	97,8
BP-6	2,3 $\pm$ 0,4	18,1
BP-D6	4,1 $\pm$ 4,7	113,7
BP-7	20,3 $\pm$ 11,3	55,7
BP-D7	19,0 $\pm$ 23,2	122,5
BP-8	4,2 $\pm$ 3,3	77,0
BP-D8	1,2 $\pm$ 0,3	27,7
BP-9	10,5 $\pm$ 0,5	4,6
BP-D9	4,4 $\pm$ 2,4	54,8
BP-10	21,7 $\pm$ 4,21	19,4
BP-D10	11,7 $\pm$ 7,4	62,9
BP-11	30,4 $\pm$ 3,1	10,3

**Tab. 2.1: Sättigungslöslichkeiten nach Zentrifugation.**

Nach Abtrennung der ungelösten Partikel durch Filtration mit einem Spritzenfilter der Porengröße 0,2  $\mu\text{M}$  wurden deutlich niedrigere Sättigungskonzentrationen ermittelt (Tab. 2.2). Für die Dehydro-Verbindungen sowie BP-3 und BP-10 lagen die Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,005  $\mu\text{M}$ .

	Sättigungslöslichkeit in Phosphatpuffer pH 7,0 [ $\mu\text{M}$ ]	Relative Standardabweichung [%]
BP-6	0,008 $\pm$ 0,002	16,9
BP-7	0,016 $\pm$ 0,002	12,2
BP-8	0,093 $\pm$ 0,0	0,1
BP-9	0,066 $\pm$ 0,005	7,8

**Tab. 2.2: Sättigungslöslichkeiten nach Filtration durch Spritzenfilter.**

Die Tatsache, dass für die maximal ungesättigten Verbindungen durchweg geringere Sättigungslöslichkeiten als für ihre dihydrierten Derivate ermittelt wurden, entsprach den Beobachtungen während der Biotransformationsstudien und lässt sich mit der höheren Lipophilie der aromatischen Verbindungen (siehe 2.3.3) in Einklang bringen. Die nach Filtration ermittelten Werte lagen zum großen Teil unterhalb der Bestimmungsgrenze der zur Verfügung stehenden HPLC-Analytik. Obwohl es sich bei den 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridinen um sehr schwer wasserlösliche Verbindungen handelt, scheinen die so erhaltenen Werte zu gering. Möglicherweise wurden durch Absorption an das Filtermaterial zu kleine Werte ermittelt. Es kann daher nur festgehalten werden, dass die Sättigungslöslichkeit der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine unterhalb von 1  $\mu\text{M}$  liegt, wozu auch die Ergebnisse der Untersuchungen der Firma Aventis passen, die im Rahmen einer Kooperation für vier der Verbindungen für die Löslichkeit lediglich Werte von < 6,25  $\mu\text{M}$  feststellen konnten.

### 2.3.2 Bestimmung der pKa-Werte

Die Membrangängigkeit und damit die Absorption chemischer Substanzen wird stark durch ihre Ladung beeinflusst, weswegen die Bestimmung der Säurestärke und damit die Abschätzung des Protonierungsgrads ein wichtiger Bestandteil der präklinischen

Charakterisierung ist. Als Maß für die Säurestärke einer Substanz wird meistens der pKa-Wert angegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst das photometrische Verfahren zur pKa-Bestimmung nach Albert *et* Serjeant [1984] eingesetzt. Die Voraussetzung für diese Art der Bestimmung ist die Existenz verschiedener UV-VIS-Spektren für die neutrale und die ionisierte Form des Moleküls. Zunächst wurde mit einem Spektralphotometer für jede untersuchte Substanz ein Spektrum in einem pH-Bereich aufgenommen, bei dem entweder die reine ionisierte oder die reine neutrale Form des Moleküls vorlag. Für die reine ionisierte Form wurde pH 1 durch 0,1 N HCl gewählt, wogegen das Medium für die reine neutrale Form 0,1 N KOH mit pH 13 war. Für alle Untersuchungen wurde eine methanolische Stammlösung von BP-3, BP-7 oder BP-11 verwendet, die mit dem jeweiligen Medium auf einen Methanolgehalt von 1% verdünnt wurde. Aus den Differenzspektren dieser Messungen wurde die Wellenlänge bestimmt, bei der der größte Absorptionsunterschied auftrat, diese Wellenlänge wurde als analytische Wellenlänge verwendet. Für die analytische Wellenlänge wurden die Absorptionen der ionisierten und der neutralen Form bestimmt.

Für die analytische Wellenlänge  $\lambda = 346$  nm wurden die Absorptionen in Puffern verschiedener pH-Werte gemessen und aus den Absorptionsdifferenzen und dem pH-Wert der Lösung der pKa-Wert berechnet. Allerdings traten bei den Untersuchungen Probleme durch die schlechte Wasserlöslichkeit der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine auf, die zu Trübungen in den Messlösungen führten. Dadurch wiesen die ermittelten Werte große Schwankungen auf, außerdem sind systematische Fehler zu befürchten. Da sich die untersuchten Strukturen nur durch den Substituenten in 11-Position unterscheiden, lagen die Werte erwartungsgemäß nahe beieinander (Tab. 2.3).

	pKa-Wert
BP-3	6,8 ± 0,5
BP-7	6,5 ± 0,4
BP-11	6,7 ± 0,2

**Tab. 2.3: pKa-Werte bestimmt durch spektralphotometrisches Verfahren.**

Eine Weiterentwicklung des spektralphotometrischen Verfahrens stellt die automatisierte Messung mit einem SGA Profiler (Fa. Sirius Analytical Instruments, East Sussex, Großbritannien) dar. Dabei erfolgt eine permanente Injektion einer DMSO-Lösung der zu untersuchenden Verbindung in einen linearen pH-Gradienten, der durch Mischen zweier Puffer in einem Flusssystem erzeugt wird. Das UV-Absorptionsverhalten der Verbindung in Abhängigkeit vom pH-Wert wird für 30 Wellenlängen simultan untersucht und der pKa-Wert über die Größe der Absorptionsänderungen berechnet. Im Rahmen einer Kooperation wurde dieses Verfahren für vier der Verbindungen (BP-7, BP-D7, BP-8, BP-D8) von der Firma Aventis durchgeführt. Auch hier ergaben sich Probleme aus der schlechten Wasserlöslichkeit, für BP-D7 konnte kein Ergebnis erhalten werden, da die Substanz im Messsystem ausgefallen war. Die ermittelten Werte (Tab. 2.4) sind insgesamt kleiner als die im spektralphotometrischen Verfahren erhaltenen.

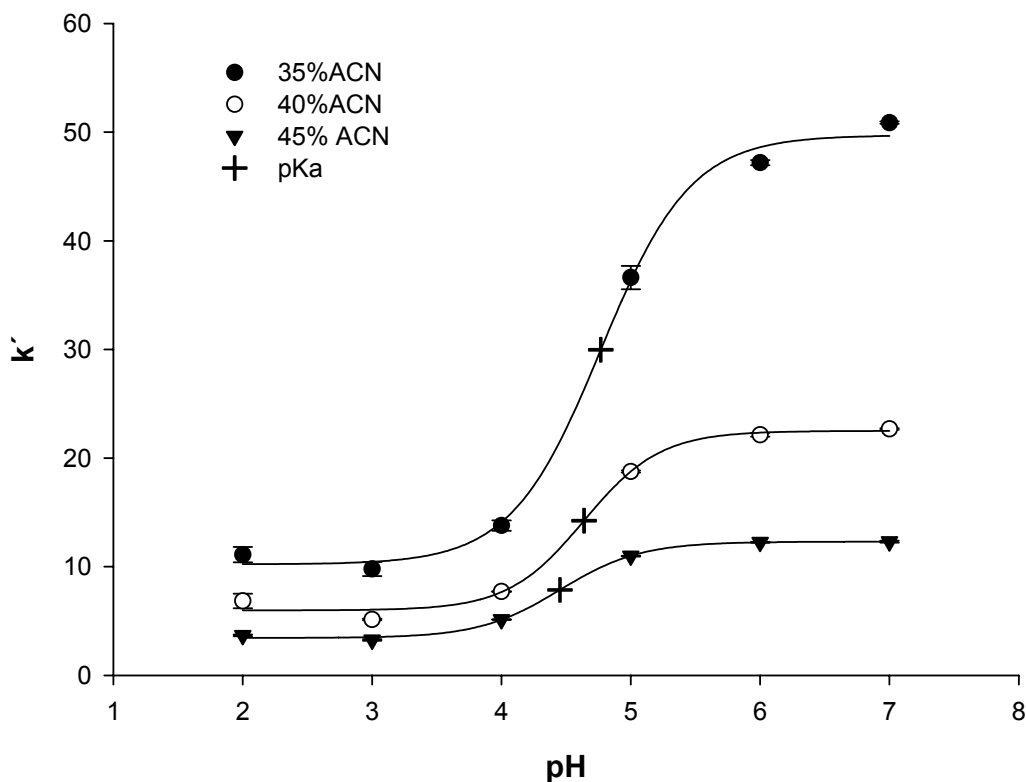
	pKa-Wert
BP-7	5,7
BP-8	5,3
BP-D8	4,7

**Tab. 2.4: pKa-Werte bestimmt durch automatisiertes spektralphotometrisches Verfahren.**

Nachdem die schlechte Wasserlöslichkeit die Bestimmung des pKa-Wertes durch photometrische Verfahren beeinträchtigt hatte, wurde als Alternative die Entwicklung einer HPLC-Methode auf der Basis eines Literaturverfahrens herangezogen [Bartolini *et al.*, 2002]. Dieser Bestimmung liegt das Prinzip zugrunde, dass der Retentionskoeffizient  $k'$  für ionisierbare Substanzen pH-abhängig ist. Diese Eigenschaft wird häufig für pKa-Bestimmungen ausgenutzt [Manderscheid *et Eichinger*, 2003; Kaliszan *et al.*, 2002].

Somit konnte durch den Einsatz von verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase der pKa-Wert bestimmt und unter Variation des Lösungsmittelgehalts auf ein rein wässriges Medium extrapoliert werden. Die Struktur der 6-Aminobenzo[c]-

phenanthridine und die Ergebnisse der photometrischen Bestimmung ließen eine relativ schwache Basizität vermuten, die Messungen wurden daher unter Verwendung einer RP-18-Säule und 50 mM Trimethylammoniumphosphat als Puffer im pH-Bereich von 2,0 bis 7,0 durchgeführt. Der Acetonitril-Gehalt des Fließmittels wurde von 35 - 45% variiert. Ein geringerer Gehalt des Fließmittels an Acetonitril wäre zwar wünschenswert gewesen, war aber aufgrund der stark verlängerten Retentionszeiten nicht möglich. Durch Korrelation der  $k'$ -Werte und der pH-Werte des Fließmittels ergaben sich für jede der untersuchten Substanzen Kurven, die exemplarisch für BP-8 dargestellt sind (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Korrelation der Retentionskoeffizienten  $k'$  gegen pH für BP-8 in Acetonitril-Puffer-Mischungen. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen.

Mit Hilfe von sigmoidaler Regression (SigmaPlot SPSS Science Marketing) konnte über den Wendepunkt für jede Acetonitrilkonzentration der pKa-Wert bestimmt werden. Anschließend erfolgte die Extrapolation der pKa-Werte auf 0% Acetonitril für

ein rein wässriges Medium. Das Verfahren fand Anwendung für die *in vivo* am besten wirksamen Substanzen, im einzelnen BP-7, BP-D7, BP-8 und BP-D8. Die erhaltenen pKa-Werte (Tab. 2.5) lagen für die 11, 12-dihydrierten Verbindungen bei 5,9 und für die maximal ungesättigten Verbindungen bei etwa 5,1.

	pKa-Wert
BP-7	5,9 ± 0,3
BP-D7	5,0 ± 0,4
BP-8	5,9 ± 0,2
BP-D8	5,3 ± 0,3

**Tab. 2.5: pKa-Werte bestimmt durch HPLC- Verfahren.**

Obwohl die schlechte Wasserlöslichkeit den Einsatz der photometrischen Verfahren limitierte, stimmten die Ergebnisse der verschiedenen Methoden gut überein. Vor allem das HPLC-Verfahren und die automatisierte spektralphotometrische Messung lieferten ähnliche Ergebnisse. Die untersuchten Verbindungen sind nur schwach basisch, obwohl sie eine amidinähnliche Struktur enthalten. Diese Tatsache kann auf eine Delokalisierung der freien Elektronenpaare des Stickstoffs über das Ringgerüst zurückgeführt werden, welche bei den maximal ungesättigten Verbindungen besonders ausgeprägt ist, wodurch die Basizität im Vergleich zu den 11,12-Dihydroverbindungen weiter abnimmt. Die Verbindungen verhalten sich demnach eher als aminosubstituierte aromatische Stickstoffheterozyklen als als Amidine. Keene *et* Tissington [1965] bestimmten durch spektralphotometrische Messungen pKa-Werte für verschiedene substituierte Aminophenanthridine. Dabei sank der pKa-Wert von pKa = 7,2 für 6-Aminophenanthridin durch die Anellierung eines weiteren Benzolrings auf pKa = 6,6 für 6-Aminobenzo[*a*]- und 6-Aminobenzo[*k*]phenanthridin. Diese Werte entsprechen den eigenen Ergebnissen der spektralphotometrischen Messungen für die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine, während die anderen Verfahren etwas niedrigere Werte lieferten. Es kann erwartet werden, dass alle untersuchten Verbindungen bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 zum überwiegenden Teil



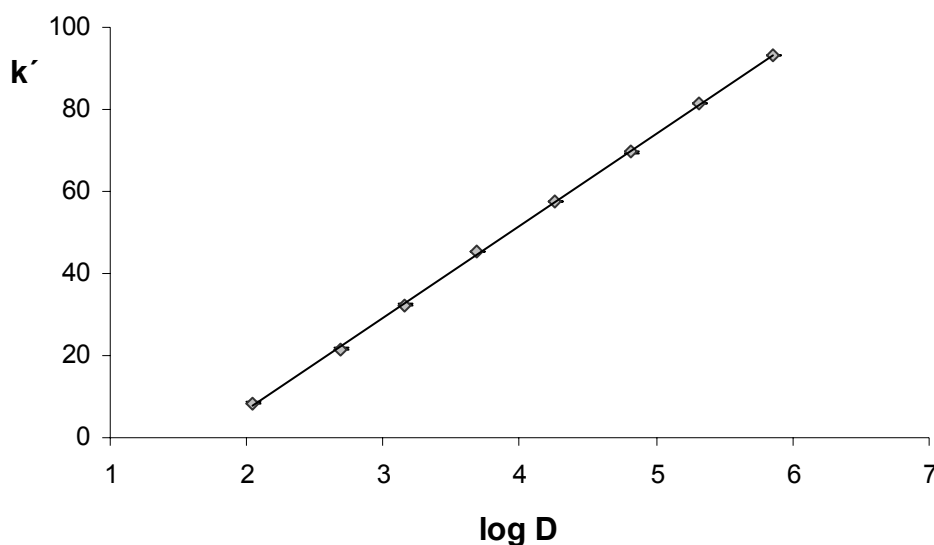
in ihrer Neutralform vorliegen werden. Dadurch wird zwar eine schlechte Löslichkeit in Körperflüssigkeiten zu befürchten sein, es ist aber durch die fehlende Ladung eine gute Membrangängigkeit zu erwarten.

### 2.3.3 Lipophilie

Die Lipophilie einer Verbindung ist ein wichtiger Parameter für die Verteilung dieser Verbindung im Organismus. Damit hat sie einen entscheidenden Effekt auf die Bioverfügbarkeit, da sie sowohl die Wasserlöslichkeit als auch die Membrangängigkeit beeinflusst. Unter der Vielzahl von Verfahren zur Bestimmung der Lipophilie hat sich die Bestimmung des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $\log P$ -Wert) als Standardbezugssystem durchgesetzt. Alternativ wird oft der Verteilungskoeffizient für Oktanol/Phosphatpuffer ( $\log D$ -Wert) angegeben, um den physiologischen Bedingungen Rechnung zu tragen. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine war eine klassische Bestimmung des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten über Ausschütteln nicht möglich, ebenso wenig die Anwendung einer HPLC-Methode basierend auf einer mit einem Oktanolfilm überzogenen stationären Phase. Stattdessen erfolgte die Bestimmung über ein Reversed-Phase-HPLC-Verfahren mit Gradientenelution wie es z.B. von Krass *et al.* [1997] für die Bestimmung der Lipophilie beschrieben wurde. Dabei stellt das RP-Material in der Säule die lipophile und das Fließmittel die hydrophile Phase dar. Für die Ermittlung der  $\log D$ -Werte werden Standardsubstanzen mit bekannter Lipophilie verwendet, deren  $\log D$ -Werte mit den aus den Retentionszeiten berechneten  $k'$ -Werten korreliert werden. Mit Hilfe der sich aus der Korrelationsanalyse ergebenden Geradengleichungen und den experimentell bestimmten  $k'$ -Werten der Verbindungen war es möglich, die  $\log D$ -Werte zu berechnen. Als wässriger Anteil der mobilen Phase wurde ein Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 gewählt, um zum einen sicherzustellen, dass die schwach basischen Verbindungen in ihrer neutralen Form vorlagen und um zum anderen unter möglichst physiologisch relevanten Bedingungen zu arbeiten.

Unter Einsatz dieses Verfahrens wurden log D-Werte für 54 der bisher synthetisierten 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine bestimmt, um nicht nur die Eigenschaften bereits vorhandener Verbindungen zu beurteilen, sondern auch anhand von Struktur-Lipophilie-Beziehungen Aussagen für künftige Strukturen treffen zu können.

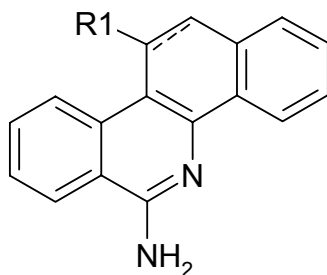
In Abbildung 2.2 ist das Ergebnis der Korrelationsanalyse beispielhaft für BP-7 dargestellt.



**Abb. 2.2: Ergebnis der Korrelationsanalyse der bekannten log D-Werte der Standards mit den ermittelten  $k'$ -Werten für BP-7. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen.**

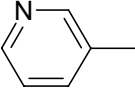
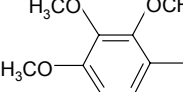
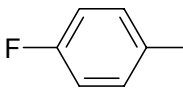
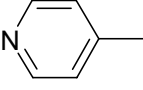
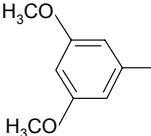
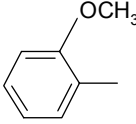
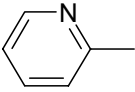
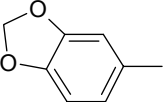
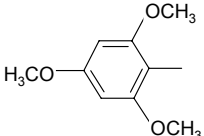
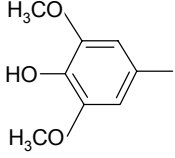
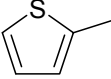
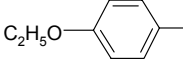
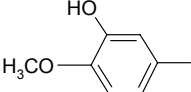
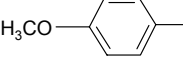
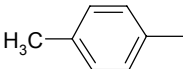
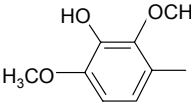
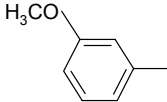
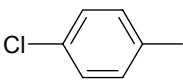
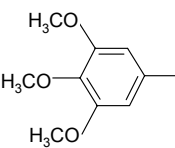
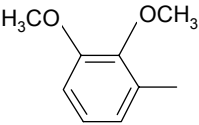
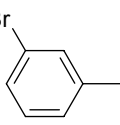
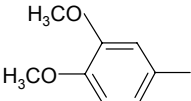
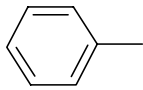
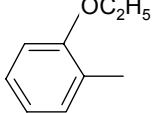
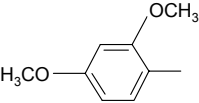
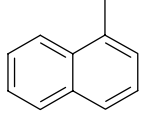
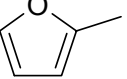
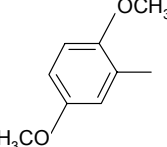
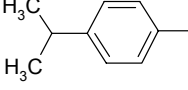
Die Funktionen der Korrelationsanalysen ( $R^2 > 0.999$ ,  $N=24$ ) waren für alle Messungen in dem log D-Bereich von 2,0 bis 6,0 linear.

Die untersuchten Verbindungen umfassten verschiedene Substituenten R1 in 11-Position des 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridingerüsts, darunter methoxylierte, ethoxylierte, alkylierte und halogenierte Phenylringe, aber auch verschiedene Heterozyklen. Die Ergebnisse für die maximal ungesättigten Verbindungen können Tabelle 2.6, die Ergebnisse der 11,12-Dihydro-Derivate Tabelle 2.7 entnommen werden.



R1	log D	R1	log D	R1	log D
	<b>BP-D26</b> 2,35		<b>BP-D9</b> 3,93		<b>BP-D1</b> 4,46
	<b>BP-D27</b> 2,35		<b>BP-D12</b> 3,95		<b>BP-D32</b> 4,51
<b>-H</b>	<b>BP-D5</b> 3,24		<b>BP-D3</b> 4,06		<b>BP-D23</b> 4,52
	<b>BP-D35</b> 3,43		<b>BP-D14</b> 4,20		<b>BP-D16</b> 4,76
	<b>BP-D21</b> 3,67		<b>BP-D22</b> 4,23		<b>BP-D29</b> 4,93
	<b>BP-D6</b> 3,72		<b>BP-D2</b> 4,29		<b>BP-D33</b> 4,98
	<b>BP-D7</b> 3,72		<b>BP-D18</b> 4,31		<b>BP-D34</b> 5,03
	<b>BP-D8</b> 3,86		<b>BP-D28</b> 4,33		<b>BP-D31</b> 5,59

**Tab. 2.6:** 6-Aminobenzo[c]phenanthridine geordnet nach Lipophilie.

R1	log D	R1	log D	R1	log D
	<b>BP-26</b> 2,21		<b>BP-8</b> 3,50		<b>BP-</b> 3,77
	<b>BP-25</b> 2,34		<b>BP-22</b> 3,54		<b>BP-18</b> 3,80
	<b>BP-27</b> 2,46		<b>BP-14</b> 3,54		<b>BP-21</b> 3,86
	<b>BP-11</b> 2,56		<b>BP-</b> 3,55		<b>BP-16</b> 3,98
	<b>BP-15</b> 2,82		<b>BP-2</b> 3,58		<b>BP-</b> 4,04
	<b>BP-20</b> 2,86		<b>BP-</b> 3,59		<b>BP-</b> 4,15
	<b>BP-7</b> 3,07		<b>BP-</b> 3,62		<b>BP-</b> 4,15
	<b>BP-6</b> 3,08		<b>BP-1</b> 3,69		<b>BP-23</b> 4,24
<b>-H</b>	<b>BP-5</b> 3,12		<b>BP-3</b> 3,74		<b>BP-</b> 4,24
	<b>BP-9</b> 3,37		<b>BP-12</b> 3,74		<b>BP-</b> 4,63

Tab. 2.7: 6-Amino-11, 12-dihydro-benzo[c]phenanthridine geordnet nach Lipophilie.

Die log D-Werte der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine lagen je nach Substituent in 11-Position zwischen 2,21 und 4,63 für die 11,12-Dihydro-Verbindungen und zwischen 2,35 und 5,59 für die maximal ungesättigten Strukturen. Erwartungsgemäß zeigten dabei vor allem pyridylsubstituierte Verbindungen oder solche mit Hydroxygruppen am Phenylsubstituenten eine niedrige Lipophilie. Während die Lipophilie der methoxyphenylsubstituierten Strukturen stark vom Substitutionsmuster abhängig war, zeigten die Verbindungen mit ethoxylierten, unsubstituierten und halogenierten Phenylsubstituenten durchgehend eine hohe Lipophilie. Bei den mono-, di- und trimethoxylierten Phenylsubstituenten fällt auf, dass eine Substitution in 2'-Position bei den 11,12-Dihydro-Verbindungen eine deutliche Erhöhung der Lipophilie bedeutet. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Moleküle durch eingeschränkte Drehbarkeit um die 11-1'-Bindung sterisch anspruchsvoller werden. Außerdem wird deutlich, dass die maximal ungesättigten Verbindungen nahezu durchweg lipophiler als die 11,12-Dihydro-Derivate sind.

Die ermittelten Werte lagen unter den Werten, die über eine Verteilungschromatographie bestimmt wurden. Für die Verteilungschromatographie wurde eine mit Oktanol gesättigte C1-Säule als stationäre und oktanolgesättigter Phosphatpuffer als mobile Phase verwendet. Die Auswertung erfolgte auch hier mit Hilfe von Standardsubstanzen bekannter Lipophilie. Allerdings konnte dabei im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Aventis für BP-7, BP-D7, BP-8 und BP-D8 lediglich festgestellt werden, dass die log D-Werte >4 waren. Für einen Vergleich der Substanzen untereinander leistete daher das Reversed-Phase-HPLC-Verfahren mit Gradientenelution bessere Dienste.

## **2.4 Zusammenfassung und Ausblick**

Im Rahmen dieser Studie konnten einige wichtige physikochemische Eigenschaften der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine näher charakterisiert werden. Nachdem in vorhergegangenen Arbeiten [Kock, 2003; Wolschendorf, 2000] bereits orientierende

Untersuchungen zur Löslichkeit der Substanzen in wässrigen Medien durchgeführt worden waren, konnten diese Daten nun durch umfangreiche Studien exakter bestimmt werden. Für visuelle Prüfung wurden Werte von 15  $\mu\text{M}$  Sättigungslöslichkeit für BP-11 in isotonischer Kochsalzlösung angegeben, während die Löslichkeit von BP-7 und BP-8 unterhalb von 9  $\mu\text{M}$  lag [Kock, 2003; Wolschendorf, 2000]. Vergleichbare Werte wurden für Ethanol/Wasser 1:10 bestimmt [Kock, 2003; Wolschendorf, 2000]. Dies widerspricht eigenen Untersuchungen, da ein Zusatz von 10 % Lösungsmittel bereits eine deutliche Erhöhung der Löslichkeit zeigte. Diese Differenzen sind möglicherweise auf die verschiedenen Verfahren zurückzuführen und beruhen damit eher auf Unterschieden in der Lösungsgeschwindigkeit als auf unterschiedlichen Sättigungslöslichkeiten.

Die Ergebnisse, die nun durch den Einsatz einer HPLC-Analytik erhalten wurden, zeigen je nach Vorgehen zur Abtrennung ungelöster Partikel große Unterschiede. Während die Sättigungskonzentrationen nach Zentrifugation im unteren mikromolaren Bereich und damit in der Größenordnung bisheriger Ergebnisse liegen, sinken die Werte nach Filtration auf nanomolare Konzentrationen ab. Dieses Phänomen kann mit Absorption der gelösten Substanzen an das Filtermaterial erklärt werden. Alle Untersuchungen führen aber zu dem Ergebnis, dass die Wasserlöslichkeit der bisher synthetisierten 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine als sehr gering einzuschätzen ist. Eine Weiterentwicklung der Struktur der Verbindungen, die bei gleicher Wirksamkeit eine bessere Löslichkeit gewährleistet, ist daher zu wünschen.

Weitere Untersuchungen wurden zur Bestimmung der Lipophilie und des pKa-Werts durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Verbindungen trotz einer zyklischen Amidinstruktur nur schwach basisch sind. Vor allem bei den maximal ungesättigten Verbindungen werden offensichtlich die freien Elektronenpaare der Stickstoffatome durch mesomere Effekte über das Ringsystem delokalisiert, wodurch die Basizität abnimmt. Die Werte liegen im Bereich aminosubstituierter Stickstoffheterocyclen, wie 6-Aminobenzo[*a*]- und 6-Aminobenzo[*k*]phenanthridin [Keene *et* Tissington, 1965]. Die pKa-Werte von etwa 5 - 6 lassen erwarten, dass die Substanzen bei oraler Gabe im Magen noch in protonierter Form vorliegen, bei der

Passage in das Duodenum aber bereits deprotoniert würden. Damit würde im größten Teil des Gastrointestinaltrakts die ungeladene und damit besser resorbierbare Form vorliegen. Weniger günstige Aussichten bestehen dagegen für die parenterale Applikation. Wegen der großen applizierten Volumina müssen Infusionen auf einen physiologischen pH-Wert eingestellt werden, in diesem pH-Bereich ist die Löslichkeit der Verbindungen gering. Hier wird bereits an Verbesserungen durch Prodrug-Prinzipien gearbeitet.

Die Ergebnisse für die Lipophiliebestimmung sind beim Vergleich der verwendeten Verfahren untereinander widersprüchlich. Während durch das Reversed-Phase-HPLC-Verfahren mit Gradientenelution für alle untersuchten Substanzen separate log D-Werte bestimmt werden konnten, zeigte die Verteilungschromatographie ein anderes Bild. Die Verteilungschromatographie ergab für die vier untersuchten Verbindungen (BP-7, BP-D7, BP-8, BP-D8) lediglich, dass die log D-Werte größer als vier sind. Dagegen wiesen die Werte des anderen Verfahrens eine Differenzierung von 3,07 für BP-7 bis 3,86 für BP-D8 und damit um immerhin fast eine Einheit auf. Auch wenn die Werte des Gradientenelutionsverfahrens insgesamt zu niedrig sein sollten, zeigen sie deutlich die günstige Auswirkung bei fehlender Substitution in 2'-Position und können somit die Planung weiterer Verbindungen erleichtern.

Eine Zusammenfassung gängiger Kriterien für die Beurteilung neuer Arzneistoffe hinsichtlich ihrer oralen Verfügbarkeit stellt die von Lipinski *et al.* [2001] aufgestellte „Rule of five“ dar. Dabei wird davon ausgegangen, dass Substanzen wahrscheinlich eine schlechte orale Bioverfügbarkeit zeigen werden, wenn zwei oder mehr der folgenden Kriterien erfüllt werden: mehr als fünf Wasserstoff-Brücken-Donatoren; Molekulargewicht >500 g/mol; log P-Wert >5; mehr als 10 Stickstoff- und Sauerstoffatome als H-Brücken-Akzeptoren. Fasst man die Daten der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine unter diesen Aspekten zusammen, kommt man zu einer positiven Beurteilung. Das Molekulargewicht von BP-D7 als dem bis jetzt *in vivo* am besten wirksamen Vertreter der Substanzklasse beträgt als freie Base 410 g/mol und ist damit noch deutlich unter der Grenze 500 g/mol. Lediglich als Phenanthridiniumperchlorat liegt es mit 511 g/mol etwas darüber, in wässriger Lösung wird aber eine Dissoziation in die Ionen erfolgen. Ebenso liegen die

Molekulargewichte aller bisher auf Wirksamkeit getesteten Verbindungen bei etwa 400 g/mol.

An Wasserstoffbrücken-Donatoren enthalten alle Verbindungen die exocyclische Aminogruppe in 6-Position, lediglich bei einem Substitutionsmuster mit Hydroxygruppen am Phenylring kommt noch ein weiterer dazu. Die Summe der Stickstoff- und Sauerstoffatome beträgt je nach Substituent in 11-Position maximal fünf. Auch die Beurteilung dieser beiden Kriterien zeigt also positive Ergebnisse für die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine.

Die Entscheidung über das Kriterium der Lipophilie hängt von der Auswahl des Verfahrens ab. Die Verteilungschromatographie ermöglicht insofern keine Aussage, als nicht bestimmt werden konnte, um wieviel die log D-Werte oberhalb von 4 liegen. Dagegen haben die Verbindungen nach den Ergebnissen der Gradientenelution nahezu alle einen log D-Wert <5 und erfüllen daher auch das letzte Kriterium der „Rule of five“ nicht. Abgesehen vom noch zu lösenden Problem der schlechten Wasserlöslichkeit ist damit eine gute orale Bioverfügbarkeit der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine zu erwarten.

Vorrangiges Ziel weiterer Arbeiten sollte somit die Verbesserung der Wasserlöslichkeit sein. Nach erfolgreichen Strukturveränderungen mit dem erwünschten Effekt müsste dann für die neuen Verbindungen die hier durchgeführte Charakterisierung wiederholt werden. Interessant wären auch Untersuchungen zur Proteinbindung der Substanzen, um die Wahrscheinlichkeit pharmakokinetischer Interaktionen im Bereich der Verteilung abschätzen zu können.



### **3 IN VITRO-INTERAKTIONSSCREENING**

#### **3.1 Einleitung und Zielsetzung**

Ein entscheidendes Kriterium für die Beurteilung neuer Arzneistoffe ist neben der Wirksamkeit die Interaktion mit anderen, bereits etablierten Arzneistoffen. Interaktionen sind generell durch pharmakodynamische und/oder pharmakokinetische Prozesse möglich, wobei pharmakokinetische Interaktionen durch gegenseitige Beeinflussung von Absorption, Verteilung und Elimination auftreten können. Im Bereich der Elimination werden Interaktionen vor allem im Bereich des Metabolismus beobachtet. Neue Substanzen können dabei durch Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme den Abbau von Arzneistoffen beschleunigen und damit ihre Wirksamkeit verringern oder durch Inhibition den Abbau verlangsamen, wodurch toxische Plasmaspiegel erreicht werden, die im schlimmsten Fall zum Tode führen können. Daher empfehlen sowohl die europäische Arzneimittelaufsichtsbehörde EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) als auch die amerikanische FDA (Food and Drug Administration) eine frühzeitige *in vitro*-Testung [CPMP, 1997; FDA, 1997]. Für die Testung auf Inhibition werden dazu Inkubationen der neuen Substanz mit gepoolten humanen Lebermikrosomen und Markersubstraten durchgeführt. Dabei sollen die sieben Isoenzyme des CYP 450-Systems getestet werden, die den größten Anteil an der Biotransformation von Arzneistoffen haben, dies sind im einzelnen CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 und 3A4.

Die Testung auf Interaktion war für die Klasse der 6-Aminobenzo-[c]phenanthridine von besonderer Bedeutung, da bereits für einige Phenanthridinalkaloide ein Einfluss auf den Metabolismus bekannter Arzneistoffe festgestellt wurde [Dalvi *et al.*, 1981; Peeples *et al.*, 1982].

Die beiden 6-Aminobenzo[c]phenanthridinderivate für das *in vitro*-Interaktionsscreening wurden unter dem Aspekt eines bekannten potentiellen Wirkmechanismus und der Wirksamkeit ausgewählt. Für BP-11 wurde in Untersuchungen der Universität Kaiserslautern die Fähigkeit zur Hemmung der Tubulinpolymerisation und

für BP-D7 die Hemmung der Topoisomerasen I und II festgestellt. Zudem ist BP-D7 diejenige Substanz, die bisher sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die besten Ergebnisse gezeigt hat. Die Testung auf Inhibition sollte für BP-D7 und BP-11 unter Verwendung der von der EMEA empfohlenen Markerreaktionen für CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 und 3A4 und Vergleichsinhibitoren [CPMP, 1997] durchgeführt werden. Dazu wurden nach Gewinnung humaner Lebermikrosomenpools und Entwicklung geeigneter HPLC-Methoden die jeweiligen Markersubstrate unter Zusatz von Lösungen verschiedener Konzentrationen der Verbindungen inkubiert und per HPLC nach Erstellung von Kalibrierung und Wiederfindung die Umsatzraten der Enzyme bestimmt. Die schlechte Wasserlöslichkeit der Phenanthridine bedingte dabei einen Zusatz von organischen Cosolventien, wobei je nach Isoenzym entsprechend der Literatur Einschränkungen in Bezug auf Art und Konzentration zu beachten waren [Busby *et al.*, 1999; Chauret *et al.*, 1998; Easterbrook *et al.*, 2001; Hickman *et al.*, 1998]. Daher wurde jeweils das Cosolvens gewählt, das laut Literatur in einer Konzentration von 3% eine möglichst geringe Hemmwirkung zeigt. BP-D7 und BP-11 wurden in Konzentrationen von 5, 10 und 20 µM eingesetzt, da in vorausgegangenen Untersuchungen zur Löslichkeit 20 µM als maximal mögliche Konzentration für BP-D7 bei 3% Lösungsmittelzusatz ermittelt wurde. Als Vergleich wurden ebenfalls Inkubationen mit bekannten Inhibitoren der Isoenzyme durchgeführt.

## **3.2 Material und Methoden**

### **3.2.1 Humane Lebermikrosomen**

#### **3.2.1.1 Material und Geräte**

Dikaliumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Saccharose, Salzsäure (Fa. Merck, Darmstadt). Natriumdithionit, EDTA (Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz). BCA Protein Assay Reagenz (Fa. Pierce, Rockford, IL, USA). Polystyrol-Halbmikroküvetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht).

## Geräte

Vibrationsmischer IKA-Vibrax VXR (Fa. Jahnke & Kunkel, Staufen). Teflon-Glas-Gewebehomogenisator (Fa. Braun, Melsungen). Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E mit Rotor JA 10 und JA14, Ultrazentrifuge L7-65 mit Rotor 45 Ti (Fa. Beckmann, München). Metrohm pH-Meter E632 (Fa. Metrohm, Filderstadt) mit Elektroden Flushtrode P und Biotrode (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Mikroliterzentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen). Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel). Zweistrahlphotometer Uvikon 930 (Fa. Kontron Instruments, Neufahrn). Ultraschallbad Sonorex Super (Fa. Bandelin, Berlin). Durchflusshomogenisator (Eigenbau der Universität Austin, Texas, USA).

Weitere Angaben zu Chemikalien und Geräten, die zur Bereitung und Charakterisierung der Enzymquellen verwendet wurden, erfolgen bei der Beschreibung der jeweiligen Methode.

### **3.2.1.2 Gewinnung der Mikrosomenfraktionen durch fraktionierte Ultrazentrifugation**

Humanes Lebergewebe wurde meist von Carcinom-Patienten der Chirurgie der Uniklinik Kiel zur Verfügung gestellt, die sich in der Regel einer Hemihepatektomie unterziehen mussten. Das Vorgehen wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität genehmigt, zudem wurde zuvor das Einverständnis der Patienten eingeholt. Die Leberfragmente, die keine pathogenen Anteile aufwiesen, wurden nach der Sektion für den Transport in eisgekühlten Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 überführt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten bei einer Temperatur zwischen 0 und 4°C, um Denaturierungsprozesse der Enzyme zu vermindern.

Zunächst wurde die Lebertteile klein geschnitten und mehrmals mit einer 150 mM Kaliumchloridlösung gewaschen. Anschließend wurden die Fragmente mit einem Teflon/Glas-Gewebehomogenisator in einem gekühlten Puffer (100 mM Kaliumphosphat, 250 mM Saccharose, pH 7,4) zu einer Suspension verarbeitet, die neben zerstörten Zellstrukturen und Zellorganellen das Cytosol und die Mikrosomen enthielt.

Die Gewinnung der Mikrosomen erfolgte durch differentielle Ultrazentrifugation [Clement *et al.*, 1996]. Dazu wurde das Homogenisat nach Überprüfung und Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,4 zur Gewinnung des 9000g-Überstandes für 30 min in der Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E mit dem Rotor JA 10 zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde abdekantiert, zur Entfernung von Lipiden durch Verbandmull kolliert und anschließend 60 min bei 100.000 g mit dem Rotor 45 Ti in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der cytosolhaltige 100.000g- Überstand wurde entfernt und das resultierende Pellet mit einer 100 mM Natriumpyrophosphatlösung gewaschen. Die erhaltene Suspension wurde erneut 60 min bei 100.000g zentrifugiert und das daraus entstandene mikrosomale Pellet in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 unter Zusatz von 20% (G/V) Saccharose resuspendiert. Im Anschluss an die Herstellung wurden die Lebermikrosomen bei –80°C gelagert. Zur Verwendung für die Interaktionsstudien wurden Lebermikrosomen fünf bzw. sechs verschiedener Spender aufgetaut, vereinigt und die erhaltenen gepoolten Lebermikrosomen charakterisiert.

### **3.2.1.3 Charakterisierung der Mikrosomenfraktionen**

#### 3.2.1.3.1 Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung wurde nach der BCA-Methode in Anlehnung an die Methode von Smith *et al.* [1985] durchgeführt. Als Arbeitsreagenz wurde das BCA-Protein-Assay-Reagenz von der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) mit folgender Zusammensetzung verwendet: Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, 2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure, Natriumtartrat und Kupfersulfat in 1 M Natronlauge. Das Reagenz wurde für jede Proteinbestimmung laut Anweisung des Herstellers frisch zubereitet und nach folgendem Schema in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben.

	<b>Proteinprobe</b>	<b>Blindwert</b>
Proteinlösung	x µl	-
Aqua bidest.	100-x µl	100 µl
BCA-Reagenz	900 µl	900 µl

Die Ansätze wurden 20 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert, in Eiswasser abgestoppt und innerhalb von 3 min gegen den Blindwert bei 562 nm vermessen. Die Ermittlung des Proteingehalts erfolgte über eine Kalibriergerade, die unter identischen Bedingungen durch Verwendung einer Rinderserumalbumin-standardlösung der Firma Pierce erhalten wurde.

#### 3.2.1.3.2 Bestimmung des Cytochrom P450 Gehalts

Die Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von Omura *et Sato* [1964], indem das Differenzspektrum des reduzierten Cytochrom P450 und des reduzierten Cytochrom P450 CO-Komplexes vermessen wurde.

Dazu wurden 100 µl Enzymfraktion mit 1,9 ml Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) in einer Küvette verdünnt. Danach wurde eine Spatelspitze Natriumdithionit hinzugegeben, um das Cytochrom P450 in seine reduzierte Form zu überführen, und nach 2 min das erste Spektrum in einem Wellenlängenbereich von 400-500 nm aufgenommen. Anschließend wurde die Probe mit Kohlenmonoxid durch 1 minütige Gaseinleitung bei einem Gasstrom von ca. 5 Blasen pro Minute, gesättigt, und ein weiteres Spektrum aufgenommen. Durch Subtraktion des ersten vom zweiten Spektrum erhielt man ein Differenzspektrum. Aus der Differenz der Absorptionswerte bei 450 und 490 nm ließ sich unter Verwendung des empirisch ermittelten Absorptionskoeffizienten von 91 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> der Cytochrom P450-Gehalt berechnen.

### **3.2.2 CYP1A2 Coffein-*N*3-Demethylierung**

#### **3.2.2.1 Material und Geräte**

Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Magnesiumchlorid, Triethylamin und NADPH (Fa. Merck, Darmstadt), Coffein, 1,7-Dimethylxanthin, EDTA, Fluvoxaminmaleat (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), Methanol, Essigsäure (Fa. Baker B.V., Deventer, Holland).

Die pH-Wert-Bestimmung der Puffer erfolgte mit einem Microprozessor pH-mV-Meter pH 537 der Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland) mit der Elektrode Blue Line 16 pH der Firma Schott (Mainz, Deutschland), die Suspendierung der Inkubationsansätze mit einem IKA-Vibrax-VXR der Firma Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland). Die Inkubation der Biotransformationsansätze wurden im Schüttelwasserbad GFL 1083 der Gesellschaft für Labortechnik (Burgenwedel, Deutschland) durchgeführt, die Abtrennung des denaturierten Proteins erfolgte mit einer Mikroliterzentrifuge der Firma Hettich (Tuttlingen, Deutschland).

Die Messung der Umsetzungsraten erfolgte HPLC-analytisch mit einem Autosampler, einer Pumpe und einem Detektor der Firma Waters (Waters, Milford, CT, USA). Zur Peakauswertung wurde die Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20) ebenfalls von der Firma Waters verwendet.

#### **3.2.2.2 *In vitro*-Biotransformationsansätze**

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze erfolgte in Anlehnung an eine Arbeit von Hickman *et al.* [1998]. Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 250 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei einer Substratkonzentration von 1 mM Coffein durchgeführt. Die Ansätze enthielten außerdem gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 0,514 mg Protein/ml sowie 1 mM NADPH und 1mM EDTA. Um den Einfluss des Zusatzes von 3% DMSO auf die Umsetzungsraten zu

untersuchen, wurde zwei Ansätzen nur Puffer zugesetzt, während je zwei der anderen BP-11 und BP-D7 in Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$  bei 3 % (v/v) DMSO enthielten. Weiteren Ansätzen wurden 5 bzw. 20  $\mu\text{M}$  Fluvoxamin als bekannter Inhibitor für CYP1A2 zugesetzt. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 20 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die enzymatische Oxidation des Coffeins wurde durch Zusatz von 16  $\mu\text{l}$  3N HCl und anschließendes Einfrieren für 30 min bei  $-18^\circ\text{C}$  gestoppt. Nach raschem Auftauen im Schüttelwasserbad wurden die Ansätze bei 12000g für 10 min zentrifugiert, der Überstand konnte unmittelbar für die HPLC-Analytik eingesetzt werden.

### **3.2.2.3 HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze**

Die Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters Breeze™ HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe:	Waters 1525 binäre Pumpe (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor:	Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator:	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20) (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase:	LiChrocart, LiChrospher 60, RP-select B, 5 $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Vorsäule 4 x 4 mm
Mobile Phase:	A: Methanol : Wasser : Eisessig : Triethylamin 12:88:1:0,02 (v/v) B: Methanol

Flussrate: 1 ml/min

Gradient: 0 bis 14 min 0%B  
14 bis 15 min auf 43%B  
15 bis 16 min 43%B  
16 bis 17 min auf 0%B  
17 bis 23 min 0%B

Detektion:  $\lambda = 270 \text{ nm}$

Injektionsvolumen: 15  $\mu\text{l}$

Retentionszeiten:	1,7-Dimethylxanthin	7,1 $\pm$ 0,3 min
	Coffein	15,0 $\pm$ 0,4 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45  $\mu\text{m}$  Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Methanol 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit 1,7-Dimethylxanthin dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (1, 2, 4, 6, 8, 12, 16  $\mu\text{M}$ ) zugesetzt.

Um eine Aussage über die Wiederfindung zu erlauben, wurde das 1,7-Dimethylxanthin den üblichen Inkubationsansätzen, die jedoch kein NADPH enthielten, in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung hinzugefügt. Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten wie unter 3.2.2.2 beschrieben.



### **3.2.3 CYP2A6 Cumarin-7-Hydroxylierung**

#### **3.2.3.1 Material und Geräte**

Cumarin (Fa. Sigma Chemical. Co., Deisenhofen), 7-Hydroxycumarin, Tranylcypromin (Fa. Aldrich, Steinheim), Ammoniumacetat (Fa. Merck, Darmstadt). Die Angaben zu den weiteren Chemikalien und verwendeten Geräten können 3.2.2.1 entnommen werden.

#### **3.2.3.2 *In vitro*-Biotransformationsansätze**

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach den optimalen Bedingungen nach Harsdorf [1998]. Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 200 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei einer Substratkonzentration von 1 mM Cumarin durchgeführt. Die Ansätze enthielten außerdem gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 0,128 mg Protein/ml, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 0,23 mM NADPH. Um den Einfluss des Zusatzes von 3% DMSO auf die Umsetzungsraten zu untersuchen, wurde zwei Ansätzen nur Puffer zugesetzt, während je zwei der anderen BP-11 und BP-D7 in Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20 µM bei 3 % (v/v) DMSO enthielten. Weiteren Ansätzen wurden 5 bzw. 20 µM Tranylcypromin als bekannter Inhibitor für CYP2A6 zugesetzt. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 20 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die enzymatische Oxidation des Cumarins wurde durch Zusatz von 800 µl Methanol gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze bei 12000g für 10 min zentrifugiert, der Überstand konnte unmittelbar für die HPLC-Analytik eingesetzt werden.

### 3.2.3.3 HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze

Die Analytik erfolgte unter Verwendung der folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe: Waters 600 Pumpe mit Controller (Waters, Milford, CT, USA)

Detektor: Waters Fluoreszenzdetektor 470 (Waters, Milford, CT, USA)

Autosampler: Waters WISP 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)

Integrator: EZChromElite™ Aufnahme und Auswertesoftware Version 2.8.3  
(Waters, Milford, CT, USA)

Stationäre Phase: Nucleosil C18 5 µm, 250 x 4 mm; (Fa. Grom, Herrenberg) mit  
Waters Guard Column C18

Mobile Phase: 0,1 M Ammoniumacetatpuffer pH 4,5 eingestellt mit Eisessig :  
Methanol 45:55 (v/v)

Flussrate: 0,8 ml/min

Detektion: Fluoreszenz, Ex  $\lambda$  = 340 nm, Em  $\lambda$  = 460 nm

Injektionsvolumen: 10 µl

Retentionszeiten: 7-Hydroxycumarin 5,5 ± 0,1 min  
Cumarin 8,2 ± 0,1 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Methanol 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit 7-Hydroxycumarin dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0  $\mu\text{M}$ ) zugesetzt.

Um eine Aussage über die Wiederfindung zu erlauben, wurde das 7-Hydroxycumarin den üblichen Inkubationsansätzen, die jedoch kein NADPH enthielten, in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung hinzugefügt. Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten wie unter 3.2.3.2 beschrieben.

### **3.2.4 CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung**

#### **3.2.4.1 Material und Geräte**

Tolbutamid (Fa. ICN, Eschwege), Hydroxytolbutamid (Fa. ULTRAFINE chemicals, Manchester, England), Sulfaphenazol (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), Acetonitril (Fa. Promochem, Wesel). Weitere Chemikalien und Geräte, die für die Tolbutamid-Methylhydroxylierung nötig waren, entsprechen den Angaben unter 3.2.2.1 oder werden in den folgenden Kapiteln angegeben.

#### **3.2.4.2 *In vitro*-Biotransformationsansätze**

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach den optimalen Bedingungen nach Siebe [1998]. Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 500  $\mu\text{l}$  50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei einer Substratkonzentration von 0,6 mM Tolbutamid durchgeführt. Die Ansätze enthielten außerdem gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 0,77 mg Protein/ml, 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$  sowie 0,5 mM NADPH. Um den Einfluss des Zusatzes von 3% Acetonitril auf die Umsetzungsraten zu untersuchen, wurde zwei Ansätzen nur Puffer zugesetzt, während je zwei der anderen BP-11 und BP-D7 in Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$  bei 3 % (v/v) Acetonitril enthielten. Weiteren Ansätzen wurden 5 bzw. 20  $\mu\text{M}$  Sulfaphenazol als bekannter Inhibitor für CYP2C9 zugesetzt. Im Anschluss an eine

Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 45 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die enzymatische Oxidation des Tolbutamids wurde durch Zusatz von 100 µl Acetonitril gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze bei 12000g für 10 min zentrifugiert, der Überstand konnte unmittelbar für die HPLC-Analytik eingesetzt werden.

### **3.2.4.3 HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze**

Die Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters Breeze™ HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe: Waters 1525 binäre Pumpe (Waters, Milford, CT, USA)

Detektor: Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)

Autosampler: Waters 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)

Integrator: Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20)  
(Waters, Milford, CT, USA)

Stationäre Phase: LiChrocart, LiChrospher 60, RP-select B, 5 µm, 125 x 4 mm  
(Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Vorsäule 4 x 4 mm

Mobile Phase: Aqua bidest pH 3,0 mit konz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : Acetonitril 75:25 (v/v)

Flussrate: 0 bis 8 min: 0,8 ml/min  
8 bis 15 min: von 0,8 auf 1,8 ml/min  
15 bis 22 min: 1,8 ml/min  
22 bis 23 min: von 1,8 auf 0,8 ml/min

23 bis 25 min: 0,8 ml/min

Detektion:  $\lambda = 220 \text{ nm}$

Injektionsvolumen: 15  $\mu\text{l}$

Retentionszeiten: Hydroxytolbutamid  $6,5 \pm 0,1 \text{ min}$   
Tolbutamid  $19,9 \pm 0,2 \text{ min}$

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45  $\mu\text{m}$  Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit Hydroxytolbutamid dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{M}$ ) zugesetzt.

Um eine Aussage über die Wiederfindung zu erlauben, wurde das Hydroxytolbutamid den üblichen Inkubationsansätzen, die jedoch kein NADPH enthielten, in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung hinzugefügt. Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten wie unter 3.2.4.2 beschrieben.

### **3.2.5 CYP2C19 S-Mephenytoin-4'-Hydroxylierung**

#### **3.2.5.1 Material und Geräte**

S-Mephenytoin und ( $\pm$ )-4'-Hydroxymephenytoin (Fa. ULTRAFINE Chemicals, Manchester, England), Trispuffer (Fa. Merck, Darmstadt), Tranylcypromin (Fa. Aldrich, Steinheim), Acetonitril (Fa. Promochem, Wesel).

Die Lyophilisierung der Inkubationsansätze erfolgte unter Verwendung des Gefriertrocknungsgeräts Christ Alpha 2-4 der Firma Christ (Osterode am Harz,

Deutschland). Die weiteren Chemikalien und Geräte können 3.2.2.1 entnommen werden oder werden in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

### **3.2.5.2 *In vitro*-Biotransformationsansätze**

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach den optimalen Bedingungen nach Siebe [1998]. Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 250 µl 50 mM Trispuffer pH 7,4 bei einer Substratkonzentration von 0,75 mM S-Mephenytoin durchgeführt. Die Ansätze enthielten außerdem gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 2,36 mg Protein/ml, 5,0 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 0,5 mM NADPH. Um den Einfluss des Zusatzes von 3% Acetonitril auf die Umsetzungsraten zu untersuchen, wurde zwei Ansätzen nur Puffer zugesetzt, während je zwei der anderen BP-11 und BP-D7 in Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20 µM bei 3 % (v/v) Acetonitril enthielten. Weiteren Ansätzen wurden 5 bzw. 20 µM Tranylcypromin als bekannter Inhibitor für CYP2C19 zugesetzt. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 60 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die enzymatische Oxidation des S-Mephenytoins wurde durch Einfrieren bei -18°C gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze durch Gefriertrocknung in die Lyophilisate überführt (Temperatur -13°C, Druck 0,025 mbar über einen Zeitraum von 15 Stunden), aus denen vor der HPLC-Analytik der Metabolit mit 150 µl Fließmittel extrahiert wurde. Anschließend wurden diese Ansätze bei 12000g für 10 min zentrifugiert, um die festen Bestandteile der Suspension abzutrennen und den Überstand für die HPLC-Analytik einzusetzen.

### **3.2.5.3 HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze**

Die Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters Breeze™ HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe:	Waters 1525 binäre Pumpe (Waters, Milford, CT, USA)	
Detektor:	Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)	
Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)	
Integrator:	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20) (Waters, Milford, CT, USA)	
Stationäre Phase:	LiChrocart, LiChrospher 60, RP-select B, 5 µm, 125 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Vorsäule 4 x 4 mm	
Mobile Phase:	Aqua bidest pH 3,5 mit konz. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : Acetonitril 81:19 (v/v)	
Flussrate:	0,6 ml/min	
Detektion:	λ = 224 nm	
Injektionsvolumen:	15 µl	
Retentionszeiten:	4'-Hydroxymephenytoin	9,9 ± 0,2 min
	S-Mephenytoin	28,5 ± 0,3 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit 4'-Hydroxymephenytoin dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 µM) zugesetzt.

Um eine Aussage über die Wiederfindung zu erlauben, wurde das 4'-Hydroxymephenytoin den üblichen Inkubationsansätzen, die jedoch kein NADPH enthielten, in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung hinzugefügt. Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten wie unter 3.2.5.2 beschrieben.

### **3.2.6 CYP2D6 Dextromethorphan-O-Desalkylierung**

#### **3.2.6.1 Material und Geräte**

Dextromethorphan (Fa. Sigma Chemical. Co., Deisenhofen), Dextrorphan-D-tartrat (Fa. ICN Biomedicals GmbH, Eschwege), Chinidin (Fa. Aldrich, Steinheim), Acetonitril (Fa. Promochem, Wesel).

Die weiteren Chemikalien und Geräte können 3.2.2.1 entnommen werden oder werden in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

#### **3.2.6.2 *In vitro*-Biotransformationsansätze**

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach den optimalen Bedingungen nach Harsdorf [1998]. Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 200 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei einer Substratkonzentration von 0,02 mM Dextromethorphan durchgeführt. Die Ansätze enthielten außerdem gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 1,80 mg Protein/ml, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 0,6 mM NADPH. Um den Einfluss des Zusatzes von 3% Acetonitril auf die Umsetzungsraten zu untersuchen, wurde zwei Ansätzen nur Puffer zugesetzt, während je zwei der anderen BP-11 und BP-D7 in Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20 µM bei 3 % (v/v) Acetonitril enthielten. Weiteren Ansätzen wurden 5 bzw. 20 µM Chinidin als bekannter Inhibitor für CYP2D6 zugesetzt. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 50 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die enzymatische



Demethylierung des Dextromethorphans wurde durch Zusatz von 600 µl Acetonitril gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze bei 12000g für 10 min zentrifugiert, der Überstand konnte unmittelbar für die HPLC-Analytik eingesetzt werden.

### **3.2.6.3 HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze**

Die Analytik erfolgte unter Verwendung der folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe:	Waters 1525 binäre Pumpe (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor:	W2475 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator:	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20) (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase:	Nucleosil C18 (5 µM), 250 x 4 mm (Fa. Crom, Herrenberg) Vorsäule Waters Guard Column C18 (5 µm) 4 x 4 mm (Waters, Milford, CT, USA)
Mobile Phase:	100 mM Ammoniumacetat pH 4,5 : Acetonitril 70:30 (v/v)
Flussrate:	0 bis 6 min: 0,9 ml/min 6 bis 6,5 min: von 0,9 auf 1,2 ml/min 6,5 bis 15 min: 1,2 ml/min 15 bis 15,5 min: von 1,2 auf 0,9 ml/min 15,5 bis 20 min: 0,9 ml/min
Detektion:	Fluoreszenz, Ex $\lambda$ = 227 nm, Em $\lambda$ = 311 nm

Injektionsvolumen: 20 µl

Retentionszeiten: Dextrorphan            5,8 ± 0,1 min  
                          Dextromethorphan 15,0 ± 0,1 min

Der Acetatpuffer wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit Dextrorphan dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (2, 4, 6, 8, 12, 16 µM) zugesetzt.

Um eine Aussage über die Wiederfindung zu erlauben, wurde das Dextrorphan den üblichen Inkubationsansätzen, die jedoch kein NADPH enthielten, in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung hinzugefügt. Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten wie unter 3.2.6.2 beschrieben.

### **3.2.7 CYP2E1 Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung**

#### **3.2.7.1 Material und Geräte**

6-Hydroxychlorzoxazon (Fa. ULTRAFINE Chemicals, Manchester, England), Chlorzoxazon (Fa. Aldrich, Steinheim), Acetonitril (Fa. Promochem, Wesel).

Die Lyophilisierung der Inkubationsansätze erfolgte unter Verwendung des Gefriertrocknungsgeräts Christ Alpha 2-4 der Firma Christ (Osterode am Harz, Deutschland). Die weiteren verwendeten Chemikalien und Geräte können 3.2.2.1 entnommen werden oder werden in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

### **3.2.7.2 *In vitro*-Biotransformationsansätze**

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach den optimalen Bedingungen nach Siebe [1998]. Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 500 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei einer Substratkonzentration von 1,0 mM Chlorzoxazon durchgeführt. Die Ansätze enthielten außerdem gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 2,26 mg Protein/ml, 6,0 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 1,0 mM NADPH. Um den Einfluss des Zusatzes von 3% Acetonitril auf die Umsatzraten zu untersuchen, wurde zwei Ansätzen nur Puffer zugesetzt, während je zwei der anderen BP-11 und BP-D7 in Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20 µM bei 3 % (v/v) Acetonitril enthielten. Weiteren Ansätzen wurden 1 bzw. 2% DMSO als bekannter Inhibitor für CYP2E1 zugesetzt. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 45 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die enzymatische Oxidation des Chlorzoxazons wurde durch Einfrieren bei -18°C gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze durch Gefriertrocknung in die Lyophilisate überführt (Temperatur -13°C, Druck 0,025 mbar über einen Zeitraum von 15 Stunden), aus denen vor der HPLC-Analytik der Metabolit mit 150 µl Fließmittel extrahiert wurde. Anschließend wurden diese Ansätze bei 12000g für 10 min zentrifugiert, um die festen Bestandteile der Suspension abzutrennen und den Überstand für die HPLC-Analytik einzusetzen.

### **3.2.7.3 HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze**

Die Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters Breeze™ HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe: Waters 1525 binäre Pumpe (Waters, Milford, CT, USA)

Detektor: Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)

Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)	
Integrator:	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20) (Waters, Milford, CT, USA)	
Stationäre Phase:	LiChrocart, LiChrospher 60, RP-select B, 5 µm, 125 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Vorsäule 4 x 4 mm	
Mobile Phase :	Aqua bidest pH 4,0 mit konz. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : Methanol 65 : 35 (v/v)	
Flußrate:	0,6 ml/min	
Detektion:	λ = 296 nm	
Injektionsvolumen:	15 µl	
Retentionszeiten:	6-Hydroxychlorzoxazon	7,3 ± 0,1 min
	Chlorzoxazon	18,3 ± 0,4 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Methanol 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit 6-Hydroxychlorzoxazon dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (8, 12, 16, 20, 50, 100, 200, 300, 400 µM) zugesetzt.

Um eine Aussage über die Wiederfindung zu erlauben, wurde das 6-Hydroxychlorzoxazon den üblichen Inkubationsansätzen, die jedoch kein NADPH enthielten, in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung hinzugefügt. Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten wie unter 3.2.7.2 beschrieben.

### **3.2.8 CYP3A4 Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung**

#### **3.2.8.1 Material und Geräte**

Testosteron, 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron, Ketoconazol (Fa. Sigma Chemical. Co., Deisenhofen). Acetonitril (Fa. Promochem, Wesel).

Die Lyophilisierung der Inkubationsansätze erfolgte unter Verwendung des Gefriertrocknungsgeräts Christ Alpha 2-4 der Firma Christ (Osterode am Harz, Deutschland). Die weiteren Chemikalien und Geräte können 3.2.2.1 entnommen werden oder werden in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

#### **3.2.8.2 *In vitro*-Biotransformationsansätze**

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach den optimalen Bedingungen nach Harsdorf [1998]. Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 200  $\mu$ l 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei einer Substratkonzentration von 0,25 mM Testosteron durchgeführt. Die Ansätze enthielten außerdem gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 0,9 mg Protein/ml, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 0,45 mM NADPH. Um den Einfluss des Zusatzes von 3% Acetonitril auf die Umsatzraten zu untersuchen, wurde zwei Ansätzen nur Puffer zugesetzt, während je zwei der anderen BP-11 und BP-D7 in Konzentrationen von 0, 5, 10 und 20  $\mu$ M bei 3 % (v/v) Acetonitril enthielten. Weiteren Ansätzen wurden 5 bzw. 20  $\mu$ M Ketoconazol als bekannter Inhibitor für CYP3A4 zugesetzt. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 15 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die enzymatische Oxidation des Testosterons wurde durch Einfrieren bei -18°C gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze durch Gefriertrocknung in die Lyophilisate überführt (Temperatur -13°C, Druck 0,025 mbar über einen Zeitraum von 15 Stunden), aus denen vor der HPLC-Analytik der Metabolit mit 150  $\mu$ l Acetonitril extrahiert wurde. Anschließend

wurden diese Ansätze bei 12000g für 10 min zentrifugiert, um die festen Bestandteile der Suspension abzutrennen und den Überstand für die HPLC-Analytik einzusetzen.

### **3.2.8.3 HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze**

Die Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters Breeze™ HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe:	Waters 1525 binäre Pumpe (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor:	Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator:	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20) (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase:	LiChrocart, LiChrospher 60, RP-select B, 5 µm, 125 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Vorsäule 4 x 4 mm
Mobile Phase:	Fließmittel A: Aqua bidest : Acetonitril 75:25 (v/v) Fließmittel B: Acetonitril
Flussrate:	1,0 ml/min
Gradient:	0 bis 11 min 0%B 11 bis 14 min auf 30%B 14 bis 22 min 30%B 22 bis 24 min auf 0%B

24 bis 29 min 0%B

Detektion:  $\lambda = 254 \text{ nm}$

Injektionsvolumen: 15  $\mu\text{l}$

Retentionszeiten:	6 $\beta$ -Hydroxytestosteron	8,2 $\pm$ 0,1 min
	Testosteron	19,8 $\pm$ 1,0 min

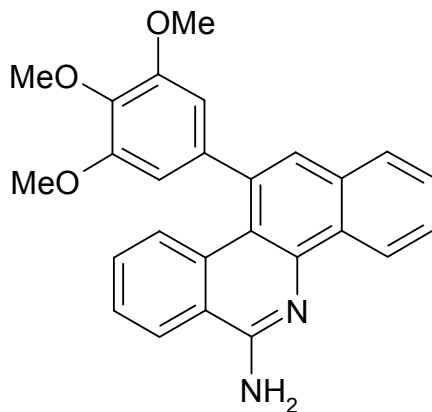
Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45  $\mu\text{m}$  Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (2, 5, 10, 40, 60  $\mu\text{M}$ ) zugesetzt.

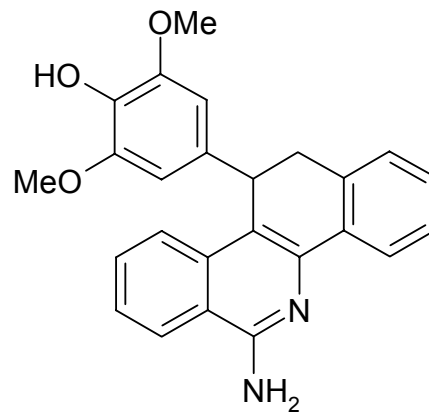
Um eine Aussage über die Wiederfindung zu erlauben, wurde das 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron den üblichen Inkubationsansätzen, die jedoch kein NADPH enthielten, in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung hinzugefügt. Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten wie unter 3.2.8.2 beschrieben.

### **3.3 Ergebnisse und Diskussion**

Die Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, das Interaktionspotential von BP-D7 und BP-11 im Hinblick auf die Inhibition arzneistoffmetabolismus-relevanter CYP450 Isoenzyme zu beurteilen.



**BP-D7**



**BP-11**

Dabei wurden die sieben Isoenzyme und ihre Markerreaktionen gewählt, die von der EMEA empfohlen werden. Die gewonnenen humanen Lebermikrosomenpools zeigten Protein- und Cytochrom P450-Gehalte, die unter den der Literatur entnommenen Bedingungen [Harsdorf, 1998; Hickman *et al.*, 1998; Siebe, 1998] gut auswertbare Umsetzungsraten lieferten. Die im Vergleich zur Literatur vorgenommenen Änderungen der HPLC-Analytik bewirkten eine Verkürzung der Laufzeiten und damit einen größeren möglichen Probendurchsatz.

Die Beurteilung des Interaktionspotentials für die einzelnen Isoenzyme erfolgte aufgrund der Inhibition der Markerreaktionen und den bisher ermittelten wirksamen Konzentrationen für die untersuchten Substanzen. Im Rahmen der Testung am NCI (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA) wurden für BP-11 und BP-D7 im „*in vitro* anticancer screening“ an 60 verschiedenen Tumorzelllinien die GI<sub>50</sub>-Werte (growth inhibition 50%) bestimmt. Dieser Wert beschreibt die Konzentration, die das Wachstum der Tumorzellen halbiert. Zur Beurteilung des allgemeinen Ansprechverhaltens der Tumorzellen werden die GI<sub>50</sub>-Werte aller 60 Zelllinien einer Testreihe logarithmiert und ein Mittelwert gebildet. Mit Hilfe dieses Wertes, der vom NCI als MG\_MID (meangraph midpoint) bezeichnet wird, lässt sich die Aktivität einer Verbindung in dem verwendeten Testsystem charakterisieren. Für BP-11 wurde hierbei ein MG\_MID = -6,01 entsprechend 0,98 µM und für BP-D7 MG\_MID = -6,56 entsprechend 0,3 µM ermittelt [Kock, 2003; Wolschendorf, 2000]. Im Rahmen des *in vitro*-Interaktionsscreenings wurde das Interaktionspotential als gering eingeschätzt, wenn durch den Zusatz von 20 µM Benzo[*c*]phenanthridin, und damit dem 20- bzw.



67-fachen der mittleren halbmaximalen Wirkkonzentration, die Markerreaktion um weniger als 50% gehemmt wurde. Eine Testung mit höheren Benzo[*c*]phenanthridinkonzentrationen war aufgrund der mangelnden Wasserlöslichkeit bei einem Lösungsmittelzusatz von 3% nicht möglich.

Die Beurteilung des Interaktionspotentials gegenüber den untersuchten Isoenzymen und die daraus gezogenen Konsequenzen für weitere Untersuchungen werden in den folgenden Kapiteln der Diskussion dargestellt.

### **3.3.1 Charakteristika der humanen Lebermikrosomen**

#### **3.3.1.1 Proteingehalt**

Die Proteinkonzentrationen der gepoolten Mikrosomen, die mit Hilfe der BCA Methode [Smith *et al.*, 1985] ermittelt wurden, betragen 25,7 mg/ml für den HLM-Pool 07/04 und 27,2 mg/ml für den HLM-Pool 09/04.

#### **3.3.1.2 Spezifischer Cytochrom P450 Gehalt**

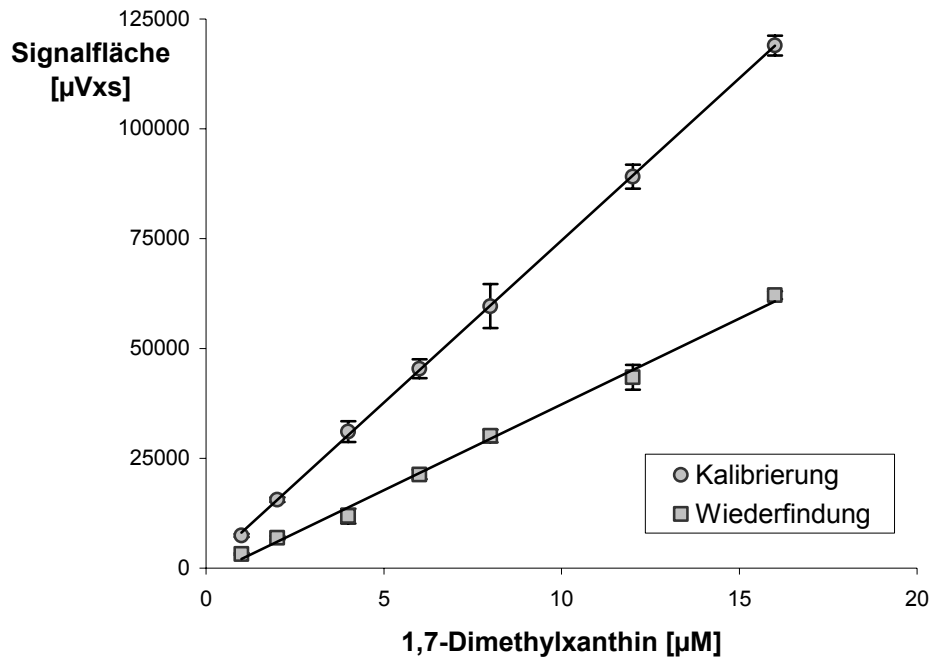
Die Cytochrom P450-Konzentrationen der gepoolten Mikrosomen, die nach Omura *et Sato* [1964] ermittelt wurden, betragen 14,3 nmol/ml für den HLM-Pool 07/04 und 14,5 nmol/ml für den HLM-Pool 09/04.

### **3.3.2 CYP1A2 Coffein-*N*3-Demethylierung**

#### **3.3.2.1 Kalibrierung und Wiederfindung**

Kalibrierung und Wiederfindung erfolgten im Anschluss an die unter 3.2.2.3 beschriebene HPLC-Analytik durch eine quantitative Bestimmung der Flächen der durch 1,7-Dimethylxanthin resultierenden Signale (Abb. 3.1). Die Funktionen der Kalibrierung ( $R^2=0.9999$ ,  $N=28$ ) und der Wiederfindung ( $R^2=0.996$ ,  $N=28$ ) waren in

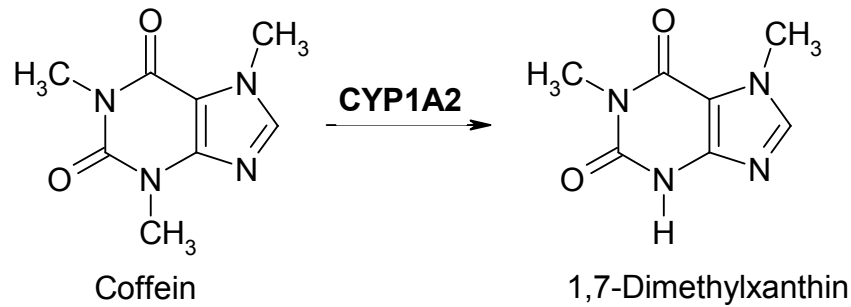
dem Konzentrationsbereich von 1,0 bis 16,0  $\mu\text{M}$  linear, wobei die Wiederfindungsrate einen Wert von  $46 \pm 5 \%$  aufwies.



**Abb. 3.1:** Kalibrierung und Wiederfindung des 1,7-Dimethylxanthins. Die Signalflächen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.

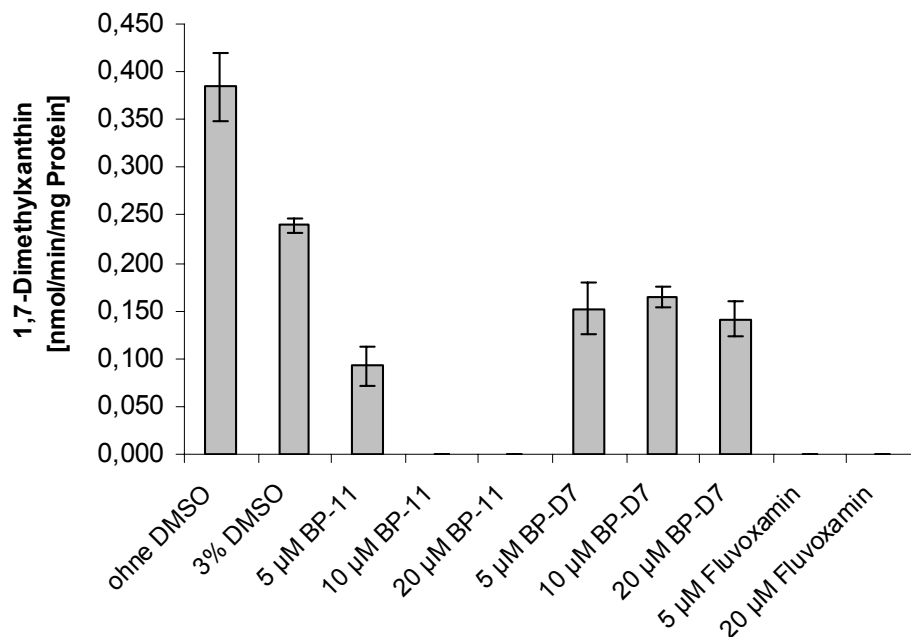
### 3.3.2.2 In vitro-Biotransformation unter Benzo[*c*]phenanthridinzusatz

Um die Untersuchung des Interaktionspotentials von BP-11 und BP-D7 gegenüber CYP1A2 in gepoolten humanen Lebermikrosomen durchzuführen, wurde die Coffein- $\beta$ -Demethylierung gewählt (Abb. 3.2), die von der EMEA und in der Literatur als Markerreaktion aufgeführt worden ist [CPMP, 1997; Hickman *et al.*, 1998].



**Abb. 3.2: Isoenzym spezifische Bildung des 1,7-Dimethylxanthins durch das Cytochrom P450 Isoenzym 1A2 [CPMP, 1997; Hickman *et al.*, 1998].**

Obwohl die Reaktion bereits durch den Zusatz von 3% DMSO in einem Maße gehemmt wurde, das nach der Literatur zu erwarten war [Hickman *et al.*, 1998], zeigte die Kontrolle mit Lösungsmittel noch eine hinreichend große Umsetzungsrate, um die Inhibition durch BP-11 und BP-D7 zu beurteilen. Fluvoxamin verringerte die Bildung des 1,7-Dimethylxanthins bereits in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  auf eine Umsetzungsrate unterhalb der Bestimmungsgrenze. Ebenfalls eine deutliche Hemmung war für BP-11 zu beobachten, das in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bereits eine vollständige Hemmung der Umsetzung bewirkte. Auch der Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  BP-11 verringerte die Umsetzungsrate bereits um mehr als die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollansätzen, denen lediglich 3% DMSO zugesetzt wurden. BP-D7 zeigte ebenfalls eine Hemmung der  $\beta$ -Demethylierung, doch blieb diese moderat und zeigte keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit. Auch durch den Zusatz von 20  $\mu\text{M}$  BP-D7 erfolgte eine Verringerung der Umsetzungsrate um weniger als 50% (Abb. 3.3). Daher ist die Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion von BP-D7 mit Arzneistoffen, die durch CYP1A2 metabolisiert werden, als relativ gering anzusehen. Dies ist für BP-11 nicht der Fall, weswegen hier weitergehende Untersuchungen vorgenommen wurden.

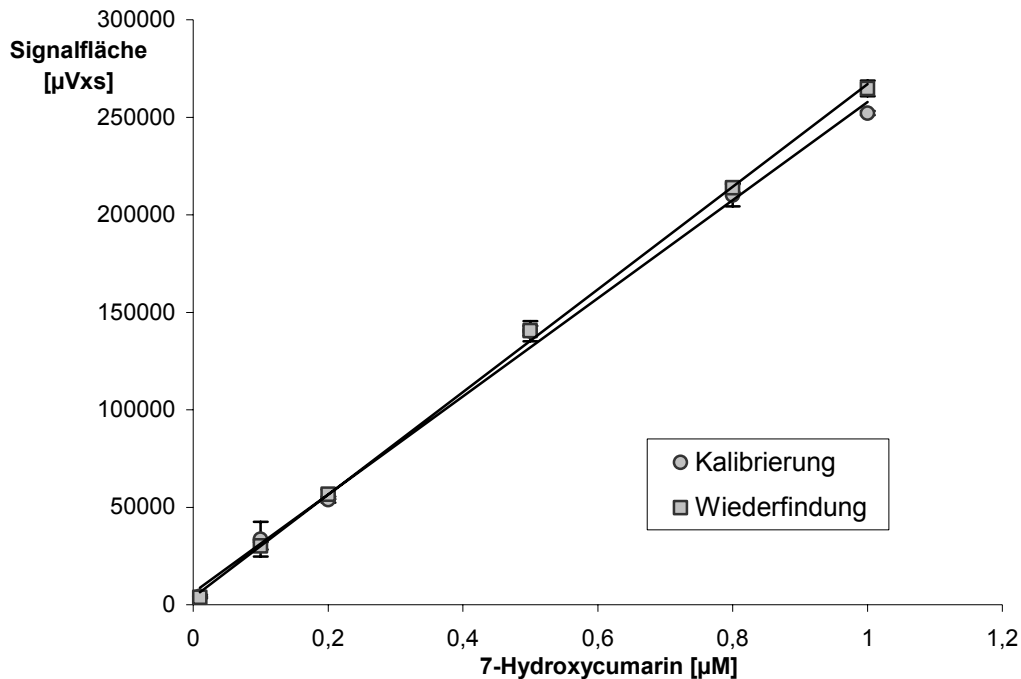


**Abb. 3.3:** *Bildungsraten des 1,7-Dimethylxanthins. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.*

### 3.3.3 CYP2A6 Cumarin-7-Hydroxylierung

#### 3.3.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung

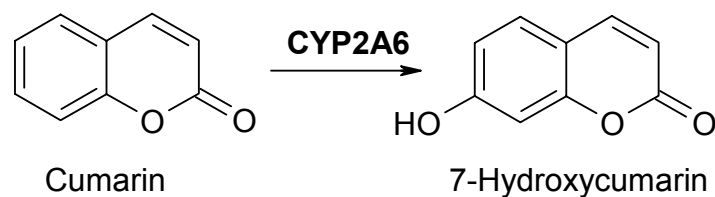
Kalibrierung und Wiederfindung erfolgten unter Verwendung der unter 3.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik durch eine quantitative Bestimmung der Flächen der durch 7-Hydroxycumarin resultierenden Signale (Abb. 3.4). Die Funktionen der Kalibrierung ( $R^2=0.9973$ ,  $N=24$ ) und der Wiederfindung ( $R^2=0.9993$ ,  $N=24$ ) waren in dem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1,0  $\mu\text{M}$  linear, wobei die Wiederfindungsrate einen Wert von  $98 \pm 8 \%$  aufwies.



**Abb. 3.4:** Kalibrierung und Wiederfindung des 7-Hydroxycumarins. Die Signalfächen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.

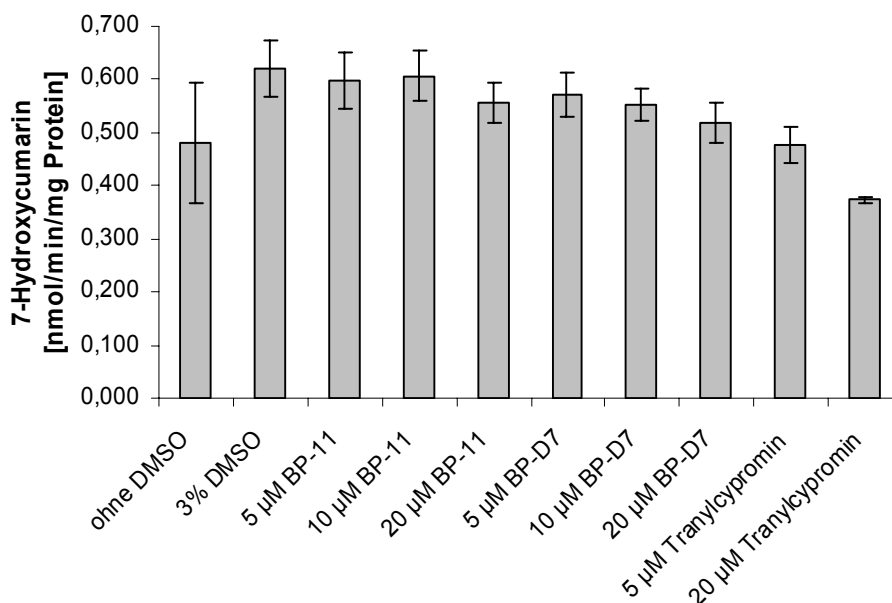
### 3.3.3.2 In vitro-Biotransformation unter Benzo[*c*]phenanthridinzusatz

Um das Interaktionspotential von BP-11 und BP-D7 gegenüber CYP2A6 in gepoolten humanen Lebermikrosomen zu untersuchen, wurde die Cumarin-7-Hydroxylierung gewählt (Abb. 3.5), da diese von der EMEA und in mehreren Veröffentlichungen als Markerreaktion aufgeführt worden ist [Busby *et al.*, 1999; Chauret *et al.*, 1998; CPMP, 1997; Easterbrook *et al.*, 2001; Hickman *et al.*, 1998].



**Abb. 3.5: Isoenzym spezifische Bildung des 7-Hydroxycumarins durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2A6 [Busby et al., 1999; Chauret et al., 1998; CPMP, 1997; Easterbrook et al., 2001; Hickman et al., 1998].**

Der Zusatz von 3% DMSO bewirkte eine leichte Steigerung der Umsetzungsraten, was mit den Ergebnissen von Chauret *et al.* [1998] übereinstimmt. Weder BP-11 noch BP-D7 zeigten in einer Konzentration bis zu 20  $\mu\text{M}$  eine deutliche Inhibition der Cumarin-7-Hydroxylierung im Gegensatz zum klassischen Inhibitor Tranylcypromin (Abb. 3.6), so dass die Wahrscheinlichkeit klinisch relevanter pharmakokinetischer Interaktionen mit Arzneistoffen, die durch CYP2A6 verstoffwechselt werden, als gering einzustufen ist. Daher wurden für dieses Isoenzym im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

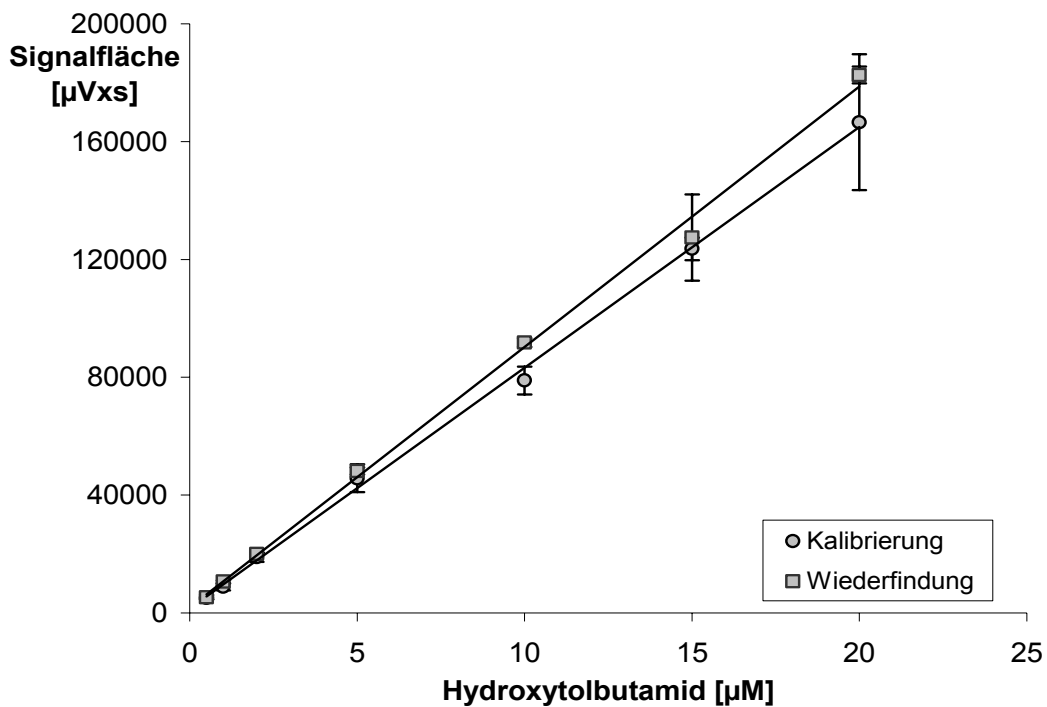


**Abb. 3.6: Bildungsraten des 7-Hydroxycumarins. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.**

### 3.3.4 CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung

#### 3.3.4.1 Kalibrierung und Wiederfindung

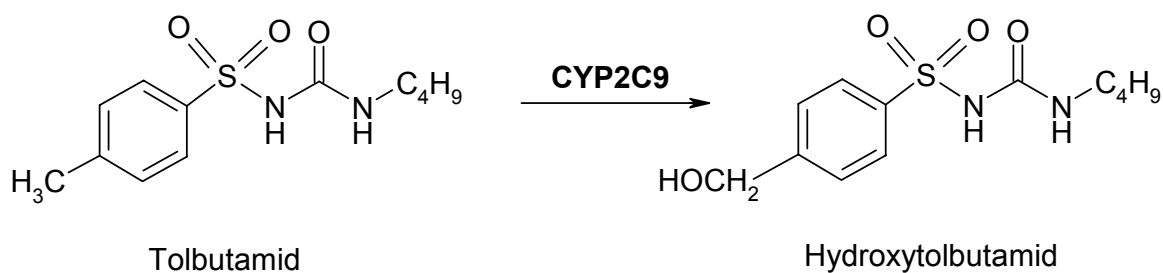
Kalibrierung und Wiederfindung erfolgten unter Verwendung der unter 3.2.4.3 beschriebenen HPLC-Analytik durch eine quantitative Bestimmung der Flächen der durch Hydroxytolbutamid resultierenden Signale (Abb. 3.7). Die Funktionen der Kalibrierung ( $R^2=0.9985$ ,  $N=28$ ) und der Wiederfindung ( $R^2=0.9973$ ,  $N=28$ ) waren in dem Konzentrationsbereich von 1,0 bis 20,0  $\mu\text{M}$  linear, wobei die Wiederfindungsrate einen Wert von  $109 \pm 6 \%$  aufwies.



**Abb. 3.7:** Kalibrierung und Wiederfindung des Hydroxytolbutamids. Die Signalflächen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.

### 3.3.4.2 In vitro-Biotransformation unter Benzo[*c*]phenanthridinzusatz

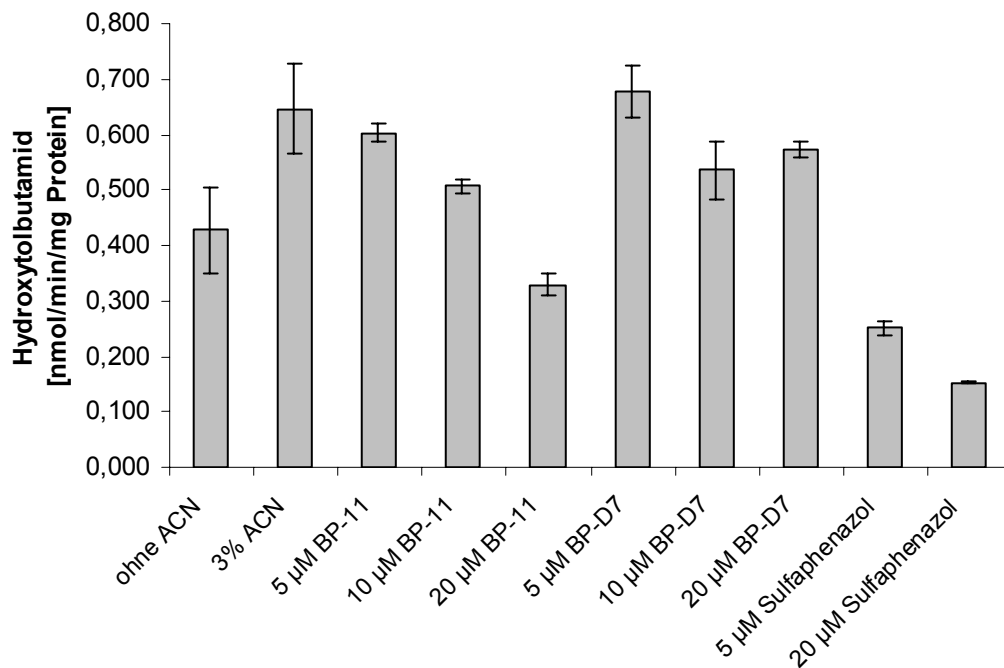
Für die Untersuchung des Interaktionspotentials von BP-11 und BP-D7 gegenüber CYP2C9 in gepoolten humanen Lebermikrosomen wurde die Umsetzung von Tolbutamid zu Hydroxytolbutamid gewählt (Abb. 3.8), da diese Reaktion in der Literatur als isoenzymspezifisch aufgeführt worden ist und auch von der EMEA als Markerreaktion empfohlen wird [CPMP, 1997; Relling *et al.*, 1990].



**Abb. 3.8: Isoenzym-spezifische Bildung des Hydroxytolbutamids durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2C9 [CPMP, 1997; Relling *et al.*, 1990].**

Die Reaktion erfuhr durch den Zusatz von 3% Acetonitril eine signifikante Steigerung der Umsetzungsrate, ein Phänomen das mehrfach in der Literatur beschrieben wurde [Chauret *et al.*, 1998; Hickman *et al.*, 1998]. Sulfaphenazol verringerte die Bildung des Hydroxytolbutamids bereits deutlich in einer Konzentration von 5 µM. Die Hemmung der Tolbutamid-Methylhydroxylierung durch den Zusatz von BP-11 zeigte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit, bei einem Zusatz von 20 µM des Benzo[*c*]phenanthridins erreichte die Umsetzungsrate für die Markerreaktion des CYP2C9 nur noch die Hälfte des Kontrollwertes (Abb. 3.9). Auch wenn diese Hemmung geringer war als die durch den bekannten Inhibitor Sulfaphenazol, wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, um die Wechselwirkung von BP-11 mit der Tolbutamid-Methylhydroxylierung zu bestätigen und zu charakterisieren. Für BP-D7 waren solche weiterführenden Experimente nicht notwendig, da durch den Zusatz dieser Verbindung nur eine schwache Inhibition beobachtet werden konnte, die zudem nicht konzentrationsabhängig war.



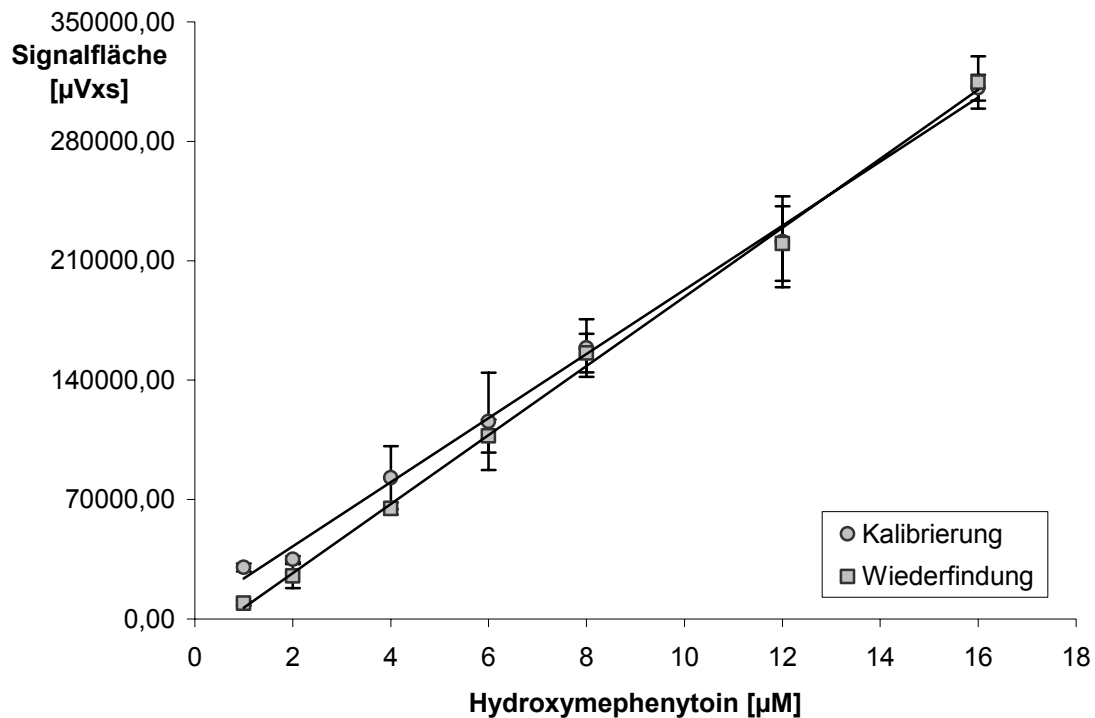


**Abb. 3.9:** *Bildungsraten des Hydroxytolbutamids. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.*

### 3.3.5 CYP2C19 S-Mephenytoin-4'-Hydroxylierung

#### 3.3.5.1 Kalibrierung und Wiederfindung

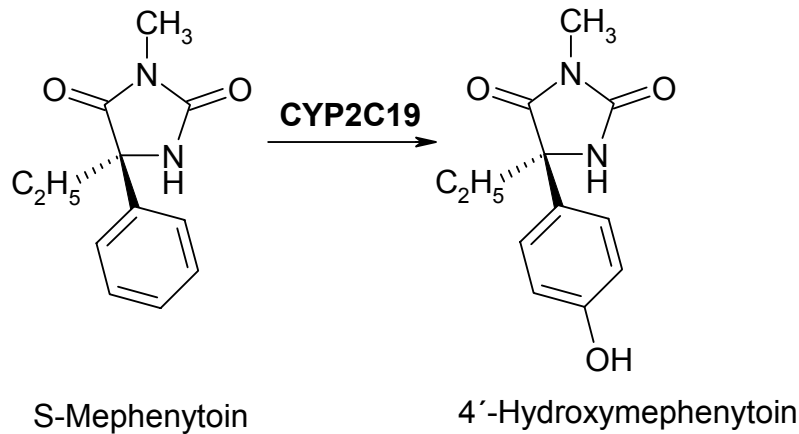
Kalibrierung und Wiederfindung erfolgten unter Verwendung der unter 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik durch eine quantitative Bestimmung der Flächen der durch Hydroxymephenytoin resultierenden Signale (Abb. 3.10). Die Funktionen der Kalibrierung ( $R^2=0.9962$ ,  $N=28$ ) und der Wiederfindung ( $R^2=0.9976$ ,  $N=28$ ) waren in dem Konzentrationsbereich von 1,0 bis 16,0  $\mu\text{M}$  linear, wobei die Wiederfindungsrate einen Wert von  $90 \pm 12 \%$  aufwies.



**Abb. 3.10: Kalibrierung und Wiederfindung des Hydroxymephenytoins. Die Signalfächen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.**

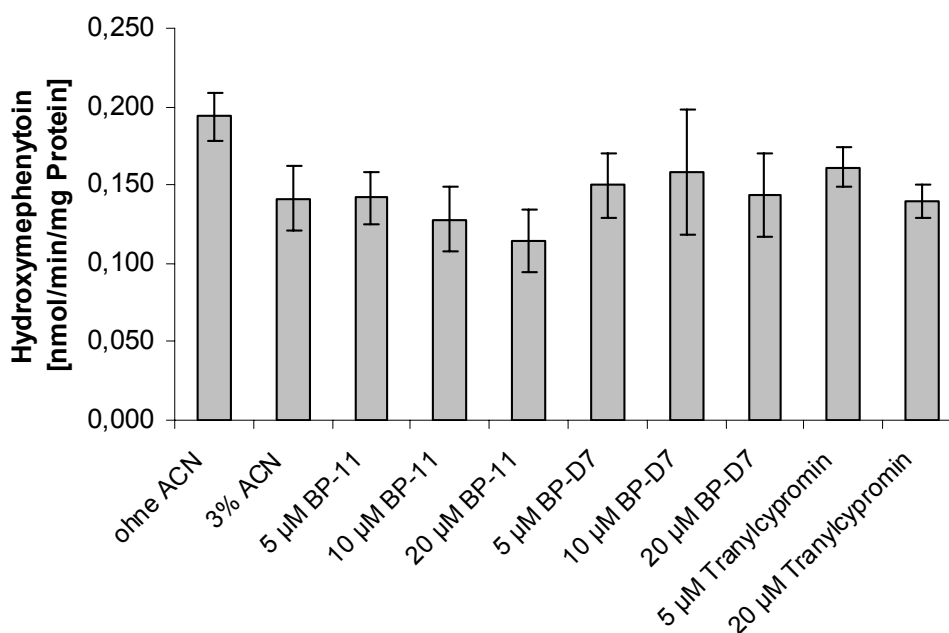
### 3.3.5.2 In vitro-Biotransformation unter Benzo[*c*]phenanthridinzusatz

Die Untersuchung des Interaktionspotentials von BP-11 und BP-D7 gegenüber CYP2C19 in gepoolten humanen Lebermikrosomen wurde mit Hilfe der S-Mephenytoin-4'-Hydroxylierung durchgeführt (Abb. 3.11), die von der EMEA und in mehreren Veröffentlichungen als Markerreaktion aufgeführt worden ist [Brockmoller *et al.*, 1995; CPMP, 1997; Relling *et al.*, 1990; Wrighton *et al.*, 1993].



**Abb. 3.11: Isoenzym spezifische Bildung des 4'-Hydroxymephenytoins durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2C19 [Brockmoller et al., 1995; CPMP, 1997; Relling et al., 1990; Wrighton et al., 1993].**

Obwohl die Reaktion bereits durch den Zusatz von 3% Acetonitril gehemmt wurde, wie nach Chauret *et al.* [1998] zu erwarten war, zeigte die Kontrolle mit Lösungsmittel noch eine hinreichend große Umsatzrate, um die Inhibition durch BP-11 und BP-D7 zu beurteilen. In den untersuchten Konzentrationen bis zu 20  $\mu$ M konnte weder bei BP-11 noch bei BP-D7 eine deutliche Inhibition der S-Mephenytoin-4'-Hydroxylierung beobachtet werden (Abb. 3.12), so dass die Wahrscheinlichkeit klinisch relevanter pharmakokinetischer Interaktionen mit Arzneistoffen, die durch CYP2C19 metabolisiert werden, als gering einzustufen ist. Daher wurden für dieses Isoenzym im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

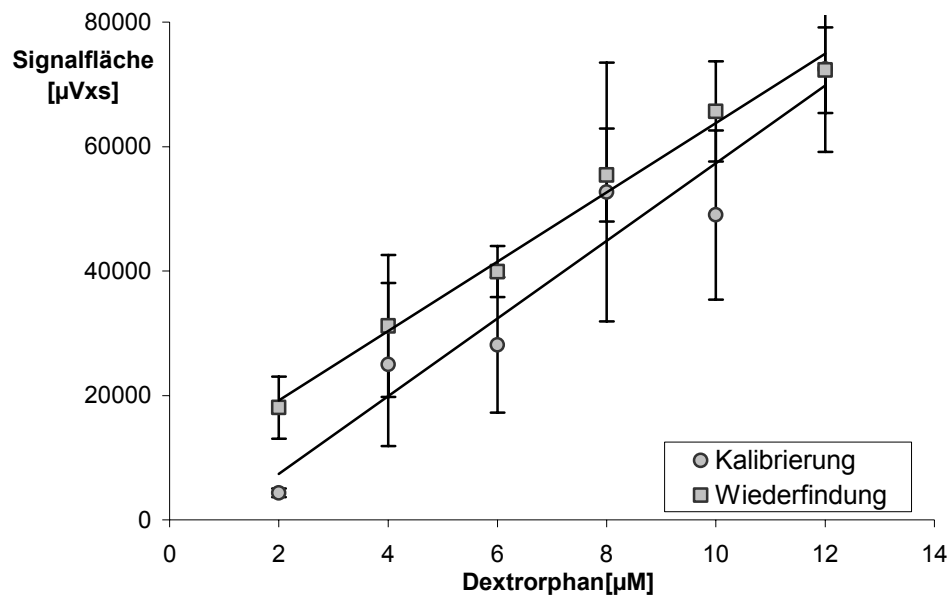


**Abb. 3.12: Bildungsraten des 4'-Hydroxymephenytoins. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.**

### 3.3.6 CYP2D6 Dextromethorphan-O-Desalkylierung

#### 3.3.6.1 Kalibrierung und Wiederfindung

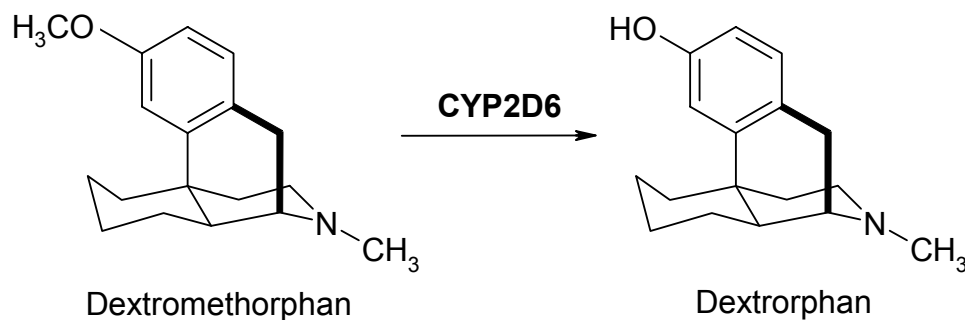
Kalibrierung und Wiederfindung erfolgten unter Verwendung der unter 3.2.6.3 beschriebenen HPLC-Analytik durch eine quantitative Bestimmung der Flächen der durch Dextromethorphan resultierenden Signale (Abb. 3.13). Die Funktionen der Kalibrierung ( $R^2=0.9346$ ,  $N=24$ ) und der Wiederfindung ( $R^2=0.9896$ ,  $N=24$ ) waren in dem Konzentrationsbereich von 2,0 bis 12,0  $\mu\text{M}$  linear, wobei die Wiederfindungsrate einen Wert von  $121 \pm 18 \%$  aufwies.



**Abb. 3.13: Kalibrierung und Wiederfindung des Dextrophan. Die Signalflächen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.**

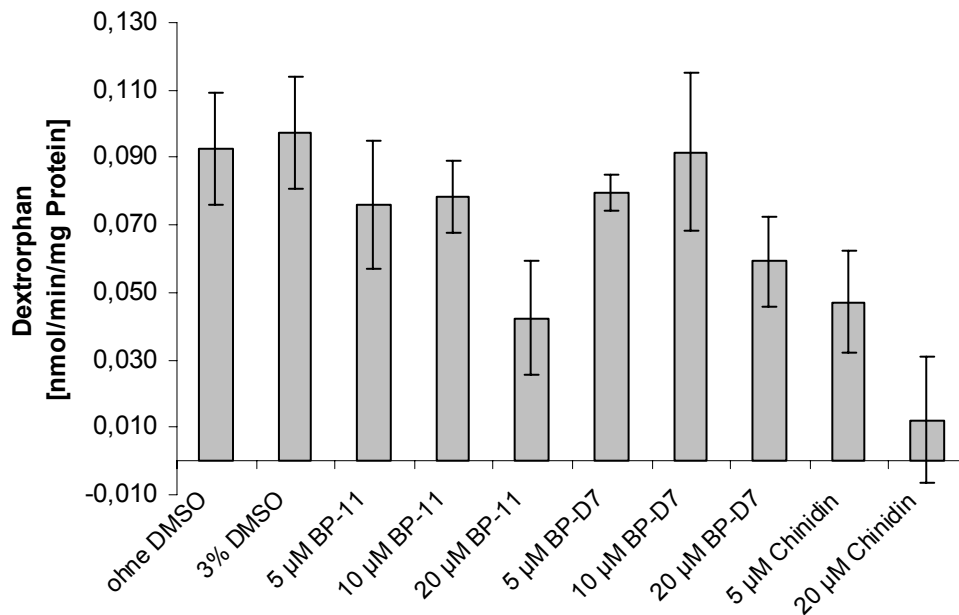
### 3.3.6.2 In vitro-Biotransformation unter Benzo[*c*]phenanthridinzusatz

Um die Untersuchung des Interaktionspotentials von BP-11 und BP-D7 gegenüber CYP2D6 in gepoolten humanen Lebermikrosomen durchzuführen, wurde die Dextromethorphan-*O*-Desalkylierung gewählt (Abb. 3.14), eine Reaktion, die von der EMEA und in mehreren Veröffentlichungen als isoenzymspezifisch für CYP2D6 beschrieben wurde [Chauret *et al.*, 1998; CPMP, 1997; Easterbrook *et al.*, 2001; Hickman *et al.*, 1998].



**Abb. 3.14: Isoenzym spezifische Bildung des Dextrorphan durch das Cytochrom P450 Isoenzym [Chauret *et al.*, 1998; CPMP, 1997; Easterbrook *et al.*, 2001; Hickman *et al.*, 1998].**

Der Zusatz von 3% DMSO zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Umsatzrate. Dies ist in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur, in der sowohl von moderaten Aktivitätssteigerungen als auch Aktivitätsverminderungen berichtet wird [Chauret *et al.*, 1998; Hickman *et al.*, 1998]. Chinidin verringerte die Bildung des Dextrorphan bereits deutlich in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ , wogegen bei Zusatz von 20  $\mu\text{M}$  eine nahezu vollständige Hemmung der Demethylierung zu beobachten war. Für BP-11 war ebenfalls eine Hemmung zu beobachten, die zwar schwächer ausfiel, aber dennoch für 20  $\mu\text{M}$  eine um mehr als die Hälfte verringerte Umsatzrate zeigte. Ebenfalls eine Hemmung der *O*-Demethylierung konnte durch den Zusatz von BP-D7 beobachtet werden, doch blieb diese moderat und zeigte keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit. Auch durch den Zusatz von 20  $\mu\text{M}$  BP-D7 erfolgte eine Verringerung der Umsatzrate um weniger als 50% (Abb. 3.15). Daher ist die Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion von BP-D7 mit Arzneistoffen, die durch CYP2D6 metabolisiert werden, als relativ gering anzusehen. Dies ist für BP-11 nicht der Fall, weswegen hier weitergehende Untersuchungen durchgeführt wurden.

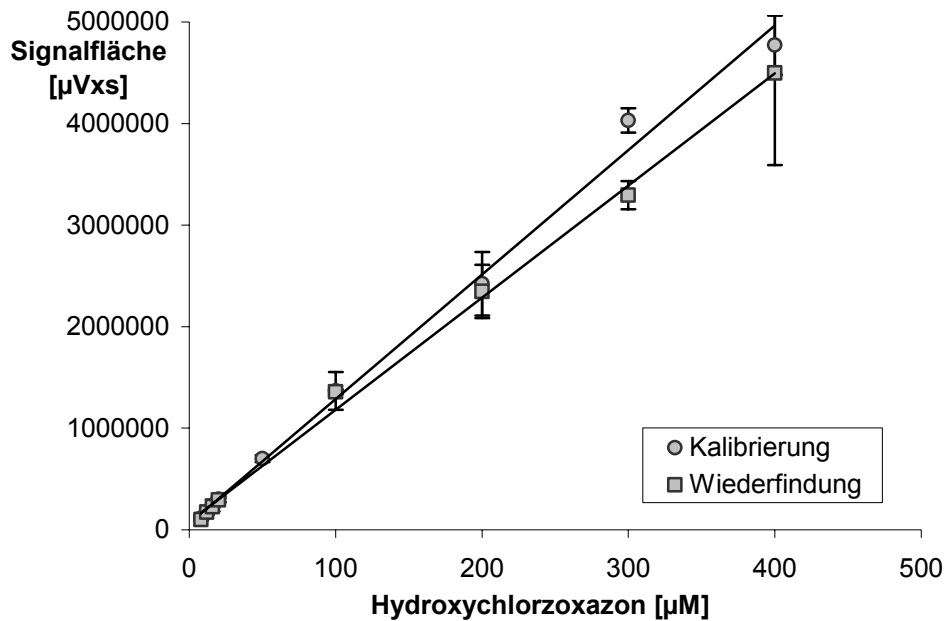


**Abb. 3.15: Bildungsraten des Dextrorphan.** Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.

### 3.3.7 CYP2E1 Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung

#### 3.3.7.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Kalibrierung und Wiederfindung erfolgten unter Verwendung der unter 3.2.7.3 beschriebenen HPLC-Analytik durch eine quantitative Bestimmung der Flächen der durch Hydroxychlorzoxazons resultierenden Signale (Abb. 3.16). Die Funktionen der Kalibrierung ( $R^2=0.9944$ ,  $N=36$ ) und der Wiederfindung ( $R^2=0.9975$ ,  $N=36$ ) waren in dem Konzentrationsbereich von 8,0 bis 400,0  $\mu\text{M}$  linear, wobei die Wiederfindungsrate einen Wert von  $95 \pm 7\%$  aufwies.

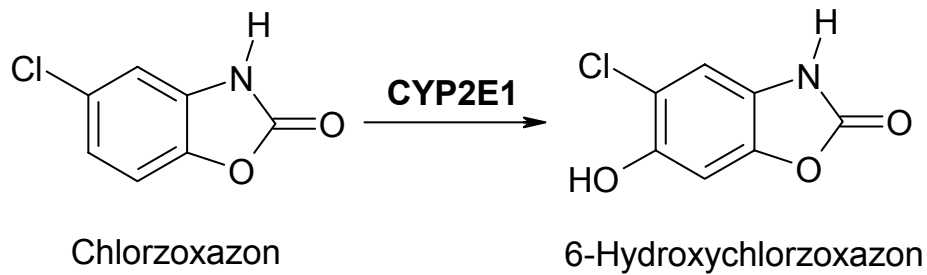


**Abb. 3.16: Kalibrierung und Wiederfindung des Hydroxychlorzoxazons. Die Signalflächen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.**

### 3.3.7.2 In vitro-Biotransformation unter Benzo[*c*]phenanthridinzusatz

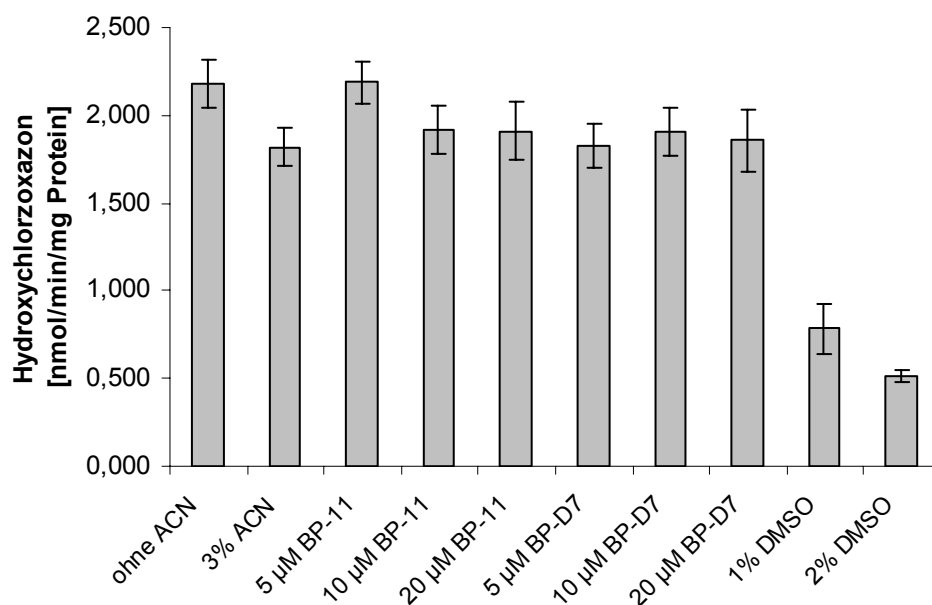
Für die Durchführung der Untersuchung des Interaktionspotentials von BP-11 und BP-D7 gegenüber CYP2E1 in gepoolten humanen Lebermikrosomen wurde die Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung gewählt (Abb. 3.17), die von der EMEA und in mehreren Veröffentlichungen als Markerreaktion aufgeführt worden ist [Chauret *et al.*, 1998; CPMP, 1997; Easterbrook *et al.*, 2001; Hickman *et al.*, 1998; Peter *et al.*, 1990].





**Abb. 3.17: Isoenzym spezifische Bildung des 6-Hydroxychlorzoxazons durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2E1 [Chauret *et al.*, 1998; CPMP, 1997; Easterbrook *et al.*, 2001; Hickman *et al.*, 1998; Peter *et al.*, 1990].**

Da die Reaktion entsprechend der Literatur [Chauret *et al.*, 1998; Hickman *et al.*, 1998] durch den Zusatz von 3% Acetonitril nur leicht gehemmt wurde, zeigte die Kontrolle mit Lösungsmittel noch eine hinreichend große Umsetzungsrate, um die Inhibition durch BP-11 und BP-D7 zu beurteilen. In Konzentrationen von 5 bis 20  $\mu\text{M}$  zeigten weder BP-11 noch BP-D7 eine deutliche Hemmung der Bildung des 6-Hydroxychlorzoxazons, im Gegensatz zum klassischen Inhibitor DMSO (Abb. 3.18), so dass die Wahrscheinlichkeit klinisch relevanter pharmakokinetischer Interaktionen mit Arzneistoffen, die durch CYP2E1 verstoffwechselt werden, für die untersuchten Benzo[*c*]phenanthridine als gering einzustufen ist. Daher wurden für dieses Isoenzym im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

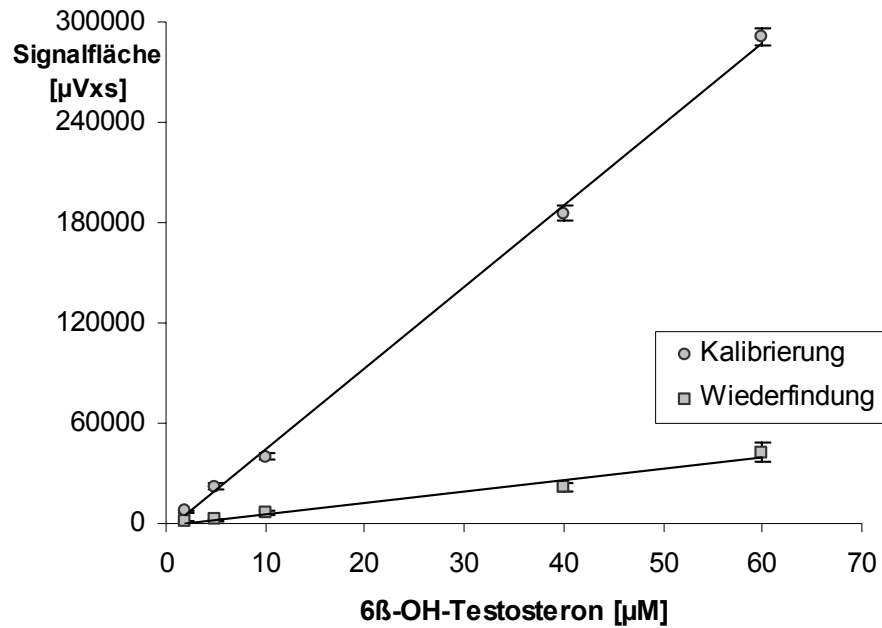


**Abb. 3.18:** Bildungsraten des 6-Hydroxychlorzoxazons. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.

### 3.3.8 CYP3A4 Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung

#### 3.3.8.1 Kalibrierung und Wiederfindung

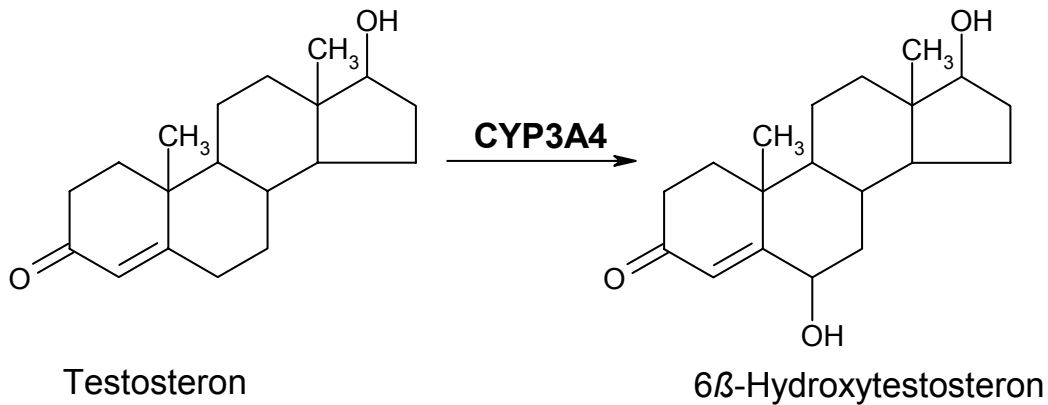
Kalibrierung und Wiederfindung erfolgten unter Verwendung der unter 3.2.8.3 beschriebenen HPLC-Analytik durch eine quantitative Bestimmung der Flächen der durch 6 $\beta$ -Hydroxytestosterons resultierenden Signale (Abb. 3.19). Die Funktionen der Kalibrierung ( $R^2=0.9991$ ,  $N=20$ ) und der Wiederfindung ( $R^2=0.9747$ ,  $N=20$ ) waren in dem Konzentrationsbereich von 2,0 bis 60,0  $\mu\text{M}$  linear, wobei die Wiederfindungsrate einen Wert von  $15 \pm 4 \%$  aufwies.



**Abb. 3.19:** Kalibrierung und Wiederfindung des 6β-Hydroxytestosterons. Die Signalflächen sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.

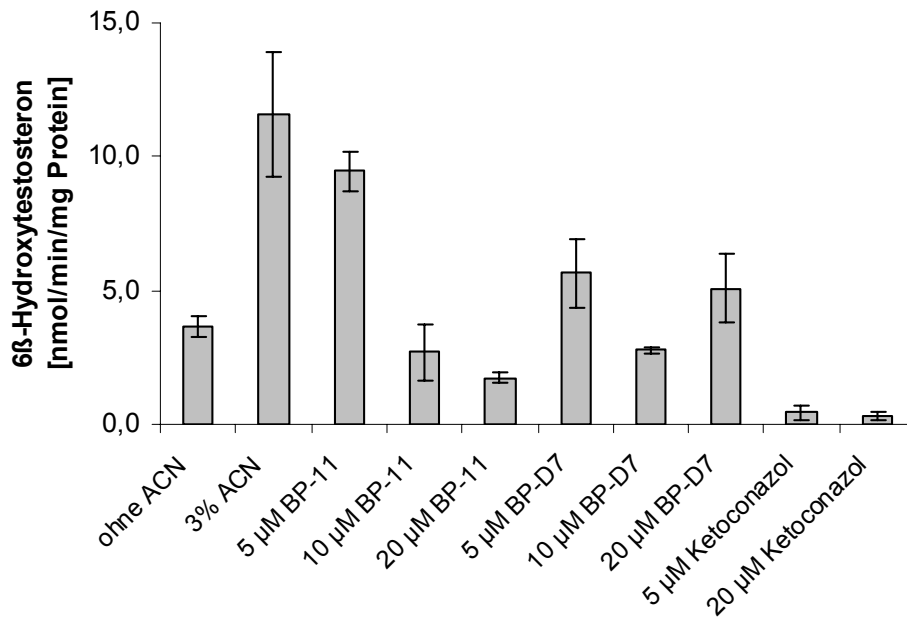
### 3.3.8.2 In vitro-Biotransformation unter Benzo[*c*]phenanthridinzusatz

Die Untersuchung des Interaktionspotentials von BP-11 und BP-D7 gegenüber CYP3A4 in gepoolten humanen Lebermikrosomen wurde mit Hilfe der Testosteron-6β-Hydroxylierung durchgeführt (Abb. 3.20), die in mehreren Veröffentlichungen als Markerreaktion aufgeführt worden ist [Busby *et al.*, 1999; Chauret *et al.*, 1998; Easterbrook *et al.*, 2001].



**Abb. 3.20: Isoenzym spezifische Bildung des 6β-Hydroxytestosterons durch das Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 [Busby et al., 1999; Chauret et al., 1998; Easterbrook et al., 2001].**

Die Reaktion erfuhr durch den Zusatz von 3% Acetonitril eine massive Steigerung der Umsatzraten. Dieses Phänomen ist in dieser Deutlichkeit noch nicht beschrieben worden, lediglich Hickman *et al.* [1998] berichteten von einer moderaten Aktivierung des CYP3A4 durch Acetonitril, allerdings für eine andere Markerreaktion, die Dextromethorphan-*N*-Desalkylierung. Die beobachtete Aktivierung erleichterte jedoch die Beurteilung der anschließenden Inhibitionsversuche. Ketoconazol verringerte die Bildung des 6β-Hydroxytestosterons bereits in einer Konzentration von 5 μM auf eine Umsatzrate nahe der Bestimmungsgrenze. Auch der Zusatz von 10 μM BP-11 verminderte die Umsatzrate bereits um mehr als die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollansätzen, die lediglich 3% Acetonitril enthielten. Eine noch deutlichere Hemmung der Bildung des 6β-Hydroxytestosterons konnte durch den Zusatz von BP-D7 beobachtet werden, hier reichte bereits eine Konzentration von 5 μM, um die Umsatzrate um 50% zu vermindern, allerdings zeigte dieser Effekt keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 3.21). Daher ist für beide Testsubstanzen die Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion mit Arzneistoffen, die durch CYP3A4 metabolisiert werden, als relativ hoch anzusehen. Die Inhibition der Markerreaktion wurde deswegen durch weitergehende Untersuchungen näher charakterisiert.



**Abb. 3.21: Bildungsraten des 6β-Hydroxytestosterons. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.**

### 3.4 Zusammenfassung

Für die von der EMEA empfohlenen CYP450-Isoenzyme wurden die Markerreaktionen unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von BP-11 bzw. BP-D7 oder bekannten isoenzymspezifischen Inhibitoren durchgeführt. In der *in vitro*-Testung durch das NCI wurden für beide Substanzen halbmaximale Wirkkonzentrationen bestimmt, diese lag für BP-11 bei 0,98 µM und für BP-D7 bei 0,3 µM. Im Rahmen des Interaktionsscreenings wurde das Interaktionspotential als gering eingeschätzt, wenn durch den Zusatz von 20 µM Benzo[*c*]phenanthridin die Markerreaktion um weniger als 50% gehemmt wurde. Aufgrund der mangelnden Löslichkeit in wässrigen Medien mit maximal 3% Lösungsmittelzusatz war eine Testung bei höheren Benzo[*c*]phenanthridinkonzentrationen nicht möglich.

BP-11 verringerte in der Maximalkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  die Umsetzungsraten der Markerreaktionen von CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4 auf weniger als 50% der Kontrolle, wobei eine besonders deutliche Hemmung für CYP1A2 beobachtet werden konnte. Für BP-D7 wurde eine Verminderung der Umsetzungsraten um mehr als die Hälfte nur bei CYP3A4 beobachtet. Für BP-11 sind Interaktionen mit Arzneistoffen, die vornehmlich durch CYP2A6, CYP2C19 und CYP2E1 metabolisiert werden, daher nicht zu befürchten, ebenso wie für BP-D7, bei dem außerdem auch bei CYP1A2, CYP2C9 und CYP2D6 nur schwache Inhibitionen zu beobachten waren. Für die Isosenzyme, die durch den Zusatz des jeweiligen Benzo[*c*]phenanthridins um mehr als 50% gehemmt wurden, wurden weitere Charakterisierungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Inhibitions-Charakterisierung sind in Kapitel 4 aufgeführt.

## **4 CHARAKTERISIERUNG DER CYP450-INHIBITION**

### **4.1 Einleitung und Zielsetzung**

Nachdem für alle von der EMEA für die Interaktionstestung empfohlenen CYP450 Isoenzyme unter optimalen Inkubationsbedingungen eine Testung auf Inhibition durch BP-11 und BP-D7 durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3), sollten für die Isoenzyme, bei denen nach Zusatz von 20  $\mu\text{M}$  6-Aminobenzo[*c*]phenanthridin eine Hemmung der Markerreaktionen von 50% oder mehr im Vergleich zur Kontrolle mit Lösungsmittel zu beobachten war, weitergehende Untersuchungen angestellt werden. Dafür wurden weitere Inkubationen mit gepoolten humanen Lebermikrosomen durchgeführt, wobei sowohl die Konzentrationen der Markersubstrate als auch der Benzo[*c*]phenanthridine variiert wurden. Dadurch sollte es möglich sein, die Inhibition durch Bestimmung des Hemmtyps und der Hemmstärke weiter zu charakterisieren.

### **4.2 Material und Methoden**

#### **4.2.1 CYP1A2 Coffein-*N*3-Demethylierung**

Die verwendeten Materialien und Geräte entsprachen den Angaben unter 3.2.2.1. Ebenso entsprach die HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze 3.2.2.3.

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach mit Ausnahme der Substrat- und Benzo[*c*]phenanthridinkonzentration 3.2.2.2. Die Ansätze enthielten in 250  $\mu\text{l}$  50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 0,514 mg Protein/ml, 1 mM NADPH sowie 3% DMSO. Das Substrat Coffein wurde in Konzentrationen von 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 und 2.0 mM eingesetzt. Für den Zusatz von BP-11 zu jeder Substratkonzentration wurden die

Konzentrationen 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 und 10.0  $\mu\text{M}$  ausgewählt. Zusätzlich wurden jeweils zwei Ansätze ohne Zugabe von Lösungsmittel inkubiert. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 70 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Aufarbeitung entsprach 3.2.2.2.

### **4.2.2 CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung**

Die verwendeten Materialien und Geräte entsprachen den Angaben unter 3.2.4.1. Ebenso entsprach die HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze 3.2.4.3.

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach mit Ausnahme der Substrat- und Benzo[*c*]phenanthridinkonzentration 3.2.4.2. Die Ansätze enthielten in 500  $\mu\text{l}$  50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 0,77 mg Protein/ml, 0,5mM NADPH, 5,0 mM  $\text{MgCl}_2$  sowie von 3% Acetonitril. Das Substrat Tolbutamid wurde in Konzentrationen von 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 und 1.0 mM eingesetzt. Für den Zusatz von BP-11 zu jeder Substratkonzentration wurden die Konzentrationen 0.0, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 und 60.0  $\mu\text{M}$  ausgewählt. Zusätzlich wurden jeweils zwei Ansätze ohne Zugabe von Lösungsmittel inkubiert. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 60 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Aufarbeitung entsprach 3.2.4.2.

### **4.2.3 CYP2D6 Dextromethorphan-O-Desalkylierung**

Die verwendeten Materialien und Geräte entsprachen den Angaben unter 3.2.6.1. Ebenso entsprach die HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze 3.2.6.3.



Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach mit Ausnahme der Substrat- und Benzo[*c*]phenanthridinkonzentration 3.2.6.2. Die Ansätze enthielten in 200 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 1,80 mg Protein/ml, 0,6mM NADPH, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 3% Acetonitril. Das Substrat Dextromethorphan wurde in Konzentrationen von 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0 und 100.0 µM eingesetzt. Für den Zusatz von BP-11 zu jeder Substratkonzentration wurden die Konzentrationen 0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0 und 40.0 µM ausgewählt. Zusätzlich wurden jeweils zwei Ansätze ohne Zugabe von Lösungsmittel inkubiert. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 50 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Aufarbeitung entsprach 3.2.6.2.

### **4.2.4 CYP3A4 Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung**

Die verwendeten Materialien und Geräte entsprachen den Angaben unter 3.2.8.1. Ebenso entsprach die HPLC-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze 3.2.8.3.

Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze entsprach mit Ausnahme der Substrat- und Benzo[*c*]phenanthridinkonzentration 3.2.8.2. Die Ansätze enthielten in 200 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gepoolte humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 0,9 mg Protein/ml, 0,45mM NADPH, 3,3 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 3% Acetonitril. Das Substrat Testosteron wurde in Konzentrationen von 0.01, 0.025, 0.05, 0.125, 0.25, 0.4 und 0.6 mM eingesetzt. Für den Zusatz von BP-11 bzw. BP-D7 zu jeder Substratkonzentration wurden die Konzentrationen 0.0, 1.0, 4.0, 7.0, 10.0, 20.0 und 40.0 µM ausgewählt. Zusätzlich wurden jeweils zwei Ansätze ohne Zugabe von Lösungsmittel inkubiert. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 20 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Aufarbeitung entsprach 3.2.8.2.

## 4.3 Ergebnisse und Diskussion

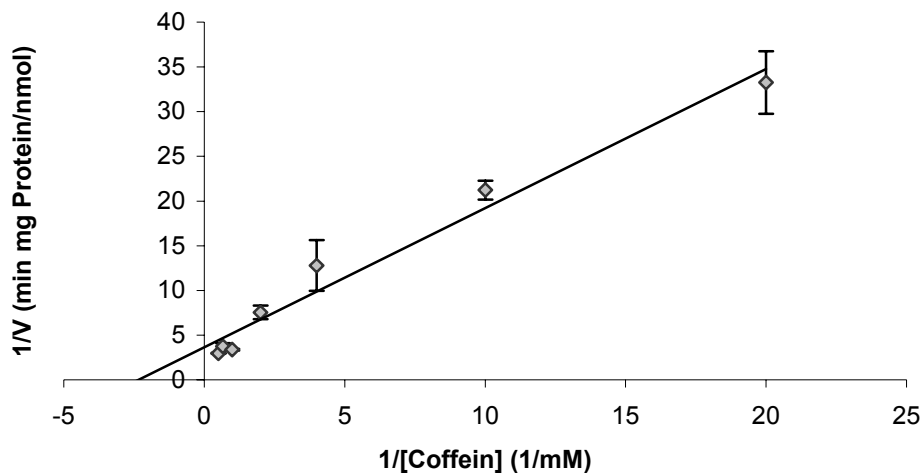
### 4.3.1 Bestimmung der $K_M$ - und $V_{max}$ -Werte

Enzymatische Reaktionen lassen sich, wenn sie einer Michaelis-Menten-Kinetik folgen, durch die doppelt-reziproke Auftragung der Umsatzraten gegen die Substratkonzentrationen nach Lineweaver-Burk in eine lineare Darstellung überführen. Aus den Achsenabschnitten der erhaltenen Regressionsgerade können die halbmaximale Konzentration  $K_M$  und die Sättigungsumsatzrate  $V_{max}$  bestimmt werden. Diese zwei Größen werden häufig zur Charakterisierung einer Reaktion herangezogen.

Für die Untersuchung der durchgeführten Reaktionen wurden die Umsatzraten ohne Lösungsmittelzusatz verwendet.

Für die CYP1A2-katalysierte Coffein- $\beta$ -Demethylierung konnten durch die im Vergleich zum Interaktionsscreening verlängerte Inkubationszeit auch bei den verringerten Substratkonzentrationen zur Detektion ausreichende Mengen des Metaboliten 1,7-Dimethylxanthin gebildet werden.

Aus der linearen Regression der nach Lineweaver-Burk umgeformten Werte konnten  $K_M$  und  $V_{max}$  ermittelt werden (Abb. 4.1).



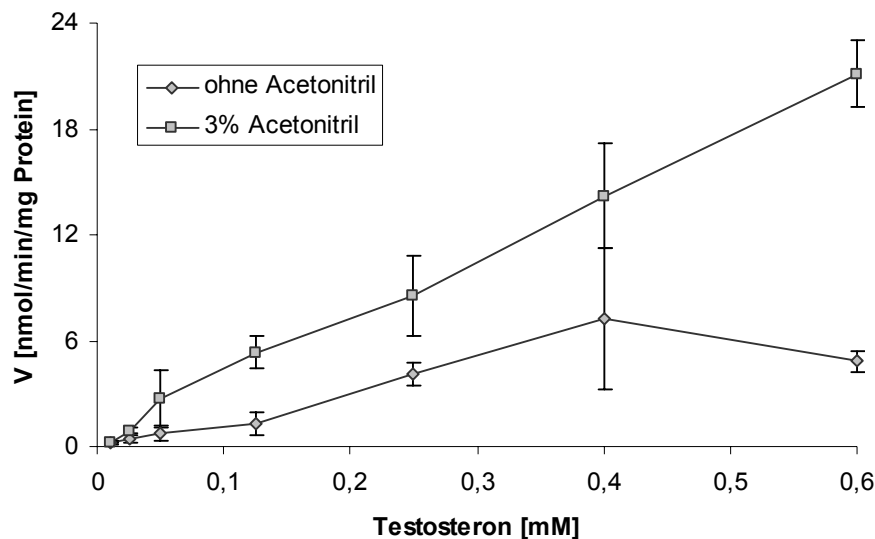
**Abb. 4.1: Doppelt-reziproke Auftragung der Bildungsraten des 1,7-Dimethylxanthins gegen die Substratkonzentration. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.**

Die Auswertung der Achsenabschnitte ergab für  $K_M = 0,43$  mM und für  $V_{max} = 0,27$  nmol/min/mg Protein. Für die ungehemmte Markerreaktion des CYP1A2 wurden  $K_M$ - und  $V_{max}$ -Werte bestimmt, die sich in guter Übereinstimmung zur Literatur befinden [Hickman *et al.*, 1998].

Auch für die Tolbutamid-Methylhydroxylierung, der CYP2C9-Markerreaktion musste die Inkubationszeit verlängert werden, um auch bei den verringerten Substratkonzentrationen zur Detektion ausreichende Mengen des Metaboliten Hydroxytolbutamid zu erhalten. Die Umformung nach Lineweaver-Burk ergab mit  $K_M = 0,1$  mM und  $V_{max} = 0,19$  nmol/min/mg Protein Werte, die den Literaturangaben entsprechen [Siebe, 1998].

Durch die hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion konnten für die Dextromethorphan-*O*-Desalkylierung durch CYP2D6 auch bei den verringerten Substratkonzentrationen zur Detektion ausreichende Mengen des Metaboliten Dextrophan gebildet werden. Die Umformung nach Lineweaver-Burk ergab für  $K_M = 10$   $\mu$ M und für  $V_{max} = 0,11$  nmol/min/mg Protein. Diese Werte befinden sich in guter Übereinstimmung zur Literatur [Hickman *et al.*, 1998].

Bei der Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung durch CYP3A4 war deutlich zu sehen, dass auch nach Erhöhung der untersuchten Substratkonzentrationen die Reaktion unter Acetonitrilzusatz im Vergleich zur lösungsmittelfreien Kontrolle keine Substratsättigung erreichte (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2:** *Bildungsraten des 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit und ohne Zusatz von Acetonitril. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus vier Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.*

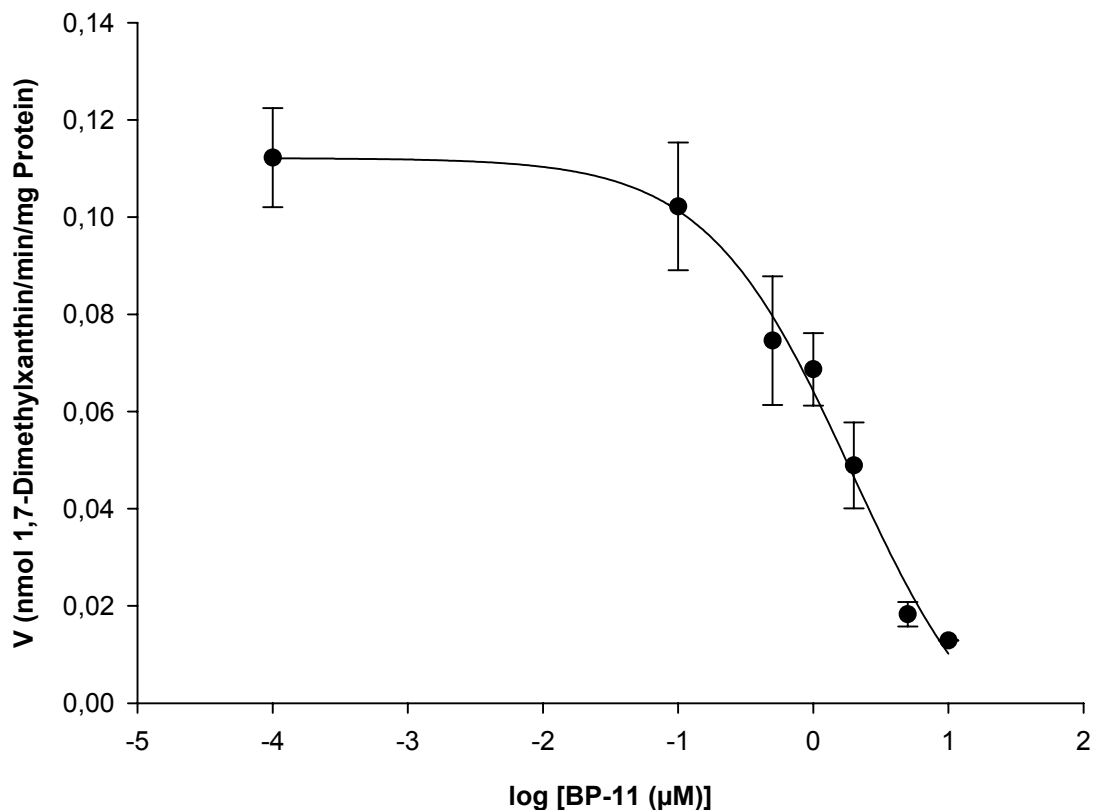
Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration war aufgrund der schlechten Löslichkeit des Testosterons im Inkubationsmedium nicht ohne weitere Erhöhung des Lösungsmittelzusatzes möglich. Da aber bereits aus den Vortests ersichtlich war, dass der Zusatz von Acetonitril zu einer deutlichen Veränderung der Umsetzungsraten von CYP3A4 führt, wäre durch variable Lösungsmittelanteile die Vergleichbarkeit der Messungen nicht mehr gegeben gewesen.

Die Umformung der Umsetzungsraten ohne Lösungsmittelzusatz nach Lineweaver-Burk ergab für  $K_M = 0,31$  mM und für  $V_{max} = 5,1$  nmol/min/mg Protein. Der  $K_M$ -Wert ist gegenüber 0,05 bis 0,13  $\mu$ M größer als in den Literaturangaben, allerdings entspricht der  $V_{max}$ -Wert den Angaben von 3 bis 20 nmol/min/mg Protein recht gut [Wang *et al.*, 1997, 2000].

### 4.3.2 Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte

Eine einfache Methode zur Quantifizierung einer Hemmwirkung ist die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes. Der  $IC_{50}$ -Wert ist die Konzentration eines Inhibitors, die eine 50%ige Hemmung der Markeraktivität ergibt. Dieser Wert wird, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, meist für die Substratkonzentration bestimmt, die dem  $K_M$ -Wert entspricht. Dafür wurden die Umsetzungsraten gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen und der Wendepunkt mit Hilfe sigmoidaler Regression bestimmt. Es wurde das Programm SigmaPlot SPSS Science Marketing verwendet.

Für die Coffein- $\beta$ -Demethylierung war 0,5 mM diejenige untersuchte Substratkonzentration, die dem ermittelten  $K_M$ -Wert am nächsten kam, daher wurde für sie der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3:** Auftragung der Bildungsraten des 1,7-Dimethylxanthins gegen die logarithmierte Konzentration von BP-11. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.

Der  $IC_{50}$ -Wert entspricht dem Wendepunkt der sigmoidalen Regression. Für 0,5 mM Coffein als Substrat der Markerreaktion des CYP1A2 ergibt sich für BP-11  $IC_{50} = 1,9 \pm 1 \mu\text{M}$ .

Die Daten, die für die untersuchten Isoenzyme nach dem gleichen Verfahren erhalten wurden, können der folgenden Tabelle entnommen werden (Tab. 4.1).

Isoenzym	Substrat	$K_M$ [mM]	Substrat-Konzentration [mM]	Inhibitor	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
CYP1A2	Coffein	0,43	0,5	BP-11	$1,9 \pm 1,0$
CYP2C9	Tolbutamid	0,1	0,1	BP-11	$5,5 \pm 1,0$
CYP2D6	Dextromethorphan	0,01	0,01	BP-11	$7,7 \pm 1,2$
CYP3A4	Testosteron	0,31	0,02	BP-11	$18,0 \pm 1,5$
			0,25	BP-11	$6,7 \pm 1,4$
			0,4	BP-11	$8,3 \pm 1,2$
CYP3A4	Testosteron	0,31	0,6	BP-11	$7,8 \pm 1,4$
			0,25	BP-D7	$3,2 \pm 1,3$
			0,4	BP-D7	$5,1 \pm 1,1$
			0,6	BP-D7	$6,0 \pm 1,2$

**Tab. 4.1:  $IC_{50}$ -Werte der Hemmung der CYP-Isoenzyme für BP-11 und BP-D7.**

Für CYP3A4 war die Bestimmung des  $K_M$ -Wertes nur für die Reaktionsansätze ohne Acetonitrilzusatz möglich, da aufgrund der starken Aktivitätssteigerung des Enzyms durch das Lösungsmittel in den Ansätzen, die Acetonitril enthielten, keine Substrat-sättigung mehr erreicht wurde. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Testosterons konnte die Substratkonzentration aber nicht weiter erhöht werden. Der  $K_M$ -Wert ohne Lösungsmittelzusatz hat daher wenig Aussagekraft für die Beurteilung der Inhibitionsstärke. Deshalb wurden statt für den  $K_M$ -Wert die  $IC_{50}$ -Werte bei BP-11 und BP-D7 für mehrere Substratkonzentrationen bestimmt.

Die ermittelte  $IC_{50}$  von 1,9  $\mu\text{M}$  für eine Substratkonzentration von 0,5 mM Coffein bestätigt die Ergebnisse des Interaktionsscreenings (siehe 3.3.2.2), wo für eine 1 mM Coffeinelösung nach Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  BP-11 eine mehr als 50%ige Hemmung beobachtet wurde. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die mittlere halbwirksame Konzentration  $MG_{MID} = -6,01$  entsprechend 0,98  $\mu\text{M}$ , die im „*in vitro* anticancer screening“ für BP-11 ermittelt wurde (siehe 3.3). Damit sind Interaktionen bei Gabe von BP-11 mit Substanzen, die durch CYP1A2 metabolisiert werden, als sehr wahrscheinlich einzustufen, ebenso eine Hemmung von CYP2C9.

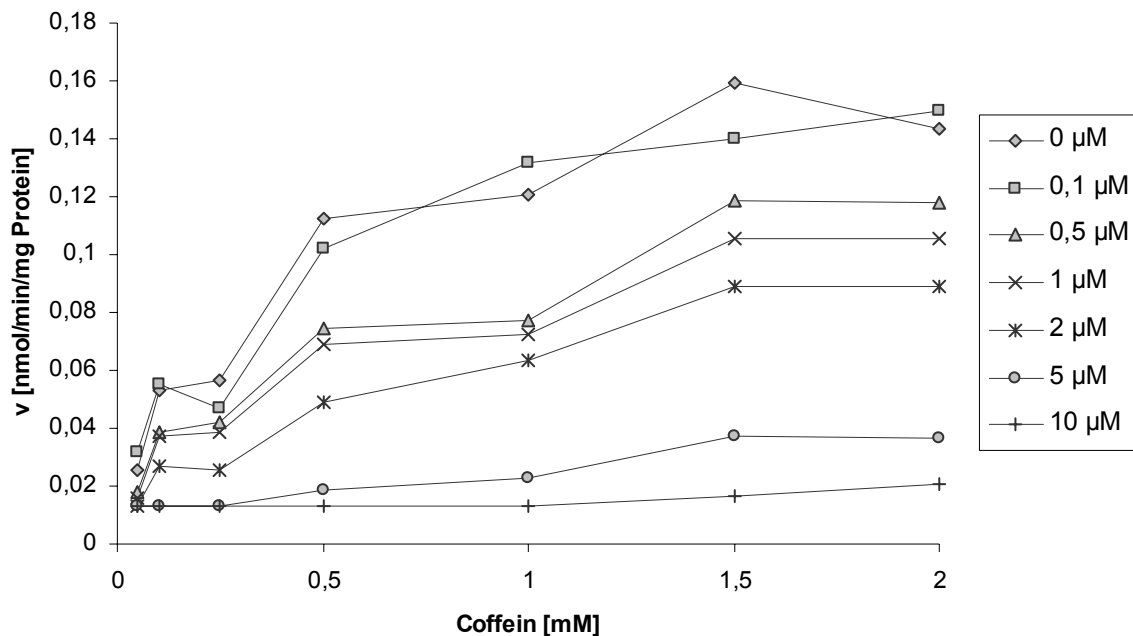
Auch die für 10  $\mu\text{M}$  Dextromethorphan ermittelte  $IC_{50}$  hat mit 7,7  $\mu\text{M}$  einen recht kleinen Wert. Allerdings handelt es sich bei der Hemmung der Dextromethorphan-*O*-Desalkylierung um eine kompetitive Hemmung, bereits bei einer Substratkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  fällt die Hemmung deutlich schwächer aus, die  $IC_{50}$  liegt hier bereits bei 18  $\mu\text{M}$ . Somit ist die Gefahr einer Interaktion gegenüber CYP2D6 sicherlich geringer einzustufen als für CYP1A2 und CYP2C9.

Für CYP3A4 machen die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte ebenfalls eine Interaktion wahrscheinlich, da alle Werte um maximal eine Größenordnung über den vom NCI ermittelten halbmaximalen Wirkkonzentrationen von 0,98  $\mu\text{M}$  für BP-11 und 0,3  $\mu\text{M}$  für BP-D7 liegen (siehe 3.3).

### 4.3.3 Charakterisierung der Inhibition

#### 4.3.3.1 CYP1A2 Coffein-*N*3-Demethylierung

Der Zusatz von BP-11 zu den Inkubationsansätzen bewirkte eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung der *N*3-Demethylierung. (Abb. 4.4)

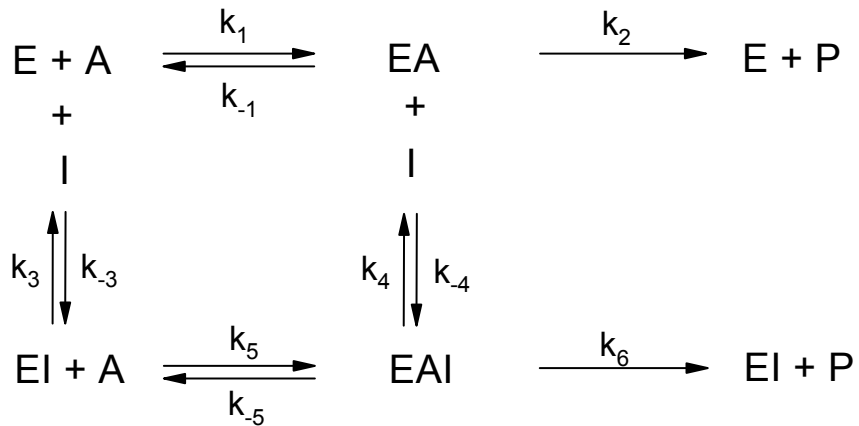


**Abb. 4.4:** *Bildungsraten des 1,7-Dimethylxanthins bei verschiedenen Substratkonzentrationen unter Zusatz steigender Konzentrationen BP-11. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.*

Aus den Umsetzungsraten konnten nach linearer Regression der nach Lineweaver-Burk umgeformten Werte aus den Steigungen und Ordinatenabschnitten  $K_M$  und  $V_{max}$  für die jeweiligen Konzentrationen an zugesetztem BP-11 ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass  $V_{max}$  mit steigender BP-11-Konzentration abnahm, wogegen  $K_M$  über einen weiten Konzentrationsbereich relativ konstant blieb. Dieses Verhalten ist charakteristisch für eine nicht-kompetitive Hemmung.

Für den allgemeinen Reaktionsmechanismus der reversiblen Enzymhemmung lassen sich folgende Reaktionen formulieren (Schema 1) [Bisswanger, 1994].



**Schema 1**

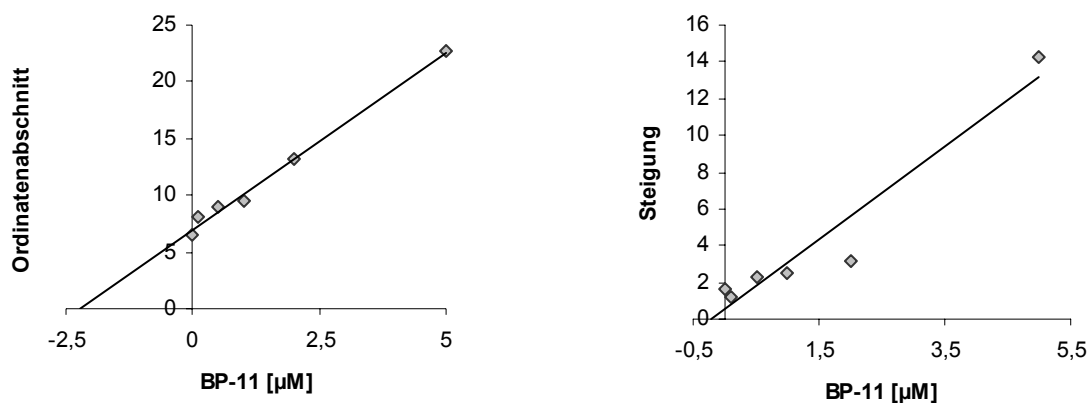
Dieses Reaktionsschema beschreibt eine gehemmte enzymatische Umsetzung ohne Beachtung der Rückreaktion. Der Reaktionsmechanismus beinhaltet jeweils zwei Dissoziationskonstanten für das Substrat A und den Hemmstoff I [Bisswanger, 1994]:

$$K_A = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad K_{Ai} = \frac{k_{-5}}{k_5} = \frac{[EI][A]}{[EAI]}$$

$$K_{ic} = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad K_{iu} = \frac{k_{-4}}{k_4} = \frac{[EA][I]}{[EAI]}$$

Die Dissoziationskonstanten des Hemmstoffs können als kompetitive bzw. unkompetitive Hemmkonstanten bezeichnet werden. Für eine kompetitive Hemmung gilt  $K_{iu} \rightarrow \infty$  und für eine reine nicht-kompetitive Hemmung gilt  $K_{ic} = K_{iu}$ . Ist  $K_{ic} \neq K_{iu}$  wird die Hemmcharakteristik als „mixed-type“ oder gemischte nicht-kompetitive Hemmung bezeichnet. Für die unkompetitive Hemmung gilt  $K_{ic} \rightarrow \infty$  [Bisswanger, 1994]. Die Bestimmung der Hemmkonstanten erfolgte jeweils durch Sekundärauftragungen der durch unterschiedliche BP-11-Konzentrationen veränderten Parameter der doppelt-reziproken Diagramme. Dabei wurden aus dem Abszissenschnittpunkt der Auftragung der Steigungen gegen die Hemmstoffkonzentrationen  $-K_{ic}$  und aus der Auftragung der Ordinatenschnittpunkte

– $K_{iu}$  erhalten [Bisswanger, 1994]. Dabei wurden in beiden Fällen die Werte für 10  $\mu\text{M}$  BP-11 ausgeschlossen, da dieser im Vergleich zur den anderen Werten keinen linearen Zusammenhang erkennen ließ, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass für diese Konzentration von BP-11 lediglich bei einer Substratkonzentration von 1,5 und 2 mM überhaupt eine Umsetzung des Coffeins detektiert werden konnte, und somit kein hyperboler Kurvenverlauf der Reaktion erzielt wurde. Aus diesem Grund war auch die Linearisierung und Verwendung der erhaltenen Parameter für die Sekundärauftragung mit zu großen Fehlern behaftet. Unter Verwendung der Werte für die Konzentrationen von BP-11 von 0-5  $\mu\text{M}$  ergab sich für  $K_{ic}$  ein Wert von 0,21  $\mu\text{M}$  und für  $K_{iu}$  ein Wert von 2,23  $\mu\text{M}$ . (Abb. 4.5) Damit ist die Bedingung  $K_{ic} < K_{iu}$  für die nicht-kompetitive Hemmung erfüllt.



**Abb. 4.5: Sekundärauftragungen der Steigungen und Ordinatenabschnitte aus den doppelt-reziproken Diagrammen für die Hemmung der N3-Demethylierung durch BP-11 gegen die Konzentration von BP-11.**

Bei einer nicht-kompetitiven Hemmung ist  $K_{iu}$  die ausschlaggebende Hemmkonstante, die mit einem Wert von  $K_{iu} = 2,23 \mu\text{M}$  eine gute Übereinstimmung mit der ermittelten  $IC_{50}$  aufweist. Beide Werte sind allerdings sehr niedrig, wenn man vergleichbare Untersuchungen aus der Literatur heranzieht [Beckmann-Knopp *et al.*, 1999, 2000], so dass Interaktionen von BP-11 mit Arzneistoffen, die durch CYP1A2 metabolisiert werden, zu befürchten sind.

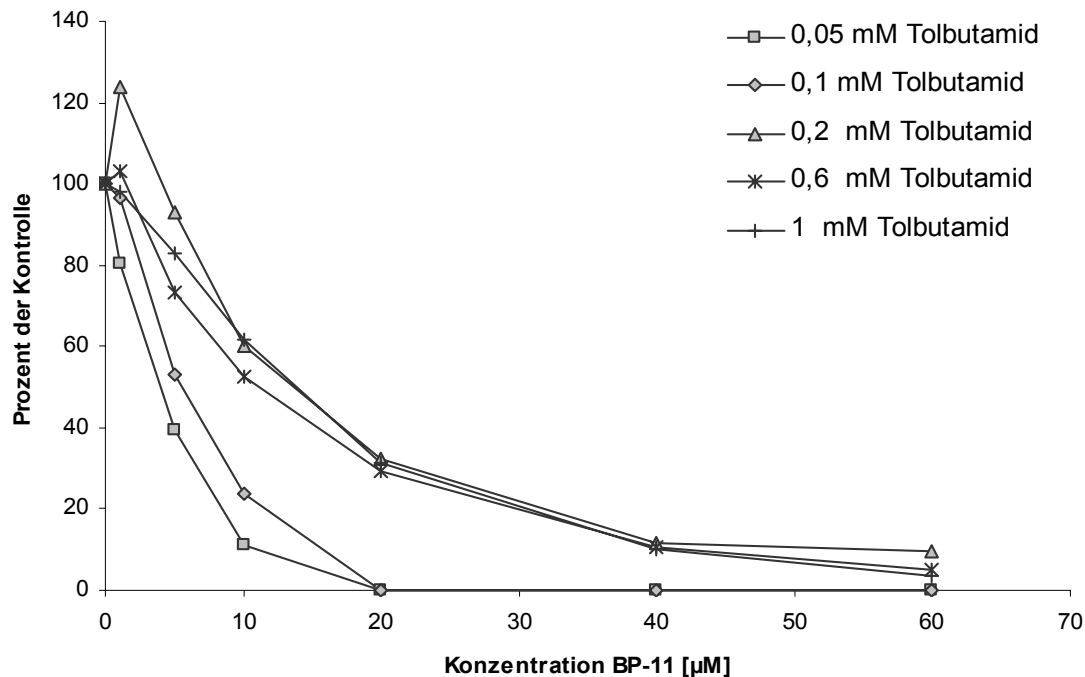
Liu *et al.* [1994] berichten, dass 2-Phenylphenanthridon durch kovalente Bindung eine irreversible Hemmung von CYP1A1 bewirkt, führen aber leider nicht auf, welches Strukturelement dieser Reaktion zugrunde liegt. Aufgrund der Tatsache, dass für Phenanthridon im Gegensatz zu Phenanthridin mutagene Eigenschaften festgestellt wurden [Seixas *et al.*, 1982], ließe sich allerdings vermuten, dass die Oxo-Funktion als reaktives Strukturelement hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Möglicherweise ist die auffällig starke Hemmung des CYP1A2 durch BP-11 auf einen ähnlichen Mechanismus, wenn auch wahrscheinlich ohne das Auftreten einer kovalenten Bindung, zurückzuführen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass CYP1A2 dasjenige Isoenzym ist, bei dem die Hemmung durch BP-11 am stärksten ausgeprägt ist.

#### **4.3.3.2 CYP2C9 Tolbutamid-Methylhydroxylierung**

Auch für dieses Isoenzym bewirkte der Zusatz von BP-11 zu den Inkubationsansätzen eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung der Metabolitenbildung. Allerdings ergab die Umformung der Daten nach Lineweaver-Burk nur für BP-11-Konzentrationen von 0-5  $\mu\text{M}$  Geraden, deren Achsenschnittpunkte korrekt ausgewertet werden konnten. Die Umformung beruht auf der Michaelis-Menten-Kinetik, die streng genommen nur für Einsubstratreaktionen gilt. Da sich die erhaltenen Daten nicht in das Modell einfügen ließen, lag der Schluss nahe, dass BP-11 keinen reinen Inhibitor für CYP2C9 darstellt, sondern als alternatives Substrat zu Tolbutamid fungiert. Um diese Hypothese zu unterstützen wurden Inkubationen mit rekombinant gewonnenem CYP2C9 durchgeführt (siehe 6.3.5). Für eine Sekundärauftragung wie sie zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte für die Coffein-N3-Demethylierung durchgeführt wurde (siehe 4.3.3.1), war die Datenbasis mit nur drei Inhibitorkonzentrationen zu gering.

Stattdessen wurde analog zu Wang *et al.* [2000] eine andere Auftragung gewählt, um die Hemmung weiter charakterisieren zu können (Abb. 4.6).



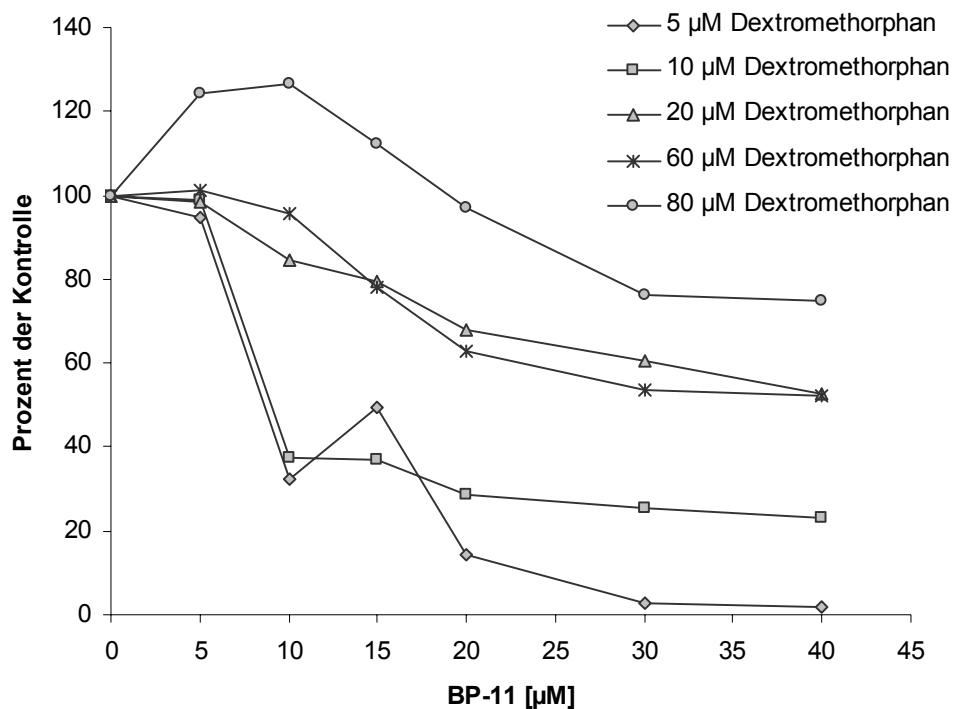
**Abb. 4.6:** *Bildungsraten (in Prozent der Kontrolle mit Acetonitril) des Hydroxytolbutamids bei Tolbutamid-Konzentrationen von 0,05; 0,1; 0,2; 0,6 und 1 mM unter Zusatz steigender Konzentrationen BP-11. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden. Die entsprechenden Kontrollaktivitäten betragen 0,09; 0,13; 0,15; 0,31 und 0,30 nmol/min/mg Protein.*

In dieser Darstellung wird deutlich, dass die Steigerung der Konzentration von BP-11 auch bei einer Substratkonzentration des zehnfachen  $K_M$ -Wertes eine nahezu vollständige Hemmung bewirken konnte. Außerdem ist zu sehen, dass ab einer Konzentration von 0,2 mM die weitere Erhöhung der Substratkonzentration keine zusätzliche Steigerung der Umsatzraten bewirken konnte, es sich also nicht um eine klassische kompetitive Hemmung handeln kann. Während ein Zusatz von 40  $\mu\text{M}$  BP-11 bei allen untersuchten Substratkonzentrationen zu einer nahezu vollständigen Hemmung führt, ist bei einem Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  BP-11, und damit dem zehnfachen der halbmaximalen Wirkkonzentration, ab einer Substratkonzentration von 0,2 mM eine Hemmung um weniger als 50% zu beobachten. Trotzdem ist auch für CYP2C9 eine Interaktion mit Arzneistoffen, die durch dieses P450-Isoenzym verstoffwechselt

werden, zu befürchten, wenn diese auch wahrscheinlich schwächer als für CYP1A2 ausfallen wird.

#### 4.3.3.3 CYP2D6 Dextromethorphan-*O*-Desalkylierung

Der Zusatz von BP-11 zu den Inkubationsansätzen bewirkte eine relativ schwache aber konzentrationsabhängige Hemmung der *O*-Demethylierung. Allerdings ergab wie für CYP2C9 die Umformung der Daten nach Lineweaver-Burk keine korrekt auswertbaren Geraden, so dass BP-11 wahrscheinlich auch für CYP2D6 keinen reinen Inhibitor darstellt, sondern als alternatives Substrat zu Dextromethorphan umgesetzt wurde. Auch hier wurde analog zu Wang *et al.* [2000] eine andere Auftragung gewählt, um die Hemmung weiter charakterisieren zu können (Abb. 4.7).

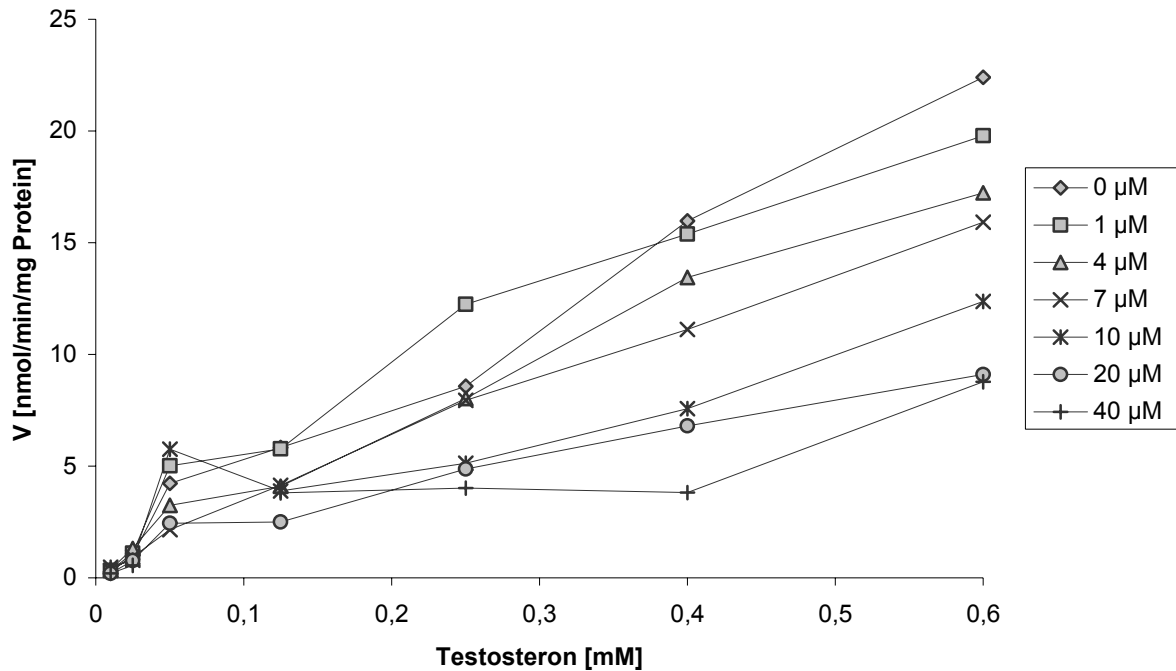


**Abb. 4.7:** Bildungsraten (in Prozent der Kontrolle mit Acetonitril) des Dextromethorphan bei Dextromethorphan-Konzentrationen von 5, 10, 20, 60 und 80  $\mu\text{M}$  unter Zusatz steigender Konzentrationen BP-11. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden. Die entsprechenden Kontrollaktivitäten betragen 0,015; 0,038; 0,043; 0,055 und 0,056 nmol/min/mg Protein.

In dieser Darstellung wird deutlich, dass die Steigerung der Konzentration von BP-11 nur bei einer Substratkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine nahezu vollständige Hemmung bewirken konnte. Bei einer Erhöhung der Substratkonzentration dagegen wird die prozentuale Hemmung geringer, ab einer Substratkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  wird die Umsetzung bei allen eingesetzten Konzentrationen von BP-11 um weniger als die Hälfte gehemmt. Es handelt sich um eine partielle Hemmung, die einem kompetitiven Mechanismus folgt. Ein geringer Zusatz von BP-11 bewirkte ab einer Substratkonzentration von 60  $\mu\text{M}$  sogar eine Steigerung der *O*-Demethylierung. Zudem ist zu beachten, dass Dextromethorphan und BP-11 in ähnlichen Konzentrationen eingesetzt wurden. Insgesamt ist daher die Hemmung der CYP2D6-katalysierten *O*-Demethylierung des Dextromethorphans durch BP-11 relativ schwach ausgeprägt. Die Auswirkung der Interaktion von BP-11 mit CYP2D6 ist daher im Vergleich zu CYP1A2 und CYP2C9 sicherlich als geringer einzustufen.

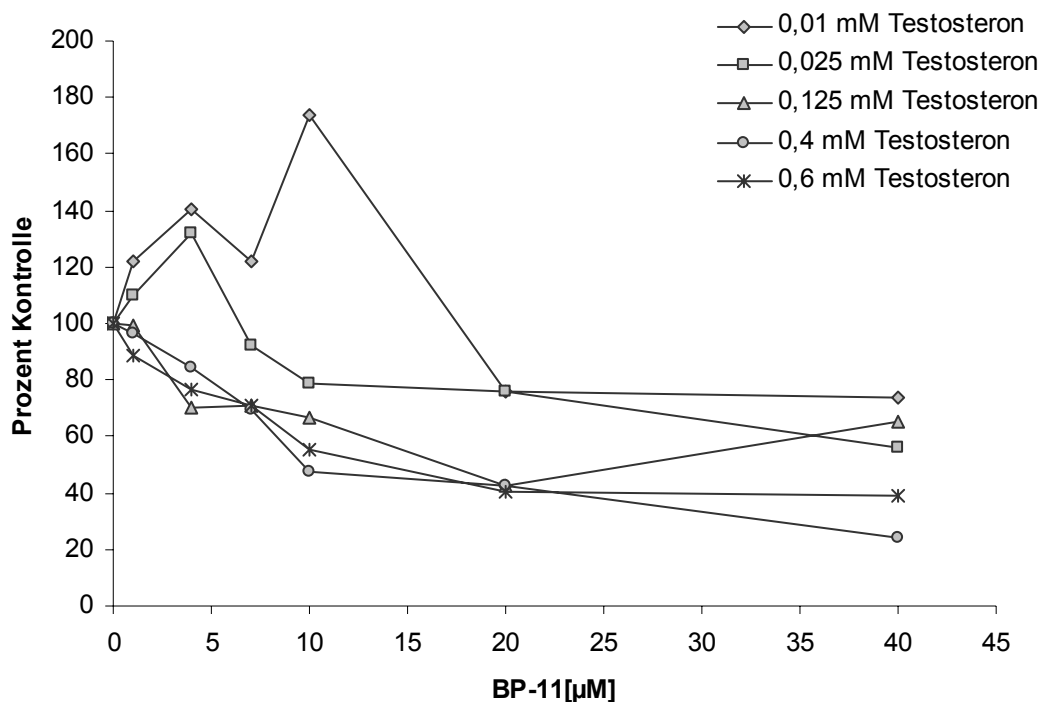
#### 4.3.3.4 CYP3A4 Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung

Der Zusatz von BP-11 zu den Inkubationsansätzen bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der 6 $\beta$ -Hydroxylierung (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8:** *Bildungsraten des 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron bei verschiedenen Substratkonzentrationen unter Zusatz steigender Konzentrationen BP-11. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.*

Für eine Umformung der Daten nach Lineweaver-Burk war der Konzentrationsbereich des Substrats nicht groß genug, da keine Sättigung erreicht werden konnte, eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration ohne weiteren Lösungsmittelzusatz aber unmöglich war. Daher wurde wie für CYP2C9 und CYP2D6 analog zu Wang *et al.* [2000] eine andere Auftragung gewählt, um die Hemmung weiter charakterisieren zu können (Abb. 4.9).



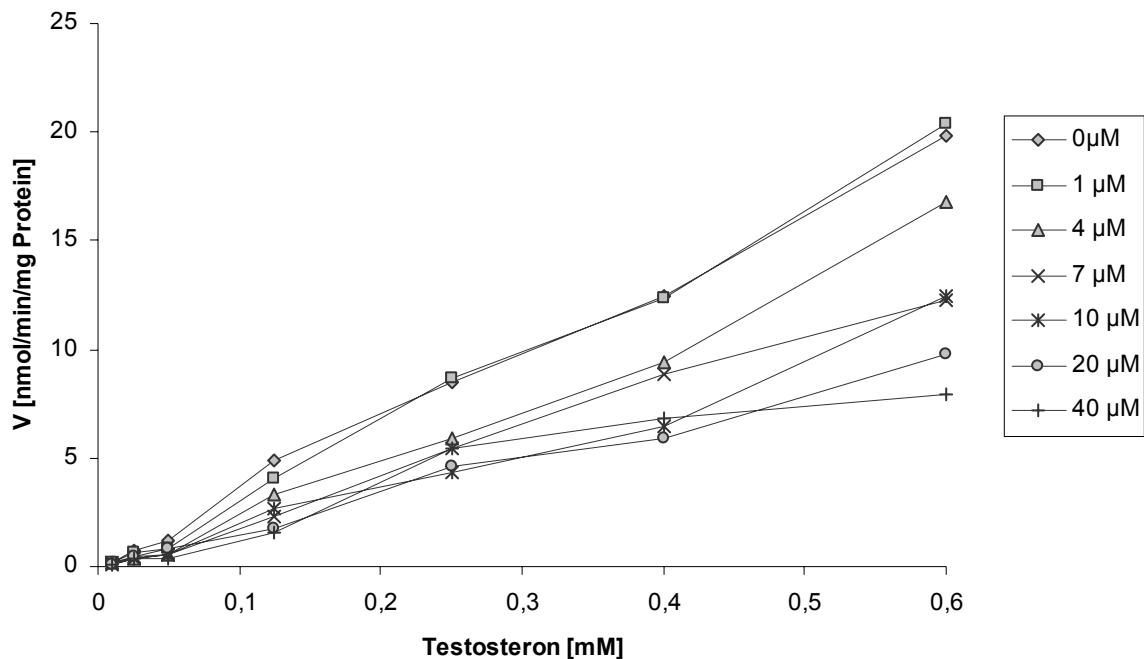
**Abb. 4.9:** *Bildungsraten (in Prozent der Kontrolle mit Acetonitril) des 6β-Hydroxytestosterons bei Testosteron-Konzentrationen von 0,01; 0,025; 0,125; 0,4 und 0,6 mM unter Zusatz steigender Konzentrationen BP-11. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden. Die entsprechenden Kontrollaktivitäten betragen 0,27; 1,0; 5,8; 16,0 und 22,4 nmol/min/mg Protein.*

In dieser Darstellung wird deutlich, dass die Steigerung der Konzentration von BP-11 bei keiner Substratkonzentration eine vollständige Hemmung bewirken konnte. Die Graphik scheint sogar eine Steigerung der Umsatzraten bei niedrigen Substrat- und BP-11-Konzentrationen zu zeigen. Da dieses Phänomen aber nur bei den beiden kleinsten Substratkonzentrationen zu beobachten ist, handelt es sich wohl eher um einen Effekt, der durch die größeren Schwankungen bei der Konzentrationsbestimmung des Metaboliten nahe der Bestimmungsgrenze auftritt, was durch die prozentuale Auftragung besonders deutlich wird. Eine Abhängigkeit der Inhibition von der Substratkonzentration ist nicht festzustellen, es scheint sich um eine partielle, nicht-kompetitive Hemmung zu handeln. Die für BP-11 beobachtete Hemmung der Testosteron-6β-Hydroxylierung ist gerade im niedrigen Bereich der



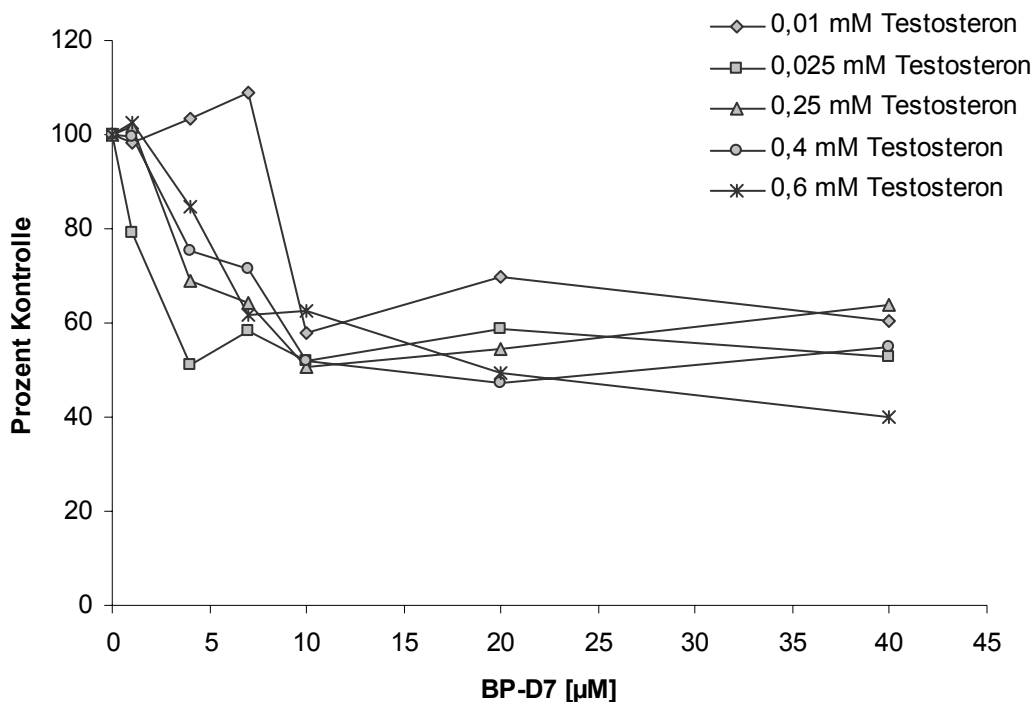
Substratkonzentration geringer als z.B. für Terfenadin, Midazolam und Nifedipin berichtet wurde [Wang *et al.*, 2000].

Auch der Zusatz von BP-D7 zu den Inkubationsansätzen bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der 6 $\beta$ -Hydroxylierung (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10:** *Bildungsraten des 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron bei verschiedenen Substratkonzentrationen unter Zusatz steigender Konzentrationen BP-D7. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.*

Die Auftragung der Daten analog zu Wang *et al.* [2000] zeigte den partiellen Charakter der Hemmung der Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung durch BP-D7 (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11:** *Bildungsraten (in Prozent der Kontrolle mit Acetonitril) des 6 $\beta$ -Hydroxytestosterons bei Testosteron-Konzentrationen von 0,01; 0,025; 0,25; 0,4 und 0,6 mM unter Zusatz steigender Konzentrationen BP-D7. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden. Die entsprechenden Kontrollaktivitäten betragen 0,18; 0,78; 8,5; 12,4 und 19,9 nmol/min/mg Protein.*

Es ist deutlich zu sehen, dass die Steigerung der Konzentration von BP-D7 bei keiner Substratkonzentration eine vollständige Hemmung bewirken konnte, die maximale Hemmung durch 40  $\mu$ M BP-D7 lag zwischen 40 und 60 %. Diese Werte werden aber bereits nach Zusatz von 10  $\mu$ M BP-D7 beobachtet, eine weitere Erhöhung der Konzentration führt nicht zu einer weiteren signifikanten Senkung der Umsetzungsraten. Gegebenenfalls ist dieser Effekt aber auch darauf zurückzuführen, dass bei einer BP-D7-Konzentration von 40  $\mu$ M bereits die Löslichkeit in 3% DMSO überschritten ist. Eine Abhängigkeit der Inhibition von der Substratkonzentration war nicht festzustellen, es scheint sich um eine partielle, nicht-kompetitive Hemmung zu handeln. Ebenso wie BP-11 zeigt auch BP-D7 im Vergleich zu den Referenzsubstanzen [Wang *et al.*, 2000] für niedrige Substratkonzentrationen eine eher

geringere Hemmung, bei höheren Substratkonzentrationen ist die Inhibition vergleichbar.

Nachdem weder für BP-11 noch für BP-D7 eine klare Substrat-Konzentrationsabhängigkeit für die Stärke der Hemmwirkung in Abhängigkeit der Menge des zugesetzten Benzo[*c*]phenanthridins zu beobachten war, ist auch hier anzunehmen, dass BP-11 und BP-D7 keine Inhibitoren sind, sondern lediglich alternative Substrate für CYP3A4 darstellen. Für CYP3A4 ist bekannt, dass es eine Vielzahl strukturell sehr unterschiedlicher Substrate metabolisieren kann, weswegen die Kinetik bei Anwesenheit mehrerer Substrate oft schwer zu beschreiben ist bzw. eine sehr große Variabilität aufweist [Wang *et al.*, 2000]. Eine Hemmung dieses Isoenzym birgt daher ein großes Interaktionspotential. Allerdings ist trotz der niedrigen IC<sub>50</sub>-Werte durch das Auftreten einer lediglich partiellen Hemmung das Interaktionspotential von BP-11 und BP-D7 gegenüber CYP3A4 nicht höher als für bekannte Arzneistoffe wie Terfenadin und Midazolam zu erwarten.

#### **4.4 Zusammenfassung**

Für die untersuchten Markerreaktionen der Cytochrom P450-Isoenzyme CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4 konnten durch Linearisierung nach Lineweaver-Burk  $K_M$ - und  $V_{max}$ -Werte bestimmt werden, die der Literatur entsprachen. Zur Quantifizierung der Hemmwirkung wurden die halbmaximalen Hemmkonzentrationen IC<sub>50</sub> ermittelt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden diese Werte bei einer dem  $K_M$ -Wert entsprechenden Substratkonzentration bestimmt. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte lagen für BP-11 je nach Isoenzym zwischen 1,9 und 7,8  $\mu\text{M}$ , für BP-D7 wurde für CYP3A4 5,1  $\mu\text{M}$  bestimmt. Da die durchschnittlichen halbmaximalen Wirkkonzentrationen für BP-11 bei 0,98  $\mu\text{M}$  und für BP-D7 bei 0,3  $\mu\text{M}$  liegen, ist eine Interaktion von BP-11 mit allen untersuchten Isoenzymen zu erwarten und auch eine Interaktion von BP-D7 mit Stoffen, die ebenfalls über CYP3A4 metabolisiert werden, ist wahrscheinlich.

Zur weiteren Charakterisierung der Inhibition wurden die Inhibitionstypen untersucht. Dabei ergab sich für die Hemmung von CYP1A2 durch BP-11 eine nicht-kompetitive Hemmung mit  $K_{iu} = 2,23 \mu\text{M}$ . Für die Hemmung von CYP2C9 durch BP-11 konnte nur für niedrige Substrat- und Inhibitorkonzentrationen eine kompetitive Hemmung beobachtet werden, während die Verringerung der Umsetzungsraten auf 15% der Kontrollaktivität durch Zusatz von  $40 \mu\text{M}$  BP-11 nicht durch Erhöhung der Substratkonzentration ausgeglichen werden konnte.

Eine kompetitive Hemmung trat dagegen durch den Zusatz von BP-11 zur Markerreaktion des CYP2D6 auf. Die Erhöhung der Substratkonzentration konnte die Aktivität in Gegenwart von  $40 \mu\text{M}$  BP-11 von 3% der Kontrollaktivität bei  $5 \mu\text{M}$  Dextromethorphan auf 75% bei  $80 \mu\text{M}$  Dextromethorphan steigern.

Für die Hemmung von CYP3A4 ist durch beide 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine eine partielle, nicht-kompetitive Hemmung zu verzeichnen. Die maximale Hemmung lag für BP-11 zwischen 30 und 75% der Kontrolle, bei BP-D7 zwischen 40 und 60%. Da keine klare Konzentrationsabhängigkeit für die Stärke der Hemmwirkung zu beobachten war, ist anzunehmen, dass BP-11 und BP-D7 keine Inhibitoren sind, sondern alternative Substrate für das CYP3A4 darstellen. Die Hemmung dieses Isoenzym birgt zwar aufgrund der Vielzahl der durch dieses metabolisierten Substanzen ein großes Interaktionspotential, die Hemmung durch die untersuchten Verbindungen ist aber nicht höher als für einige etablierte Arzneistoffe. Während für BP-11 klinisch relevante Wechselwirkungen zu befürchten sind, ist dieses Risiko bei BP-D7 deutlich geringer.

---

## 5 SYNTHESE VERWENDETER VERBINDUNGEN

### 5.1 Einleitung und Zielsetzung

Oxidationen an Stickstoffatomen sind häufig Bestandteil der Biotransformation stickstoffhaltiger Substanzen. Daher sollten ausgehend von den 6-Aminoverbindungen die 6-*N*-Hydroxy-Derivate von BP-7 und BP-D7 synthetisiert werden, um zum einen Referenzsubstanzen für die LC-MS-Analytik der *in vitro*-Biotransformationsansätze zu gewinnen und zum anderen, um die Reduktion dieser *N*-oxidierten Verbindungen durch verschiedene Enzymquellen untersuchen zu können.

### 5.2 Material und Methoden

#### 5.2.1 Material und Geräte

2-Methylbenzotrinitril, *tert*-Butylnitrit (Fa. Aldrich, Steinheim); Cyclohexan, DDQ, Dioxan, DMF, DMPU, DMSO- $d_6$ , Ethylacetat, Hydroxylamin-HCl, Kalium-*tert*-butanolat, Kieselgel, Phosphorylchlorid, 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (Fa. Merck, Darmstadt).

#### Geräte

Für die NMR-Spektroskopie wurde ein Kernresonanzspektrometer Bruker ARX 300 mit folgenden Parametern verwendet:

$^1\text{H}$ -NMR: Messfrequenz: 300.13 MHz

$^{13}\text{C}$ -NMR: Messfrequenz: 75.47 MHz

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS)

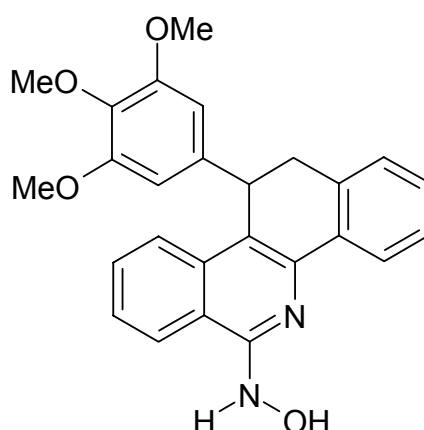
Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, m = Multipllett, mc = bei... zentriertes Multipllett,  $J$  = Kopplungskonstante in Hz, Ar = Aromat, die Auswertung erfolgte nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung

Für die Massenspektrometrie wurde ein Bruker Esquire-LC mit Elektro-Spray-Ionisation (ESI) verwendet, die HPLC-Trennung entsprach 6.2.3.5.

Die hochauflösende Massenspektrometrie wurde mit einem Finnigan MAT 8230 MS, 70 eV (Institut für Organische Chemie der CAU Kiel) vorgenommen.

### 5.2.2 Synthese von 6-*N*-Hydroxy-BP-7



BP-7 und das 6-Oxoderivat BP-O7 wurden nach Wolschendorf [2000] und das 6-Chlorderivat BP-Cl7 nach zur Nieden [2005] synthetisiert. Zur Synthese des 6-*N*-Hydroxy-Derivats BP-NHOH7 wurden 50 mg BP-Cl7 in 20 ml wasserfreiem Dioxan gelöst und nach Zugabe von Hydroxylamin-Base [Steudel *et* Schenk, 1975] im Überschuss 5 Stunden unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Fließmittel Cyclohexan : Ethylacetat (7:3) unterzogen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand durch LC-MS-Analytik auf Identität und Reinheit geprüft und die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Die Lagerung der Verbindung erfolgte aufgrund der thermischen Instabilität bei  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Ausbeute: 2-3 mg (5%) 6-(*N*-Hydroxy-)amino-11,12-dihydro-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)benzo[*c*]phenanthridin

Der Nachweis der elementaren Zusammensetzung erfolgte durch hochauflösende Massenspektroskopie.

$C_{26}H_{24}N_2O_4$  (428.17)

Ber.: 428.17361

Gef.: 428.17389

### $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ):

$\delta/\text{ppm}$  (TMS) = 3.02 (d, 1H, H-12a,  $^2J_{(\text{H-12a}, \text{H-12b})} = 15,4$  Hz), 3.50\* (mc, 1H, H-12b), 3.50 (s, 6H, 2  $-\text{OCH}_3$ ), 3.52 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.43 (d, 1H, H-11,  $^3J_{(\text{H-11}, \text{H-12b})} = 6,7$  Hz), 6.34 (s, 2H, Ar-H), 7.18 (d, 1H, Ar-H), 7.30 (m, 2H, Ar-H), 7.40 (m, 2H, Ar-H), 7.46 (d, 1H, Ar-H), 7.65 (d, 1H, Ar-H), 7.96 (d, 1H, Ar-H), 8.60 (s, 1H, N-H), 10.20 (s, 1H, O-H).

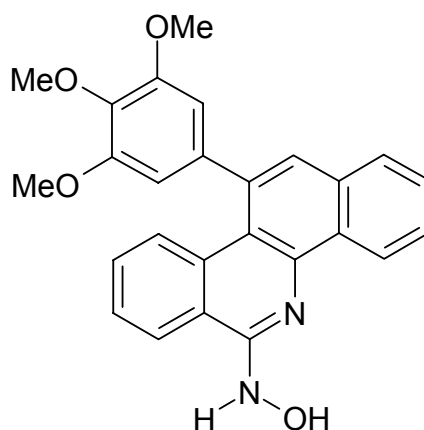
\* überlagert durch die Signale der Methoxygruppen

ESI-MS (die LC-Trennung erfolgte analog zu 6.2.3.5)

MS: 429.4 Th  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 412.5 Th

$\text{MS}^2$ : 412.5 Th

### 5.2.3 Synthese von 6-*N*-Hydroxy-BP-D7



Die Synthese wurde analog zur Herstellung von 6-*N*-Hydroxy-BP-7 (siehe 5.2.2) durchgeführt. Die Dehydrierung mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon (DDQ) wurde mehrfach beschrieben [Clement *et al.*, 2005; Kock *et al.* 2005] und führte zum gewünschten Zwischenprodukt 6-Oxo-BP-D7 (BP-DO7).

Ausbeute: 5-6 mg (10%) 6-(*N*-Hydroxy-)amino-11-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-benzo[*c*]phenanthridin

Der Nachweis der elementaren Zusammensetzung erfolgte durch hochauflösende Massenspektroskopie.

$C_{26}H_{22}N_2O_4$  (426.16)

Ber.: 428.15796

Gef.: 428.15781

### **$^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):**

**$\delta$ /ppm (TMS)** = 3.71 (s, 6H, 2 -OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.71 (s, 2H, Ar-H), 7.13 (m, 2H, Ar-H), 7.29 (m, 1H, Ar-H), 7.48 (s, 1H, Ar-H), 7.65 (m, 2H, Ar-H), 7.93 (m, 1H, Ar-H), 8.02 (d, 1H, Ar-H), 8.22 (m, 1H, Ar-H), 9.22 (s, 1H, N-H), 10.57 (s, 1H, O-H).

### **$^{13}C$ -NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):**

**$\delta$ /ppm (TMS)** = 56.0 (2C, 2 -OCH<sub>3</sub>), 60.3 (-OCH<sub>3</sub>), 106.3 (2C), 120.1, 122.9, 123.4, 126.6, 127.1, 127.6 (2C), 128.4 (2C) (11C, C-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9, -10, -12, -2', -6'), 111.3, 120.4, 125.3, 130.8, 132.4, 133.4, 137.0, 137.4, 138.7, 144.0, 153.3 (2C) (12 C, C-4a, -4b, -6, -6a, -10a, -10b, -11, -12a, -1', -3', -4', -5').

ESI-MS (die LC-Trennung erfolgte analog zu 6.2.3.5)

MS: 427.4 Th, 410.5 Th

MS<sup>2</sup>: 410.5 Th, 395.5 Th,

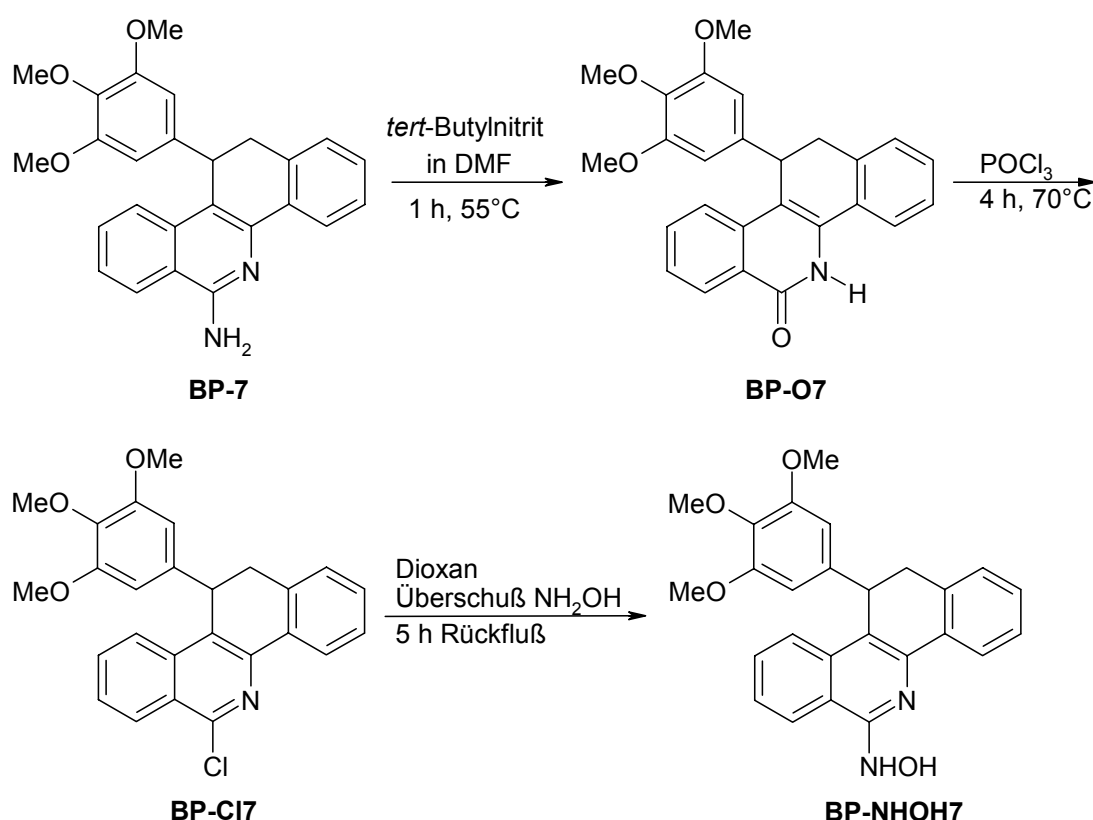
MS<sup>3</sup>: 395.5 Th, 379.3 Th, 367.4 Th, 352.4 Th, 335.5 Th



## 5.3 Ergebnisse und Diskussion

### 5.3.1 Synthese von 6-*N*-Hydroxy-BP-7

Die gewünschte Verbindung konnte aus dem 6-Aminoderivat BP-7 über die Zwischenprodukte 6-Oxo-BP-7 und 6-Chlor-BP-7 synthetisiert werden (Abb. 5.1).



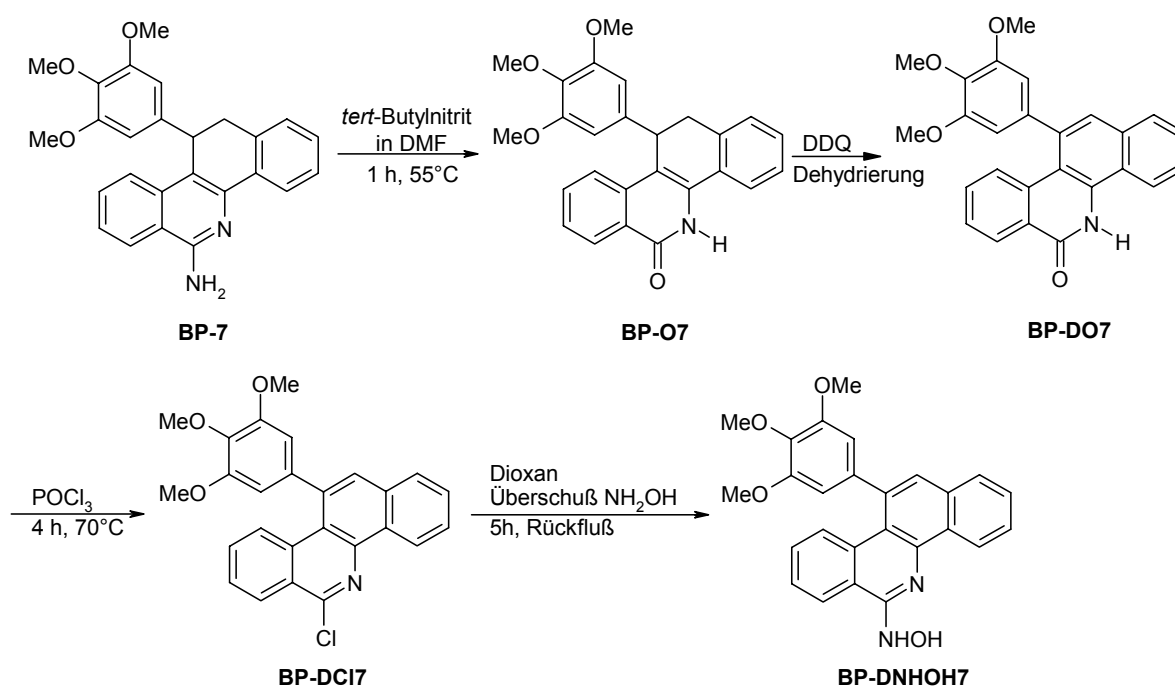
**Abb. 5.1:** Umsetzung von BP-7 zu 6-*N*-Hydroxy-BP-7.

Die Synthese von BP-7 aus 2-Methylbenzonnitril und 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd in DMPU unter Zusatz von Kalium-*tert*-butanolat erfolgte nach der Vorschrift von Wolschendorf [2000], ebenso die Umsetzung mit *tert*-Butylnitrit in DMF zum 6-Oxo-Derivat BP-O7. Das 6-Chlorderivat BP-Cl7 wurde durch Umsetzung mit Phosphorylchlorid erhalten [zur Nieden, 2005]. Zur Synthese des 6-*N*-Hydroxy-Derivats BP-NHOH7 wurde 6-Cl-BP-7 in wasserfreiem Dioxan gelöst und nach Zugabe von Hydroxylamin-Base [Steudel *et* Schenk, 1975] im Überschuss unter Rückfluss

gerührt. Aufgrund der thermischen Instabilität musste das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt werden, da sich das Produkt beim Entfernen des Dioxans am Rotationsverdampfer zersetzt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand durch LC-MS-Analytik auf Identität und Reinheit geprüft und die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Aufgrund der thermischen Instabilität war eine Lagerung der Verbindung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  erforderlich.

### 5.3.2 Synthese von 6-*N*-Hydroxy-BP-D7

Die gewünschte Verbindung wurde aus dem 6-Aminoderivat BP-7 über die Zwischenprodukte 6-Oxo-BP-7, 6-Oxo-BP-D7 und 6-Chlor-BP-D7 synthetisiert (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2:** Umsetzung von BP-7 zu 6-*N*-Hydroxy-BP-D7.

Die Synthese wurde analog zur Herstellung von 6-*N*-Hydroxy-BP-7 (siehe 5.3.1) durchgeführt. Die Dehydrierung mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-*p*-benzochinon (DDQ)

---

wurde mehrfach beschrieben [Clement *et al.*, 2005; Kock *et al.* 2005] und führte zum gewünschten Zwischenprodukt 6-Oxo-BP-D7 (BP-DO7). Der Versuch BP-D7 mit Hilfe von *tert*-Butylnitrit in das 6-Oxo-Derivat zu überführen verlief erfolglos.

## 5.4 Zusammenfassung

Die gewünschten *N*-hydroxylierten Derivate von BP-7 und BP-D7 konnten erfolgreich aus den 6-Aminoderivaten über die 6-Oxo- und 6-Chlorverbindungen synthetisiert und charakterisiert werden. Aufgrund der thermischen Instabilität der Verbindungen war eine Lagerung bei -18°C erforderlich.

## **6 IN VITRO-METABOLISMUS AUSGEWÄHLTER 6-AMINOBENZO[*c*]PHENANTHRIDINE**

### **6.1 Einleitung und Zielsetzung**

Ein wichtiger Teil der präklinischen Untersuchungen neuer Wirkstoffe ist neben der physikochemischen Charakterisierung die Aufklärung des Metabolismus. Durch eine frühzeitige Untersuchung der Metabolismuswege können die Metaboliten ihrerseits auf pharmakologische und toxikologische Bedeutung untersucht werden. Bei zu rascher Inaktivierung kann auch eine Einführung metabolischer Schutzgruppen in das Molekül erforderlich werden. Die Kenntnis der Metabolismuswege kann daher die weitere Entwicklung von Wirkstoffen entscheidend beeinflussen [Lin *et al.*, 1997]. Im Rahmen der Untersuchungen für die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine sollten zur Vermeidung von Tierversuchen zunächst *in vitro*-Untersuchungen bevorzugt durchgeführt werden. Die typischen Enzymquellen für diese Untersuchungen sind neben isolierten Organen und Zellen vor allem Zellorganellen. Besonders häufig werden Lebermikrosomen für Metabolismusstudien verwendet, da die Leber das wichtigste Organ für die Biotransformation von Xenobiotika darstellt. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit und um die Untersuchungen, die zum Ziel haben, das Schwein als Metabolismusmodell für den Menschen zu etablieren [Anzenbacher *et al.*, 1998; Anzenbacherova *et al.*, 2003; Clement *et al.*, 2001], weiter voranzutreiben, sollten die Inkubationen zunächst mit porcinen Lebermikrosomen durchgeführt werden. Im Anschluss an die Strukturaufklärung der Metaboliten durch LC-MS-Untersuchungen sollten dann die Ergebnisse aus Inkubationen von humanen Lebermikrosomen und rekombinant gewonnenen humanen CYP450-Isoenzymen verglichen werden.

Da die 11,12-Dihydro-Verbindungen BP-7 und BP-8 in *in vitro*-Tests eine deutlich geringere Wirksamkeit als die maximal ungesättigten Strukturen aufwiesen, dieses Phänomen *in vivo* aber nicht bestätigt werden konnte [Kock *et al.*, 2005], sollte untersucht werden, ob die dihydrierten Verbindungen ein Prodrug darstellen

könnten. Außerdem sollte durch Vergleich mit synthetisch gewonnenen Referenzsubstanzen untersucht werden, ob potentielle Metaboliten, wie 6-Oxo-Derivate und am Stickstoff oxidierte Strukturen im Rahmen der Biotransformation entstehen.

Die Inkubationen mit rekombinant gewonnenen CYP450-Isoenzymen sollten außerdem durchgeführt und per LC-MS analysiert werden, um festzustellen, ob die untersuchten Verbindungen Substrate für diese Enzyme darstellen. Es wurden diejenigen Cytochrom P450-Isoenzyme ausgewählt, bei denen eine Hemmung der Markerreaktion durch den Zusatz der Benzo[*c*]phenanthridine beobachtet werden konnte (siehe 4.4).

## **6.2 Material und Methoden**

### **6.2.1 Enzymquellen**

#### **6.2.1.1 Material und Geräte**

Trispuffer, DTT (Fa. Merck, Darmstadt). Die übrigen verwendeten Materialien und Geräte entsprechen den Angaben unter 3.2.1.1 Humane Lebermikrosomen.

Weitere Angaben zu Chemikalien und Geräten, die zur Bereitung und Charakterisierung der Enzymquellen verwendet wurden, erfolgen bei der Beschreibung der jeweiligen Methode.

#### **6.2.1.2 Porcine Lebermikrosomen**

Die Lebern, die vom örtlichen Schlachthof in Flintbek geholt wurden, wurden direkt nach der Entnahme für den Transport in eisgekühlten Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 überführt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten bei einer Temperatur zwischen 0 und 4°C, um Denaturierungsprozesse der Enzyme zu vermindern.

Zunächst erfolgte eine Perfusion der Leberlappen mit einem 50 mM Phosphatpuffer

pH 7,4, dem 1 mM EDTA zur Komplexbildung von Calciumionen zugesetzt wurde, um das Blut zu entfernen. Anschließend wurden die Leberteile klein geschnitten und mehrmals mit EDTA-haltigem Phosphatpuffer gewaschen. Die Fragmente wurden mit einem handelsüblichen Fleischwolf weiter zerkleinert und das Rohhomogenisat mit Standardpuffer (20 mM Kaliumphosphat, 250 mM Saccharose, pH 7,4) 1:1 verdünnt. Anschließend wurde das Gemisch zweimal mit einem Durchflusshomogenisator homogenisiert und so zu einer Suspension verarbeitet, die neben zerstörten Zellstrukturen und Zellorganellen das Cytosol und die Mikrosomen enthielt. Die Gewinnung der Mikrosomen durch differentielle Ultrazentrifugation [Clement *et al.*, 1996] erfolgte analog zur Gewinnung humaner Lebermikrosomen (siehe 3.2.1.2).

### **6.2.1.3 Humane Lebermikrosomen**

Die Gewinnung der humanen Lebermikrosomen erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben.

### **6.2.1.4 Porcine Lebermitochondrien**

Die Lebern, die vom örtlichen Schlachthof in Flintbek geholt wurden, wurden direkt nach der Entnahme für den Transport in eisgekühlten Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 überführt. Die Gewinnung der Mitochondrien erfolgte durch fraktionierte Zentrifugation nach einer Modifikation von Deters [Deters *et al.*, 2000] in Anlehnung an die Vorschriften von Beattie [1968] und Kline *et al.* [1986].

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 0 bis 4°C. Nach Erhalt der Zellsuspension wurden alle Schritte in Tris-HCl Puffer (10 mM Tris-HCl, 250 mM Saccharose, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4) durchgeführt. Die Zellsuspension wurde zunächst zweimal bei 750g für 20 min zentrifugiert, um Zellkerne und grobe Zellfragmente abzutrennen. Der Überstand wurde vereinigt, und die Mitochondrien sedimentierten bei 7710g (20 min). Das 7710g-Sediment wurde vorsichtig resuspendiert und nacheinander jeweils nach Resuspension bei 7350g, 6450g, und 5580g für 20 min zentrifugiert. Diese Schritte dienten lediglich einem Waschvorgang. Das 5580g-

Sediment, das die Mitochondrien enthielt, wurde erneut mit wenig Puffer resuspendiert. Die Mitochondrien wurden anschließend charakterisiert und bei -80°C gelagert.

#### **6.2.1.5 Humane Lebermitochondrien**

Humanes Lebergewebe wurde wie unter 3.2.1.2 beschrieben von der Uniklinik Kiel erhalten und vorbereitet. Die Gewinnung der Mitochondrien erfolgte wie die Gewinnung der porcinen Lebermitochondrien (siehe 6.2.1.4).

#### **6.2.1.6 Humane Cytochrom P450-Isoenzyme**

Mikrosomen aus Insekten-Zelllinien, die nach Transfektion mit menschlicher Cytochrom P450 cDNA humane Cytochrom P450-Isoenzyme stabil exprimieren, wurden von der Firma BD Biosciences (Bedford, MA, USA) bezogen. Da in den verwendeten Mikrosomen (CYP1A2, 2C9, 2D6, 3A4) die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase coexprimiert ist, konnte auf einen Zusatz dieses Enzyms verzichtet werden. Für das CYP3A4 wurden Mikrosomen gewählt, die außerdem noch Cytochrom b<sub>5</sub> enthielten, da diese eine deutlich erhöhte Umsatzrate zeigen.

#### **6.2.1.7 Charakterisierung der humanen und porcinen Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen**

##### **6.2.1.7.1 Bestimmung des Proteingehalts**

Die Proteinbestimmung wurde wie für die humanen Lebermikrosomen nach der BCA-Methode in Anlehnung an die Methode von Smith *et al.* [1985] durchgeführt (siehe 3.2.1.3.1).

#### 6.2.1.7.2 Bestimmung des Cytochrom P450 Gehalts

Die Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes erfolgte wie für die humanen Lebermikrosomen in Anlehnung an das Verfahren von Omura *et* Sato [1964], indem das Differenzspektrum des reduzierten Cytochrom P450 und des reduzierten Cytochrom P450 CO-Komplexes vermessen wurde (siehe 3.2.1.3.2).

### **6.2.2 Inkubationsbedingungen**

#### **6.2.2.1 Material und Geräte**

Ammoniak, Ascorbinsäure, Dikaliumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, NADPH, Phosphorsäure (Fa. Merck, Darmstadt), Superoxiddismutase aus bovinen Erythrocyten, Katalase aus boviner Leber (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Acetonitril (Fa. Promochem, Wesel).

Die pH-Wert Bestimmung der Puffer erfolgte mit einem Microprozessor pH-mV-Meter pH 537 der Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland) mit der Elektrode Blue Line 16 pH der Firma Schott (Mainz, Deutschland), die Suspendierung der Inkubationsansätze mit einem IKA-Vibrax-VXR der Firma Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland). Die Inkubation der Biotransformationsansätze wurde im Schüttelwasserbad GFL 1083 der Gesellschaft für Labortechnik (Burgenwedel, Deutschland) durchgeführt. Die Lyophilisierung der Inkubationsansätze erfolgte unter Verwendung des Gefriertrocknungsgeräts Christ Alpha 2-4 der Firma Christ (Osterode am Harz, Deutschland). Die Abtrennung des denaturierten Proteins erfolgte mit einer Mikroliterzentrifuge der Firma Hettich (Tuttlingen, Deutschland).

Die Bestimmung der Metaboliten erfolgte per HPLC oder LC-MS.



### **6.2.2.2 Ansätze für die enzymatische Dehydrierung von BP-7**

Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 300 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt. Das Substrat wurde nach Behandlung mit Ultraschall als feinverteilte Suspension in einer Konzentration von 0,02 bis 0,2 mM eingesetzt. Die Ansätze enthielten außerdem gepoolte porcine Lebermikrosomen in einer Konzentration von 0,07 bis 2,67 mg Protein/ml sowie 0,2 bis 2,0 mM NADPH. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 0 bis 360 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Für die pH-Abhängigkeit wurden Pufferlösungen mit von 4,0 bis 8,0 variierenden pH-Werten eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 µl Acetonitril beendet. Alle Ansätze wurden kurz auf dem Vibrationsmischer geschüttelt und dann bei -18°C für 30 min eingefroren und nach dem Auftauen bei 12000g für 5 min zentrifugiert.

### **6.2.2.3 Ansätze für die Reduktion von 6-*N*-Hydroxy-BP-D7 zu BP-D7**

Die Inkubation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 200 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4, der zur Stabilisierung 1 mM Ascorbinsäure enthielt, durchgeführt. Das Substrat wurde nach Behandlung mit Ultraschall als feinverteilte Suspension in einer Konzentration von 0,25 mM eingesetzt. Die Ansätze enthielten außerdem als Enzymquellen gepoolte porcine Lebermikrosomen, humane Lebermikrosomen, porcine Lebermitochondrien oder humane Lebermitochondrien in einer Konzentration von 1 mg Protein/ml sowie 1,0 mM NADH oder NADPH. Es wurden als Kontrolle ebenfalls Ansätze ohne Enzym- bzw. Cosubstratzusatz verwendet. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 20 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Acetonitril beendet. Alle Ansätze wurden kurz auf dem Vibrationsmischer geschüttelt und dann bei 12000g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für die

HPLC-Analytik eingesetzt.

#### **6.2.2.4 Ansätze zur Strukturaufklärung der Metaboliten durch LC-MS**

Die Inkubation wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen in 1,0 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt. Das Substrat (BP-3, BP-D3, BP-6, BP-D6, BP-7, BP-D7, BP-8, BP-D8, BP-9, BP-D9 oder BP-11) wurde nach Behandlung mit Ultraschall als feinverteilte Suspension in einer Konzentration von 0,1 mM eingesetzt. Die Ansätze enthielten außerdem gepoolte porcine oder humane Lebermikrosomen in einer Konzentration von 1 mg Protein/ml sowie 1,0 mM NADPH. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 120 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Es wurden Vergleichsansätze ohne Enzymquelle oder Cosubstrat inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze 10 min bei 12000g zentrifugiert, um ungelöstes Substrat abzutrennen. Die enzymatische Umsetzung des Benzo[*c*]phenanthridins wurde durch Einfrieren der Überstände bei -18°C gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze durch Gefriertrocknung in die Lyophilisate überführt (Temperatur -13°C, Druck 0.025 mbar über einen Zeitraum von 15 Stunden), aus denen vor der HPLC-Analytik die Metaboliten mit 250 µl Fließmittel extrahiert wurden. Die Ansätze wurden in der Folge bei 12000g für 10 min zentrifugiert, um die festen Bestandteile der Suspension abzutrennen und den Überstand für die LC-MS-Analytik einzusetzen.

#### **6.2.2.5 Ansätze mit rekombinanten humanen CYP450-Isoenzymen**

Die Inkubation wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen in 1,0 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt. Das Substrat (BP-7, BP-D7 oder BP-11) wurde nach Behandlung mit Ultraschall als feinverteilte Suspension in einer Konzentration von 0,1 mM eingesetzt. Die Ansätze enthielten außerdem rekombinantes humanes CYP450-Isoenzym (1A2, 2C9, 2D6 oder 3A4) in einer Konzentration von 25 pmol CYP450/ml

sowie 1,0 mM NADPH. Im Anschluss an eine Vorinkubation von 3 min wurden nach Zusatz des Cosubstrats NADPH die Ansätze über einen Zeitraum von 90 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen inkubiert. Es wurden Vergleichsansätze mit humanen oder porcinen Lebermikrosomen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze 10 min bei 12000g zentrifugiert, um ungelöstes Substrat abzutrennen. Die enzymatische Umsetzung des Benzo[*c*]phenanthridins wurde durch Einfrieren der Überstände bei –18°C gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze durch Gefriertrocknung in die Lyophilisate überführt (Temperatur –13°C, Druck 0.025 mbar über einen Zeitraum von 15 Stunden), aus denen vor der HPLC-Analytik die Metaboliten mit 250 µl Fließmittel extrahiert wurde. Die Ansätze wurden in der Folge bei 12000g für 10 min zentrifugiert und der Überstand für die LC-MS-Analytik eingesetzt.

#### **6.2.2.6 Ansätze unter Zusatz von Superoxiddismutase und Katalase**

Die Inkubationsansätze hatten bis auf die zusätzlichen Enzyme für die Substrate BP-7, BP-D7 und BP-11 die gleiche Zusammensetzung wie für die Ansätze zur Strukturaufklärung der Metaboliten (siehe 6.2.2.4). Dabei wurden für jedes Substrat je zwei Ansätze mit porcinen Lebermikrosomen in der Konzentration 1 mg/ml, zwei Ansätze mit Mikrosomen und 2000 U Superoxiddismutase und zwei Ansätze mit Mikrosomen, 2000 U Superoxiddismutase und 2000 U Katalase inkubiert. Die Inkubation und die Aufarbeitung entsprachen ebenfalls 6.2.2.4. Der Überstand wurde für die LC-MS-Analytik eingesetzt.

#### **6.2.2.7 Ansätze für die präparative LC-MS-Trennung zur Strukturaufklärung von BP-7-Metaboliten**

Die Inkubationsansätze hatten für das Substrat BP-7 die gleiche Zusammensetzung wie für die Ansätze zur Strukturaufklärung der Metaboliten (siehe 6.2.2.4). Um die Effizienz der Analytik zu erhöhen, wurden vier Lyophilisate nacheinander mit dem

gleichen Lösungsmittel extrahiert, indem jeweils der Überstand eines Zentrifugationsschrittes für die Extraktion des nächsten Ansatzes verwendet wurde. Der letzte Überstand, der Substrat und Metaboliten aus vier Ansätzen enthielt, wurde dann für die LC-MS-Analytik eingesetzt.

## **6.2.3 Analytik**

### **6.2.3.1 Material und Geräte**

Ammoniak, Ascorbinsäure, Dikaliumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Phosphorsäure (Fa. Merck, Darmstadt). Essigsäure (Fa. Baker B.V., Deventer, Holland). Acetonitril (Fa. Promochem, Wesel).

Die pH-Wert Bestimmung der Puffer erfolgte mit einem Microprozessor pH-mV-Meter pH 537 der Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland) mit der Elektrode Blue Line 16 pH der Firma Schott (Mainz, Deutschland).

Weitere Angaben zu Chemikalien und Geräten, die für die Analytik verwendet wurden, erfolgen bei der Beschreibung der jeweiligen Methode.

### **6.2.3.2 Auswertung der enzymatischen Dehydrierung von BP-7**

Die Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe: Waters 510 Doppelkolbenpumpe (Waters, Milford, CT, USA)

Detektor: W486 Tunable Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)

Autosampler: WISP 710 Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)

Integrator: W 746 Data Module (Integrator) und NEC PC-Power-Mate 2<sup>®</sup>,  
Maxima<sup>®</sup> Steuer- und Auswertesoftware (Waters, Milford, CT,  
USA)

Stationäre Phase: LiChrocart, LiChrospher 60, RP-select B, 5 µm, 250 x 4 mm  
(Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Vorsäule 4 x 4 mm

Mobile Phase: Phosphatpuffer 100 mM pH 3,5: Acetonitril 60:40 (v/v)

Flussrate: 1 ml/min

Detektion:  $\lambda = 330 \text{ nm}$

Injektionsvolumen: 20 µl

Retentionszeiten:	BP-7	9,1 ± 0,1 min
	BP-D7	18,3 ± 0,2 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit BP-D7 dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 µM) zugesetzt.

Um eine Aussage über die Wiederfindung zu erlauben, wurde das BP-D7 den üblichen Inkubationsansätzen, die jedoch kein NADPH enthielten, in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung hinzugefügt. Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten wie unter 6.2.2.2 beschrieben.

### 6.2.3.3 Reduktion von 6-*N*-Hydroxy-BP-D7 zu BP-D7

Die Analytik erfolgte unter Verwendung eines Waters Breeze™ HPLC System mit folgenden Bedingungen:

HPLC-Pumpe:	Waters 1525 binäre Pumpe (Waters, Milford, CT, USA)
Detektor:	Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector (Waters, Milford, CT, USA)
Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler (Waters, Milford, CT, USA)
Integrator:	Breeze™ Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.20) (Waters, Milford, CT, USA)
Stationäre Phase:	LiChrocart, LiChrospher 60, RP-select B, 5 µm, 125 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Vorsäule 4 x 4 mm
Mobile Phase:	A: 3 g/l Eisessig, 1 mM Ascorbinsäure in aqua bidest, pH 3,5 mit NH <sub>3</sub> 25% B: Acetonitril
Flussrate:	1 ml/min
Gradient:	0 bis 10 min 44%B 10 bis 15 min auf 56%B 15 bis 18 min 56%B 18 bis 20 min auf 44%B 20 bis 23 min 56%B
Detektion:	λ= 330 nm

Injektionsvolumen: 50 µl

Retentionszeiten:	BP-D7	11,3 ± 0,1 min
	BP-D7 6-NHOH	15,4 ± 0,2 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde der synthetisch hergestellte Metabolit BP-D7 dem Fließmittel in definierten Konzentrationen (20, 50, 100, 200, 500 µM) zugesetzt.

Um eine Aussage über die Wiederfindung zu erlauben, wurde das BP-D7 den üblichen Inkubationsansätzen, die jedoch kein NADPH enthielten, in den gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung hinzugefügt. Inkubation und Aufarbeitung der Ansätze erfolgten wie unter 6.2.2.3 beschrieben.

#### **6.2.3.4 LC-MS-analytische Auswertung der Biotransformationsansätze**

Zur Identifizierung und Strukturaufklärung der Metaboliten wurde ein LC-MS-Verfahren verwendet.

HPLC-Pumpe:	1090 Series II LC Hochdruckgradientenpumpe (HP, Heilbronn)
Injektor:	Rheodyne 200 µl-Probenschleife
Detektor:	HP 1050 VWD UV/VIS Detektor (HP, Heilbronn)
Massenspektrometer:	Esquire LC (Bruker, Bremen) ESI, positiver Ionenmodus

Stationäre Phase:	LiChrospher <sup>®</sup> RP select B-Säule (5 µm) 250 x 4 mm (Fa. Merck) mit Vorsäule 4 x 4 mm
Mobile Phase:	CH <sub>3</sub> COOH 50 mM, mit NH <sub>3</sub> konz. auf pH 3,5 eingestellt: Acetonitril 62:38 (v/v)
Flussrate:	1,0 ml/min Splitverhältnis 1:6 (=160 µl/min für MS)
Detektion:	λ= 330 nm
Injektionsvolumen:	200 µl

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Sartorius-Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

#### **6.2.3.5 LC-MS-analytische Suche nach den 6-Oxo- bzw. 6-N-Hydroxy-Derivaten**

Die Methode entsprach bis auf die Zusammensetzung der mobilen Phase und dem Gradienten der Analytik zur Aufklärung des Metabolismus (siehe 6.2.3.4).

Mobile Phase: A: 3 g/l Eisessig in aqua bidest, pH 3,5 mit NH<sub>3</sub> 25%  
B: Acetonitril

Gradient für BP-7: 0 bis 20 min 38%B  
20 bis 22 min auf 50%B  
22 bis 30 min 50%B  
30 bis 31 min auf 38%B  
31 bis 35 min 38%B



Gradient für BP-D7:	0 bis 40 min 38%B
	40 bis 42 min auf 50%B
	42 bis 56 min 50%B
	56 bis 57 min auf 38%B
	57 bis 60 min 38%B
Retentionszeiten:	BP-7                    18,5 ± 0,2 min
	6-Oxo-BP-7            26,5 ± 0,3 min
	6- <i>N</i> -Hydroxy-BP-7   27,8 ± 0,3 min
	BP-D7                    35,8 ± 0,3 min
	6-Oxo-BP-D7           53,5 ± 0,5 min
	6- <i>N</i> -Hydroxy-BP-D7 54,2 ± 0,6 min

### **6.2.3.6 Präparative LC-MS-Trennung für die Strukturaufklärung von BP-7-Metaboliten**

Die Methode entsprach bis auf die Zusammensetzung der mobilen Phase und dem Gradienten der Analytik zur Aufklärung des Metabolismus (siehe 6.2.3.4).

Mobile Phase:     A: 3 g/l Eisessig in aqua bidest, pH 3,5 mit NH<sub>3</sub> 25%  
                          B: Acetonitril

Gradient:            0 bis 20 min 36%B  
                          20 bis 21 min auf 68%B  
                          21 bis 30 min 68%B  
                          30 bis 31 min auf 36%B  
                          31 bis 35 min 36%B

Splitverhältnis:    1:20

Es wurde über den Hauptteil des Splits der Substanzpeak bei 15 min mit dem Quasimolekülion von 429 Th und den Hauptfragmenten bei 312 Th und 248 Th

aufgefangen. Die vereinigten Eluate wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und gefriergetrocknet (Temperatur  $-13^{\circ}\text{C}$ , Druck 0.025 mbar über einen Zeitraum von 15 Stunden). Der Rückstand der Gefriertrocknung wurde zum Entfernen des Puffers in 200  $\mu\text{l}$  aqua bidest aufgenommen, die Suspension 10 min bei 12000g zentrifugiert, 150  $\mu\text{l}$  des Überstands abgenommen und der Rest erneut einer Gefriertrocknung unterzogen. Die Substanz wurde in 500  $\mu\text{l}$  DMSO- $\text{d}_6$  gelöst und ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum aufgenommen (Geräte und Bedingungen entsprechen 5.2.1).

## **6.3 Ergebnisse und Diskussion**

### **6.3.1 Charakteristika der Enzymquellen**

#### **6.3.1.1 Proteingehalt**

Die Proteinkonzentrationen der gepoolten porcinen Mikrosomen, die mit Hilfe der BCA Methode ermittelt wurden, betragen 64,2 mg/ml für SLM 09/01 und 37,5 mg/ml für SLM 04/02. Der Proteingehalt betrug 27,2 mg/ml für HLM, 35,8 mg/ml für SLMt und 20,2 mg/ml für HLMt.

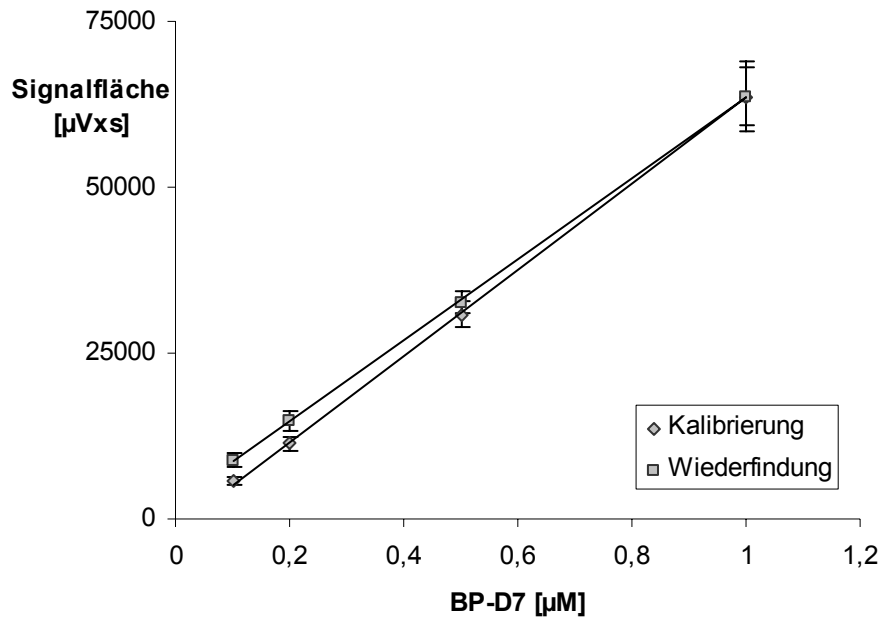
#### **6.3.1.2 Spezifischer Cytochrom P450 Gehalt**

Die Cytochrom P450 Konzentrationen der gepoolten Mikrosomen betragen 0,46 nmol/mg Protein für SLM 09/01 und 0,12 nmol/mg Protein für SLM 04/02.

### **6.3.2 Enzymatische Dehydrierung von BP-7**

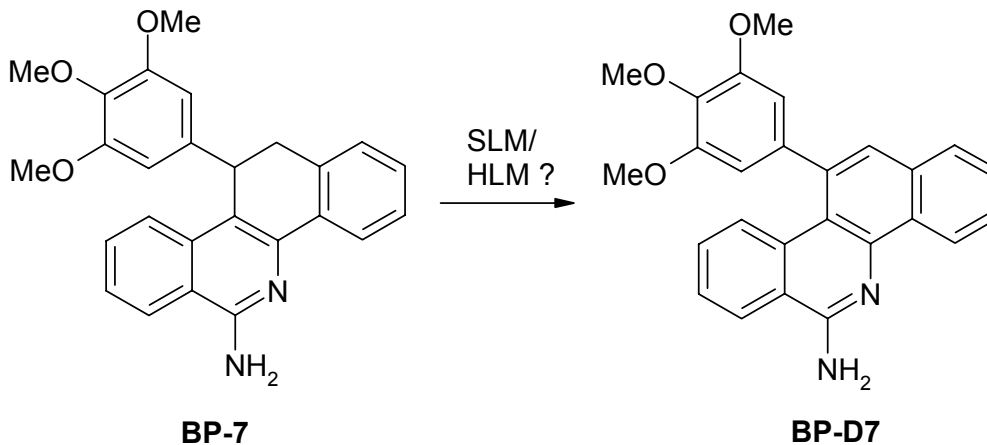
Kalibrierung und Wiederfindung erfolgten unter Verwendung der unter 6.2.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik durch eine quantitative Bestimmung der Flächen der durch BP-D7 resultierenden Signale (Abb. 6.1). Die Funktionen der Kalibrierung

( $R^2=0.9996$ ,  $N=16$ ) und der Wiederfindung ( $R^2=0.9992$ ,  $N=16$ ) waren in dem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 10,0  $\mu\text{M}$  linear, wobei die Wiederfindungsrate einen Wert von  $97 \pm 10 \%$  aufwies.



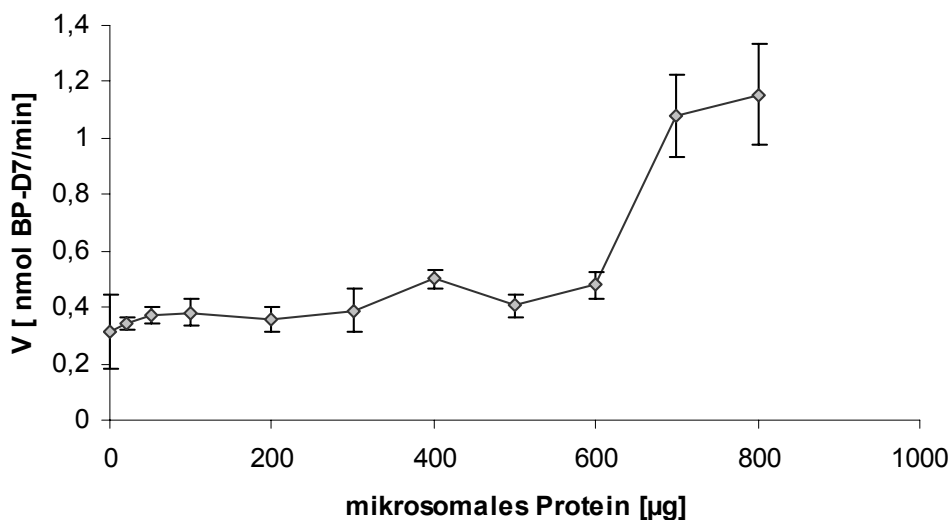
**Abb. 6.1: Kalibrierung und Wiederfindung des BP-D7. Die Signalflächen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.**

Es sollte untersucht werden, ob BP-7 in nennenswertem Ausmaß enzymatisch in das maximal ungesättigte BP-D7 umgewandelt wird (Abb. 6.2) und damit als Prodrug fungieren kann.

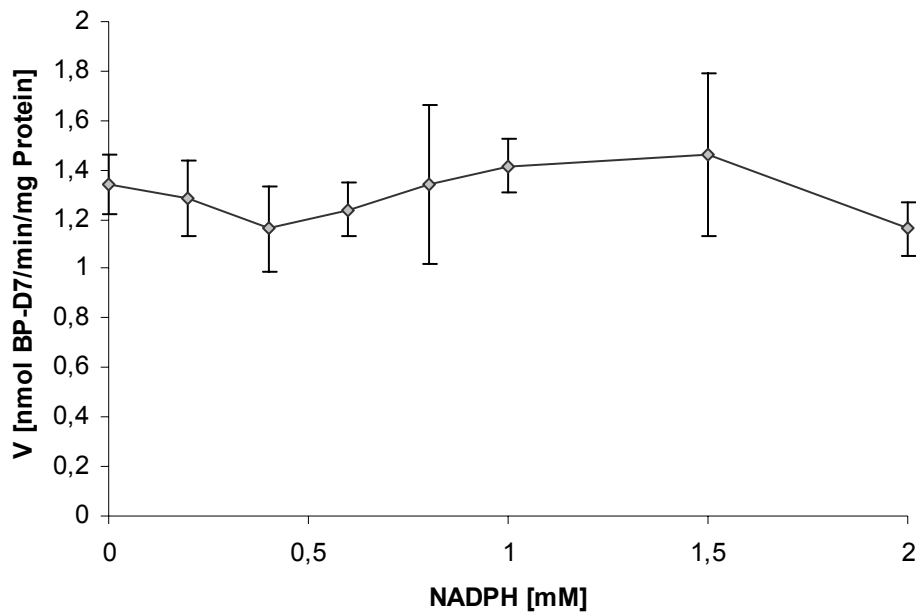


**Abb. 6.2:** Postulierte enzymatische Umwandlung von BP-7 zu BP-D7.

Dazu wurden Inkubationen unter Variation der Parameter Substratkonzentration, Cosubstratkonzentration, Proteinmenge, Inkubationsdauer und pH-Wert des Inkubationsmediums durchgeführt. Mit Hilfe der Wiederfindung wurden die Umsatzraten aus den Inkubationen der variierten Parameter bestimmt. Die Ergebnisse der Proteinabhängigkeit (Abb. 6.3) und der Cosubstratabhängigkeit (Abb. 6.4) werden im folgenden aufgeführt.



**Abb. 6.3:** Proteinabhängigkeit der Bildung des BP-D7. Die Umsatzraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.



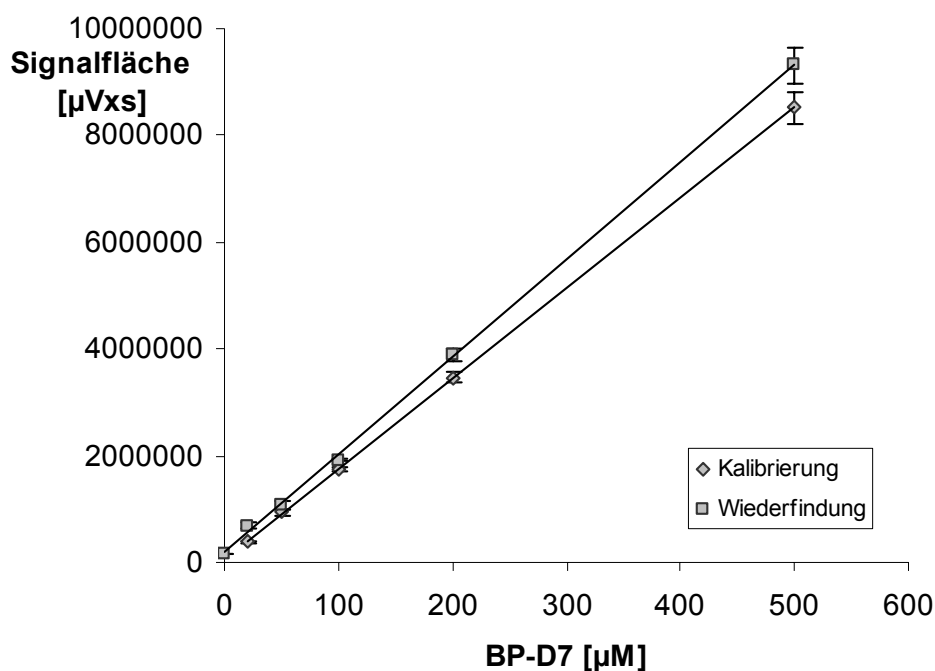
**Abb. 6.4:** Cosubstratabhängigkeit der Bildung des BP-D7. Die Umsetzungsraten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Bildung von BP-D7 aus BP-7 weder von der eingesetzten Enzymmenge noch von der Cosubstratkonzentration abhängig ist. Es kann sich daher nicht um eine enzymatische Umwandlung handeln. Die Ergebnisse wurden durch Inkubationen mit humanen Lebermikrosomen für BP-7 bestätigt. Auch im Rahmen der Inkubationen zur Strukturaufklärung der Metaboliten konnte für keines der untersuchten 11,12-Dihydro-Derivate eine nennenswerte Bildung der entsprechenden dehydrierten Verbindung festgestellt werden. Damit liegt nahe, dass die Wirksamkeit der Derivate BP-7 und BP-8 im „in vivo-hollow fiber assay“ [Kock *et al.*, 2005] auf eine eigenständige Wirkung der Substanzen und nicht auf eine Umwandlung zu den maximal ungesättigten Verbindungen zurückzuführen ist.

### 6.3.3 Reduktion von 6-*N*-Hydroxy-BP-D7 zu BP-D7

Kalibrierung und Wiederfindung erfolgten unter Verwendung der unter 6.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik durch eine quantitative Bestimmung der Flächen der

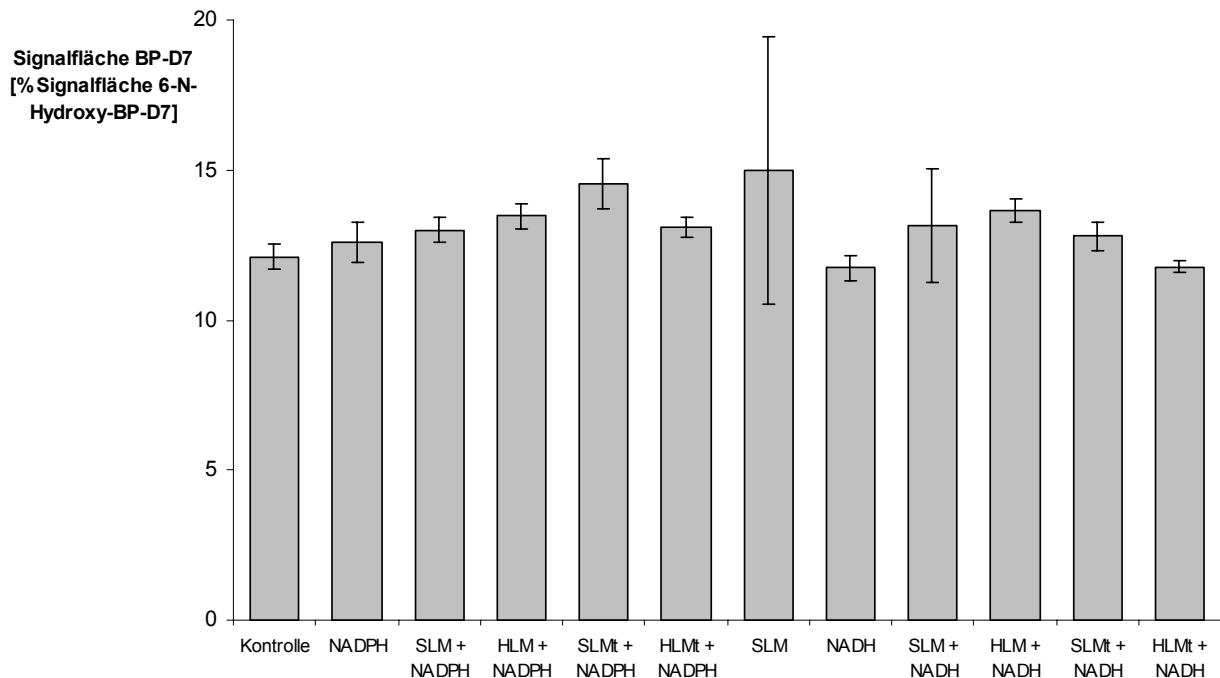
durch BP-D7 resultierenden Signale (Abb. 6.5). Die Funktionen der Kalibrierung ( $R^2=1$ ,  $N=20$ ) und der Wiederfindung ( $R^2=0.9995$ ,  $N=24$ ) waren in dem Konzentrationsbereich von 20 bis 500  $\mu\text{M}$  linear, wobei die Wiederfindungsrate einen Wert von  $125 \pm 31 \%$  aufwies.



**Abb. 6.5: Kalibrierung und Wiederfindung des BP-D7. Die Signalflächen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden.**

Es sollte untersucht werden, ob 6-*N*-Hydroxy-BP-D7 in nennenswertem Ausmaß enzymatisch zu BP-D7 reduziert wird (Abb. 6.6). Allerdings zersetzte sich das Substrat bereits während der Lagerung zu BP-D7, woraus die hohe Wiederfindungsrate resultiert. Um diese chemische Umwandlung während der Untersuchungen zu minimieren, wurde dem Inkubationspuffer sowie dem Fließmittel 1 mM Ascorbinsäure zugesetzt, ein Verfahren, das sich bereits bei der Untersuchung aromatischer Hydroxylamine bewährt hat [Amschler, 2004]. Da das 6-*N*-Hydroxy-BP-D7 bereits BP-D7 enthielt und aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit als Suspension eingesetzt werden musste, wodurch Schwankungen in der Konzentration

auftreten, werden die Ergebnisse für BP-D7 für die einzelnen Enzymquellen in % der Signalfläche von 6-*N*-Hydroxy-BP-D7 angegeben.

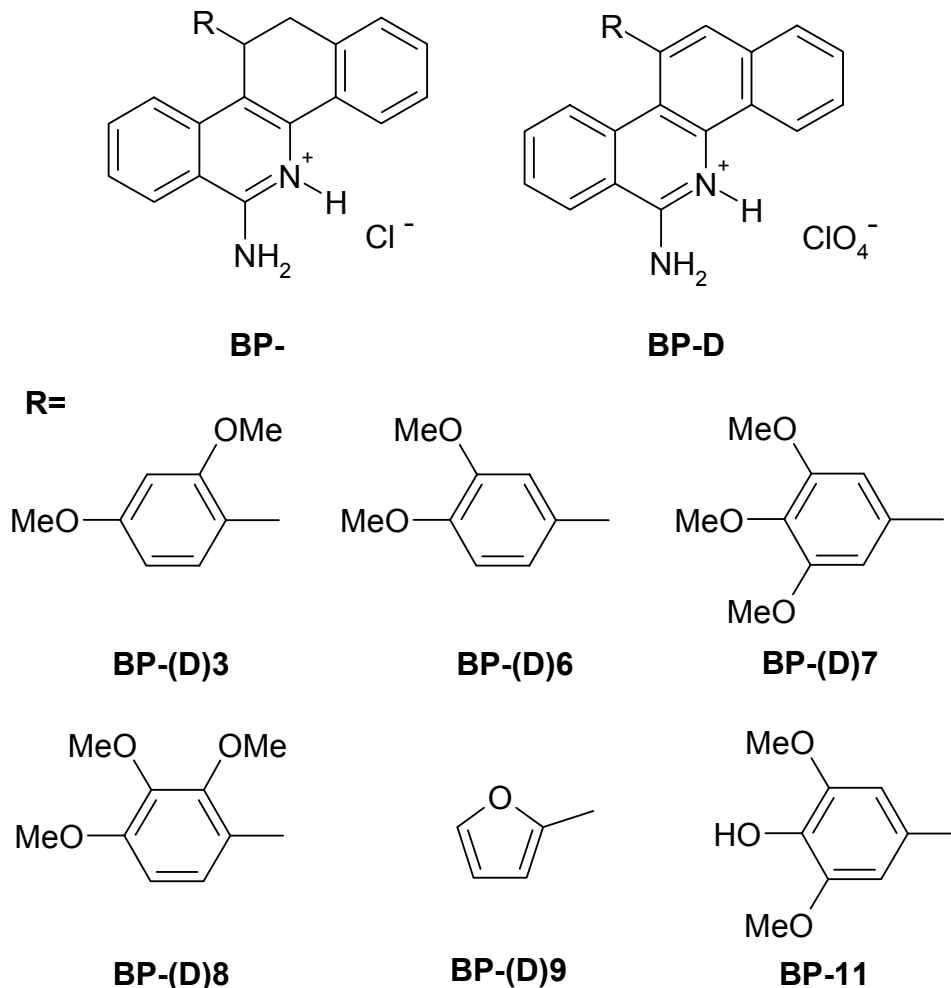


**Abb. 6.6: BP-D7-Konzentrationen.** Die Signalflächenprozente sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Ansätzen, die jeweils zweifach vermessen wurden. Die Kontrollansätze enthielten weder Cosubstrat noch Enzymquelle. (SLM porcine Lebermikrosomen, HLM humane Lebermikrosomen, SLMt porcine Lebermitochondrien, HLMt, humane Lebermitochondrien).

Zwar erreichten die Ansätze mit porcinen Lebermikrosomen die höchste Menge an BP-D7, dieser Wert war aber mit und ohne Cosubstrat nahezu gleich groß. Typisch für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen ist die Bevorzugung von NADH gegenüber NADPH als Cosubstrat [Amschler, 2004], eine solche Tendenz konnte nicht beobachtet werden. Überhaupt sind kaum Unterschiede zwischen den Ansätzen zu beobachten. Die HPLC-analytische Untersuchung einer Lösung des verwendeten 6-*N*-Hydroxy-BP-D7 ergab einen Gehalt des 6-Amino-Derivats von 10,8%. Die Zersetzung der Verbindung zum BP-D7 wurde durch die Inkubationstemperatur beschleunigt, ohne dass eine enzymatische Reduktion beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund werden auch keine Umsetzungsraten angegeben.

### 6.3.4 Strukturaufklärung der Metaboliten durch LC-MS-Analytik

Für die Untersuchung der *in vitro*-Biotransformation der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine wurden diejenigen Substanzen ausgewählt, die in bisherigen Untersuchungen die beste Wirksamkeit gezeigt hatten [Clement *et al.*, 2005; Kock *et al.*, 2005]. Für BP-(D)3, 6, 7, 8, 9 und BP-11 (Abb. 6.7) wurden Untersuchungen durchgeführt, die die Beurteilung der Metabolitenbildung durch porcine Lebermikrosomen im Vergleich zur chemischen Zersetzung unter Inkubationsbedingungen zum Ziel hatten. Für BP-7, BP-D7, BP-8 und BP-11 wurden außerdem Vergleichsinkubationen mit humanen Lebermikrosomen durchgeführt.



**Abb. 6.7: Strukturformeln der untersuchten Substanzen.**



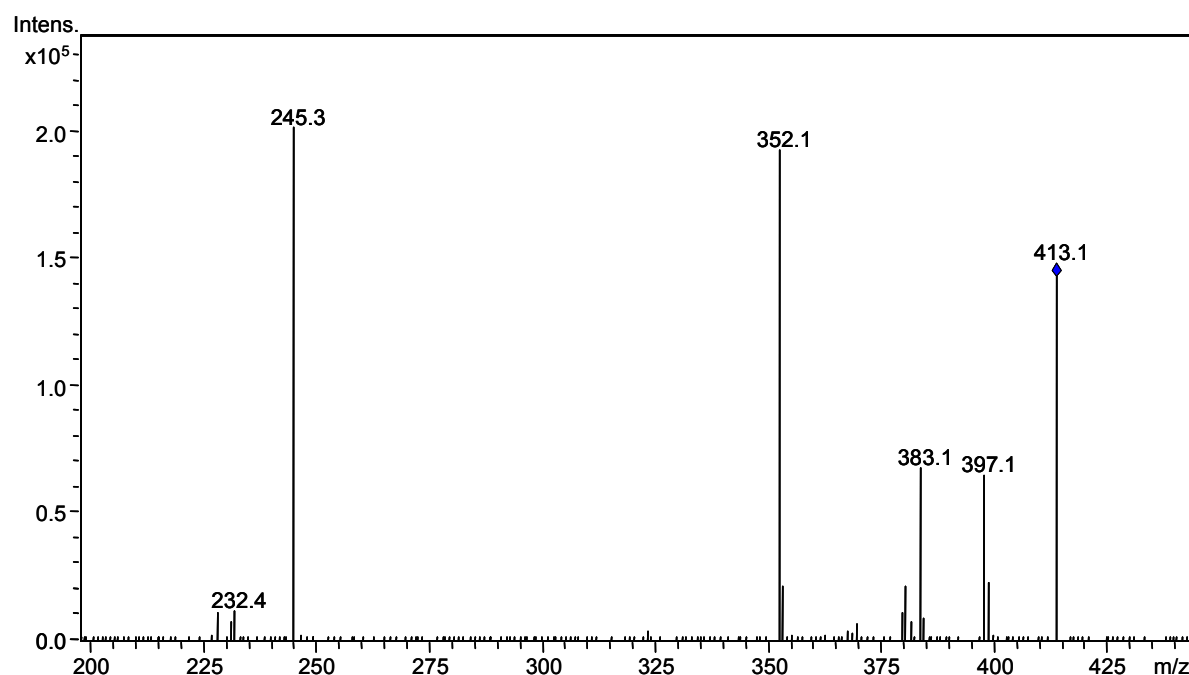
Die schlechte Wasserlöslichkeit der untersuchten Substanzen machte eine abgewandelte Aufarbeitung der Inkubationsansätze erforderlich. Die Substrate wurden als feinverteilte Suspension eingesetzt, nachdem Vorversuche ergeben hatten, dass bei Verwendung einer wässrigen Lösung aufgrund der geringen Substratkonzentration keine detektierbaren Mengen an Metaboliten gebildet wurden. Ebenfalls wenig Erfolg hatten Versuche, bei denen nach der Inkubation der Substratsuspension die Umsetzung durch den Zusatz von Acetonitril abgestoppt bzw. direkt gefriergetrocknet und mit Fließmittel extrahiert wurde. Bei diesem Vorgehen löste sich das während der Inkubation ungelöste Substrat, weshalb das Verhältnis Substrat zu Metaboliten zu Ungunsten der letzteren verschoben wurde. Da eine Vergrößerung der Ansätze nicht unbegrenzt möglich war, weil die Substratkonzentration das Trennsystem überlastete, waren die Metaboliten, die nur in geringen Mengen gebildet wurden, so nicht nachzuweisen. Durch den Zentrifugationsschritt nach der Inkubation sedimentierten partiell auch einige Metaboliten, allerdings in geringerem Ausmaß als das Substrat, so dass die Nachweisgrenze der Analytik verbessert werden konnte.

Die Metabolitenbildung war in Anbetracht der langen Inkubationsdauer relativ gering, was auf die geringe Substratkonzentration durch die mangelnde Wasserlöslichkeit zurückzuführen ist. Es wurde allerdings mehrfach in der Literatur berichtet, dass im Rahmen von Metabolismusstudien für Phenanthridine und Benzo[*c*]phenanthridinderivate nur durch Verwendung von Enzymquellen von mit Induktoren vorbehandelten Ratten die Bildung von Metaboliten erreicht werden konnte [Deroussent *et al.*, 2004] bzw. die Metabolitenausbeute durch solche Enzymquellen deutlich gesteigert wurde [Benson *et al.*, 1983; LaVoie *et al.*, 1985; Tunc *et al.*, 1997].

#### **6.3.4.1 MS-Fragmentierung der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine**

Die verwendete relativ schonende Ionisationsmethode der Elektro-Spray-Ionisation (ESI), bei der Protonen aus dem Fließmittel auf die Moleküle des Analyten übertragen werden, bewirkte kaum Fragmentierungen des Aminobenzo[*c*]-

phenanthridin-Grundkörpers. Die ESI-Massen-Spektren zeigten meist lediglich die Quasimolekülonen  $[M+H]^+$ . Erst durch  $MS^2$ -Experimente konnte eine Fragmentierung der jeweiligen Ionen beobachtet werden. Dabei werden in der Ionenfalle des Massenspektrometers Ionen mit einem bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnis selektiert und durch Kollision mit Helium-Atomen zur Fragmentierung gebracht. Das  $MS/MS$ - bzw.  $MS^2$ -Spektrum zeigt dann die Fragmente des aufgefangenen Vorläuferions. Durch Selektion der entstehenden Tochterionen sind weitere  $MS^n$ -Experimente möglich. Für die methoxysubstituierten Derivate standen Fragmentierungen im Bereich des Phenylsubstituenten im Vordergrund. Ein typisches Beispiel für ein  $MS^2$ -Spektrum eines Derivats mit einem solchen Fragmentierungsmuster ist BP-7 mit einem Quasimolekülon  $[M+H]^+$  von 413 Th als Vorläuferion (Abb. 6.8). In den folgenden Abbildungen von  $MS^2$ -Spektrern ist das Vorläuferion jeweils durch eine Raute gekennzeichnet.



**Abb. 6.8:** Repräsentatives ESI-Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläuferions 413 Th) von BP-7.

Alle beobachteten Hauptfragmente können mit folgendem Zerfallsschema erklärt werden (Abb. 6.9).

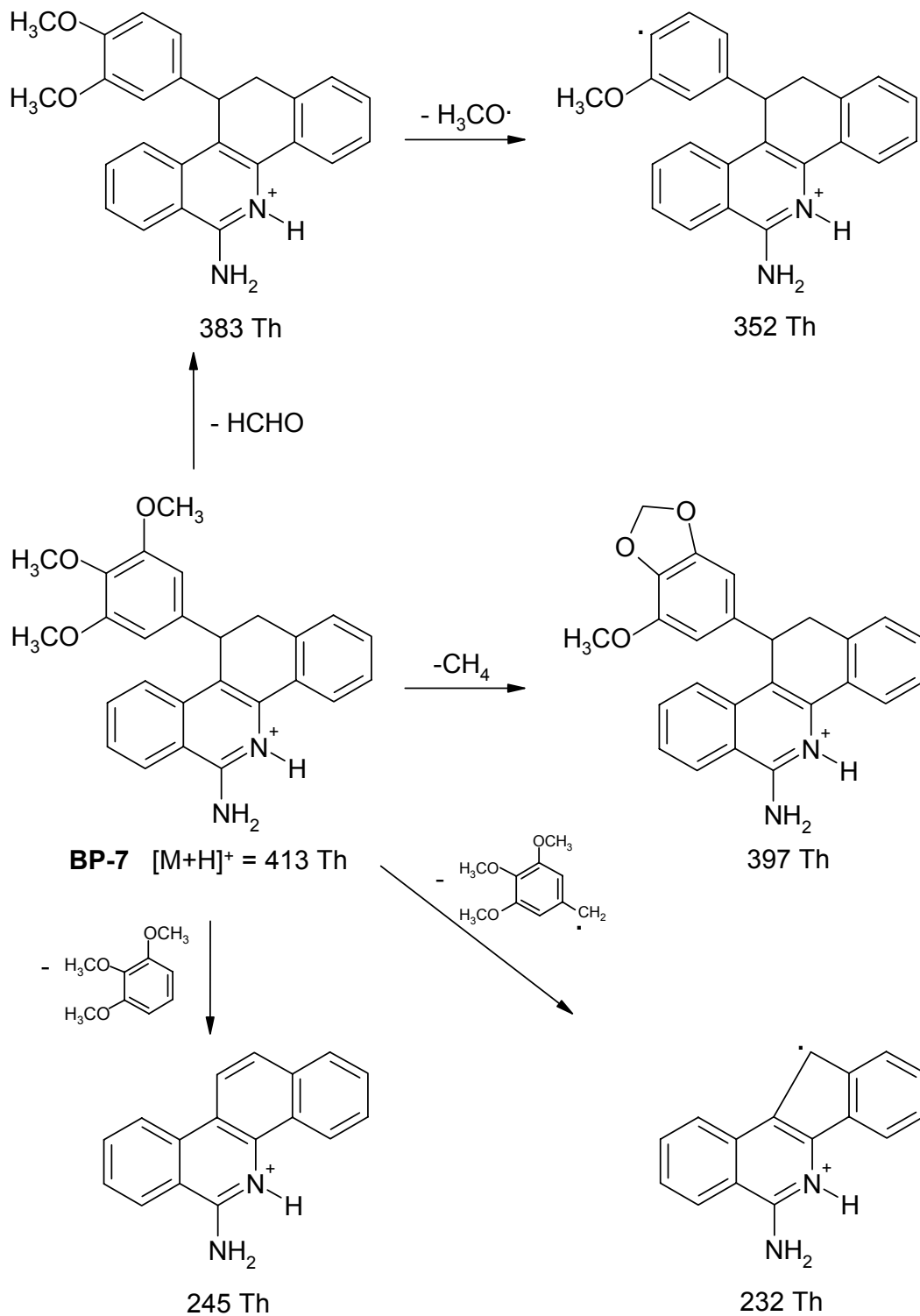
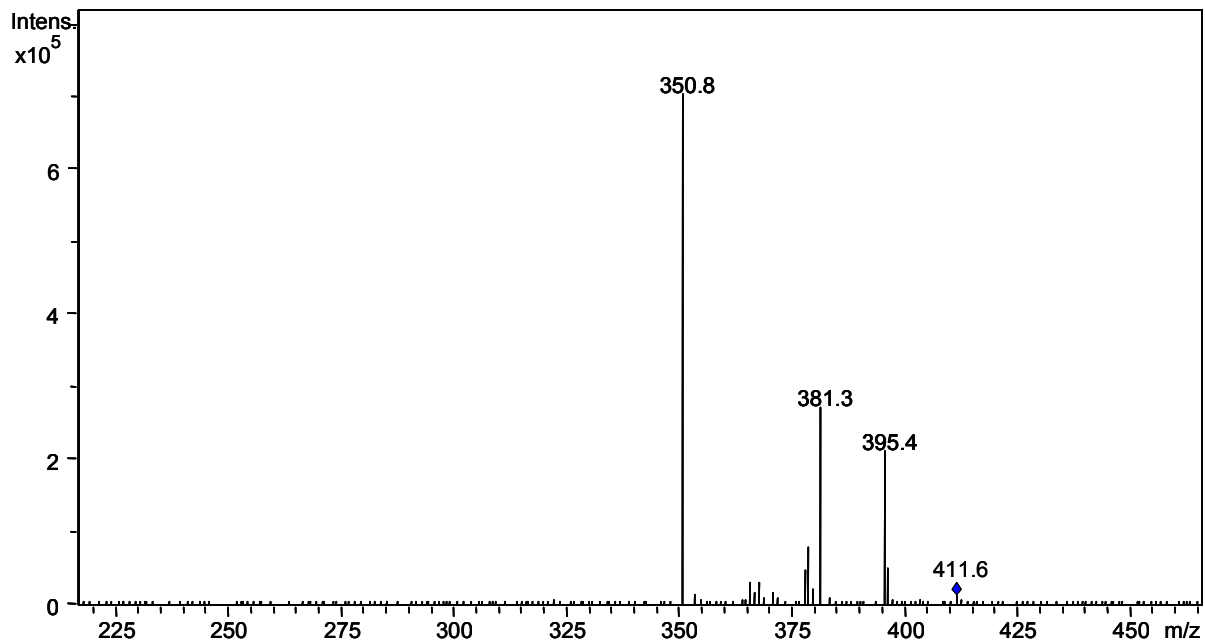


Abb. 6.9: Fragmentierungsschema von BP-7.

Die Abspaltung von Methan aus benachbarten Methoxygruppen unter ESI-MS-Bedingungen wird in der Literatur erwähnt, wenngleich das Strukturelement dort z.B. Teil des mehrgliedrigen Heteroaromaten des Ethoxidins ist [Deroussent *et al.*, 2004].

Weitere Beweise für die These, dass das Fragment mit 16 Th Methan und nicht ein NH<sub>2</sub>-Radikal ist, finden sich in den Spektren der entsprechenden 6-Oxobenzo[*c*]phenanthridine, bei denen ebenfalls die Abspaltung eines solchen Fragmentes beobachtet werden kann.

Dagegen konnte in den Spektren der maximal ungesättigten Verbindungen, wie BP-D7 (Abb. 6.10) keine Abspaltung des Phenylrestes beobachtet werden, was die Theorie der retro-[2+2]-Addition stützt, da in diesem Fall ein energetisch ungünstiges Arin entstehen würde. Die Fragmentierung des Methoxyphenylsubstituenten erfolgt analog zu Abbildung 6.9.



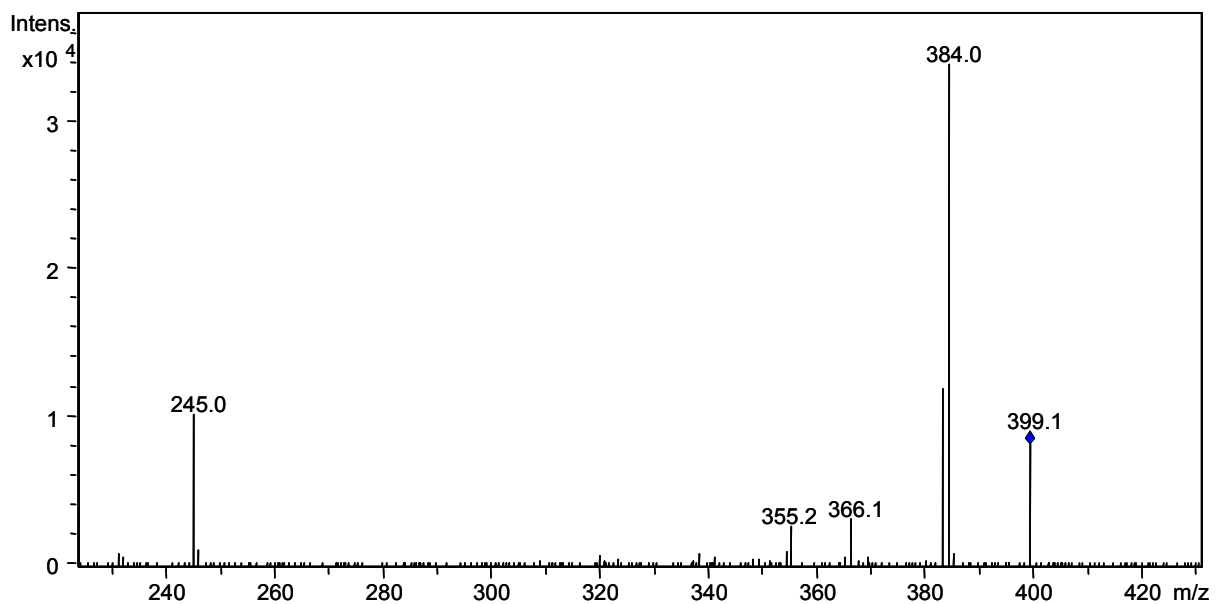
**Abb. 6.10:** Repräsentatives ESI-Massenspektrum (MS<sup>2</sup> des Vorläuferions 411 Th) von BP-D7.

### 6.3.4.2 Demethylierte Metaboliten

Bei allen untersuchten Substanzen mit Methoxygruppen am Phenylsubstituenten traten nach Inkubation mit humanen oder porcinen Lebermikrosomen demethylierte

Verbindungen auf. Diese sind erkenntlich an einer Massendifferenz des Quasimoleküliions  $[M+H]^+$  von 14 Th zum Substrat bei ansonsten weitgehend unverändertem Massenspektrum (Abb. 6.11). Die Demethylierung lief bevorzugt bei den in 2-, 4-Position substituierten Verbindungen BP-3 und BP-D3 ab, möglicherweise aufgrund einer besseren Angreifbarkeit der Methoxygruppen durch das Cytochrom P450.

Für BP-7 lag mit BP-11 eine Referenzsubstanz für ein mögliches Demethylierungsprodukt vor, es konnte aber bei der entsprechenden Retentionszeit im Ionenchromatogramm mit der passenden Masse kein Metabolit detektiert werden. Somit blieb nur ein möglicher demethylierter Metabolit, da bei BP-7 aufgrund der symmetrischen Anordnung der Methoxygruppen nicht zwischen einer Demethylierung in 3' und 5'-Position unterschieden werden konnte.

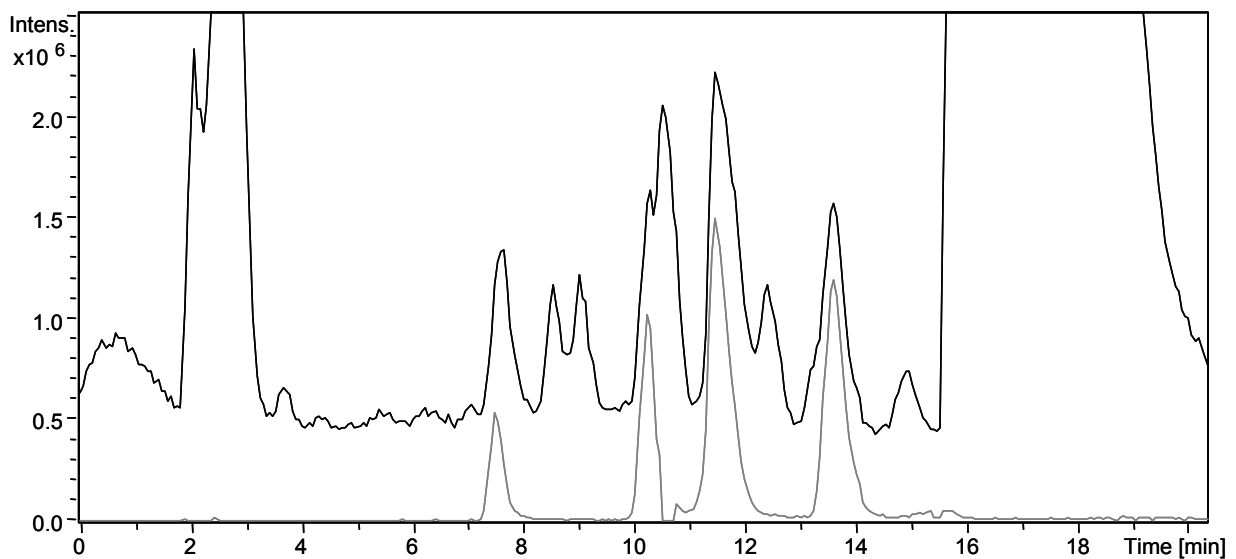


**Abb. 6.11:** Repräsentatives Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläuferions 399 Th) des demethylierten Metaboliten von BP-7.

Im Vergleich der Inkubationsbedingungen fällt auf, dass die Demethylierung bei nahezu allen Substraten bevorzugt unter Verwendung humaner Enzymquellen zu beobachten war und durch chemische Zersetzung nicht auftrat.

### 6.3.4.3 Metaboliten durch aromatische Hydroxylierung im Ringgerüst

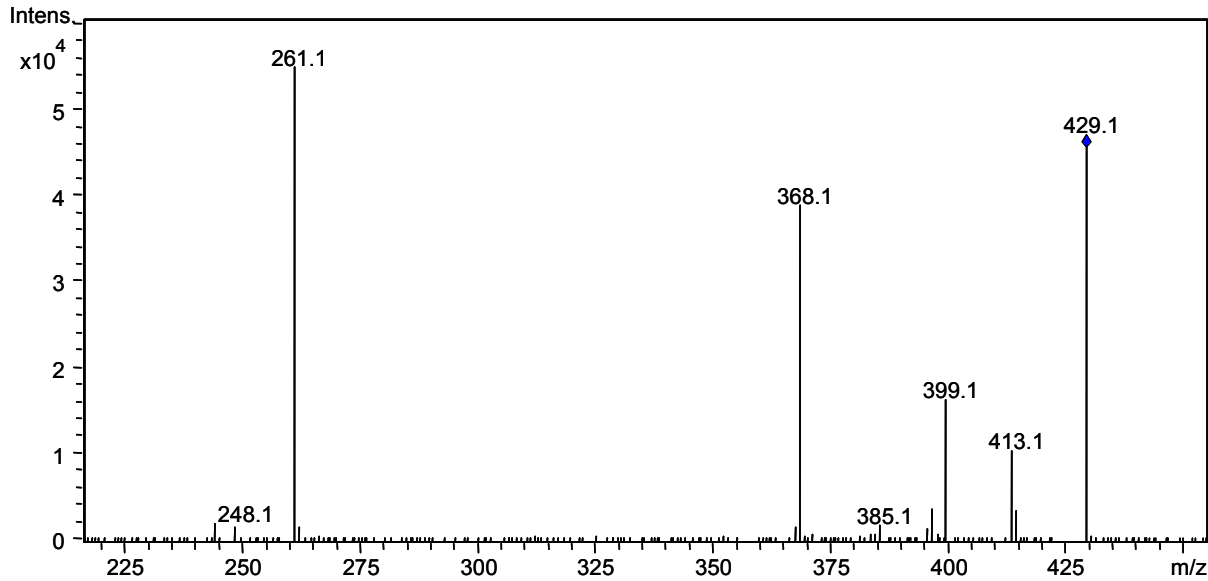
Bei allen untersuchten Verbindungen konnten mehrere Peaks in den Ionenchromatogrammen beobachtet werden, bei denen die Masse des Quasimoleküls  $[M+H]^+$  im Vergleich zum Substrat um 16 erhöht war. Für BP-7 mit dem Quasimolekül  $[M+H]^+$  von 413 Th ergaben sich damit Metaboliten mit einem Quasimolekül von 429 Th (Abb. 6.12).



**Abb. 6.12: Repräsentative Ionenchromatogramme eines Inkubationsansatzes von BP-7 mit porcinen Lebermikrosomen. Das Totalionenchromatogramm ist schwarz, das Ionenchromatogramm des Ions 429 grau dargestellt.**

Bei einigen dieser Verbindungen waren alle Fragmente des Massenspektrums des Substrats um 16 Th erhöht, unter diesen auch das Fragment für das unsubstituierte Benzo[*c*]phenanthridingerüst (Abb. 6.13).

Diese Verbindungen wurden durchweg früher eluiert als das Substrat, sie waren also polarer. Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich um Metaboliten handelte, bei denen im Ringgerüst ein Sauerstoffatom eingefügt wurde, vermutlich in Form einer phenolischen Hydroxygruppe.



**Abb. 6.13: Repräsentatives Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläuferions 429 Th) eines im Grundgerüst hydroxylierten Metaboliten von BP-7.**

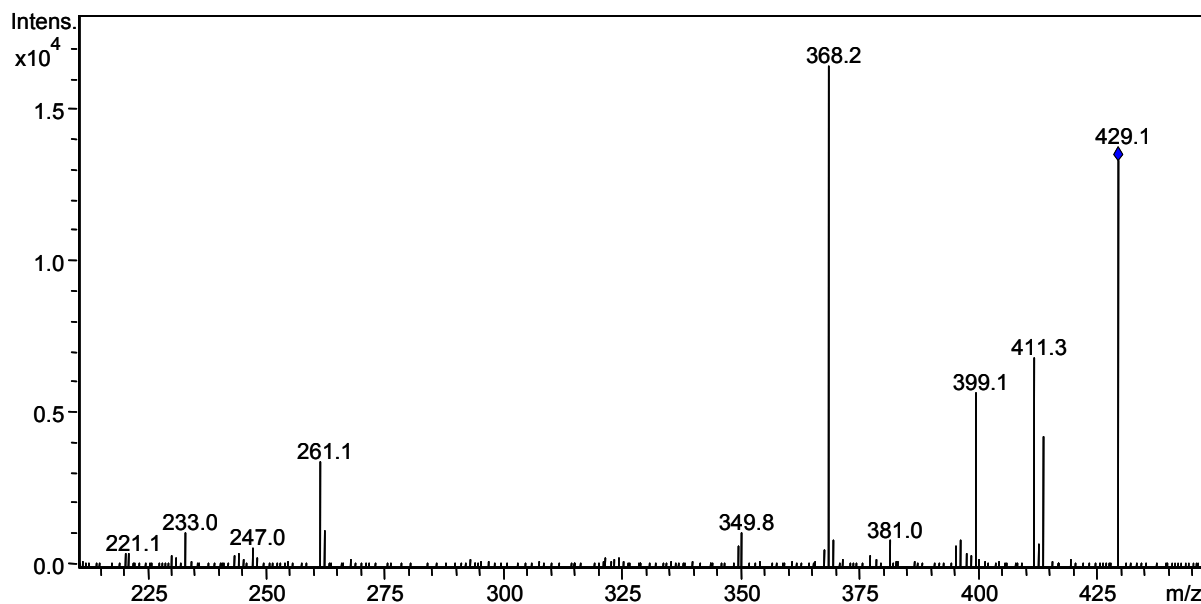
Der Anteil dieser Verbindungen am Gesamtmetabolismus der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine war für porcine und humane Lebermikrosomen etwa gleich groß. Für die maximal ungesättigten Strukturen BP-D handelte es sich um die Hauptmetaboliten, bei den Dihydro-Verbindungen überwog die Einführung von Sauerstoffatomen an den aliphatischen Kohlenstoffatomen.

#### 6.3.4.4 Metaboliten durch aliphatische Hydroxylierung

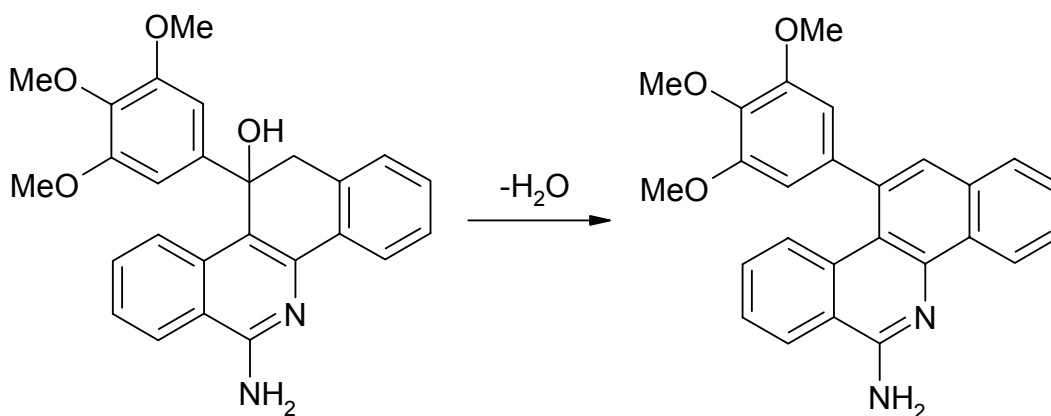
Die Hauptmetaboliten der 11,12-Dihydro-Derivate wurden durch aliphatische Hydroxylierung gebildet. Dabei spielte die Einführung eines Sauerstoffatoms in 11-Position eine geringere Rolle als die Hydroxylierung in 12-Position. Die beiden Strukturen unterschieden sich deutlich in ihren Fragmentierungsmustern.

Die in 11-Position hydroxylierten Metaboliten, die von den monoxygenierten Strukturen jeweils die kleinste Retentionszeit hatten, zeigten zwei verschiedene Serien von Fragmenten (Abb. 6.14). Dies waren zum einen alle Fragmente des Massenspektrums des Substrats (Abb. 6.8), die um 16 Th erhöht waren, unter diesen

auch das Fragment für das unsubstituierte Benzo[*c*]phenanthridingerüst. Zum anderen können die Fragmente der entsprechenden maximal ungesättigten Verbindung einer Serie zugeordnet werden (Abb. 6.10), nachdem die aromatische Struktur durch Abspaltung von Wasser aus dem Metaboliten entstehen konnte (Abb. 6.15).



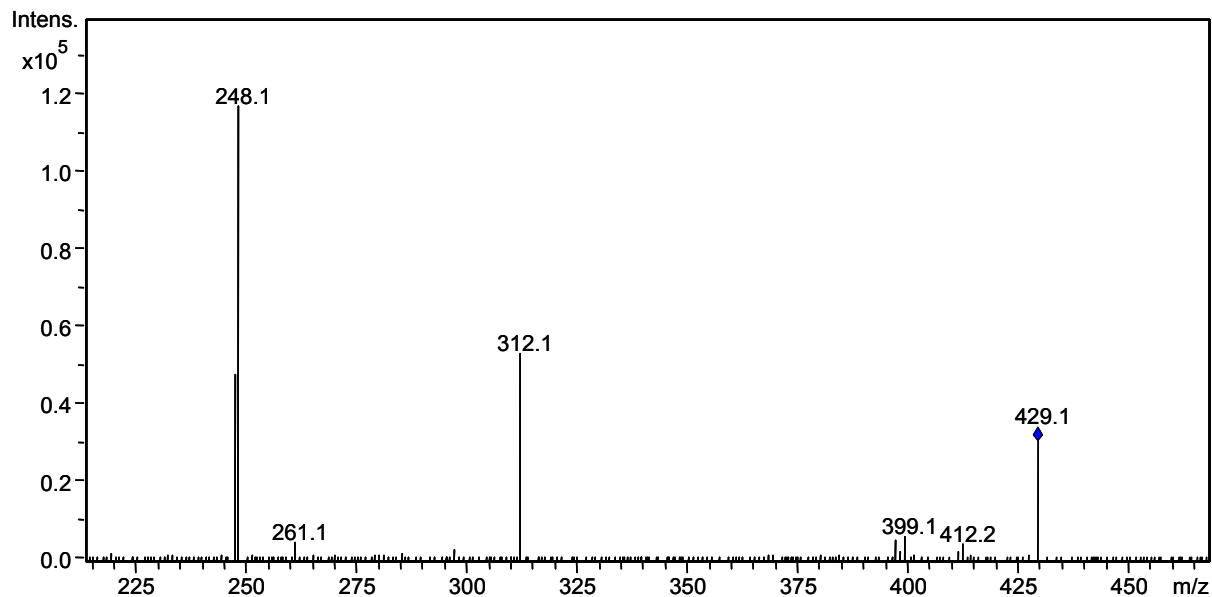
**Abb. 6.14:** Repräsentatives Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläuferions 429 Th) des in 11-Position hydroxylierten Metaboliten von BP-7.



**Abb. 6.15:** Umwandlung des Metaboliten 11-Hydroxy-BP-7 zu BP-D7 unter Dehydratisierung.

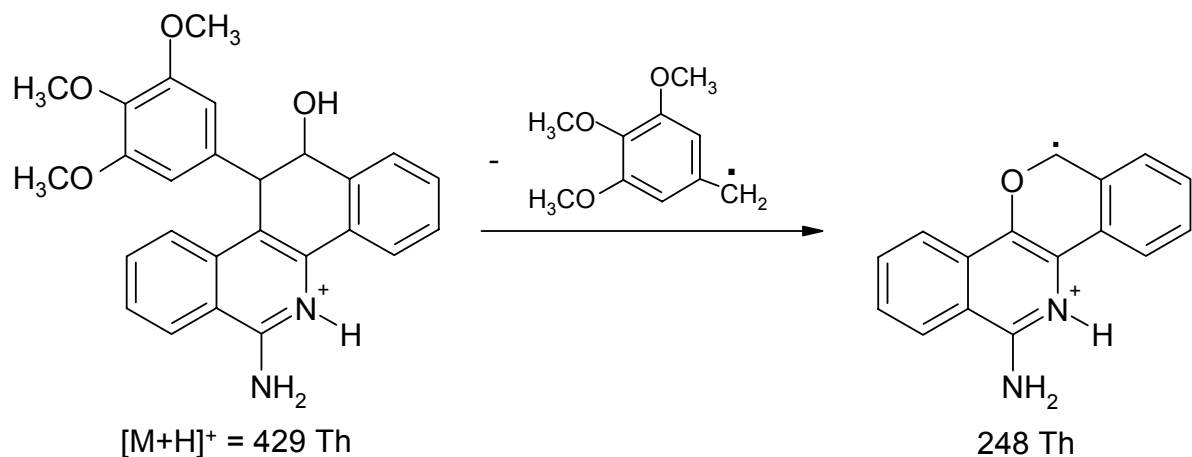


Der Hauptmetabolit der 11,12-Dihydrobenzo[*c*]phenanthridine wurde allerdings durch Oxidation des Kohlenstoffatoms in 12-Position gebildet. Dieser Metabolit verhielt sich zwar im chromatographischen System ähnlich wie die Strukturen, die phenolische Hydroxygruppen am Ringgerüst tragen, das typische Fragmentierungsmuster war allerdings deutlich verändert (Abb. 6.16).



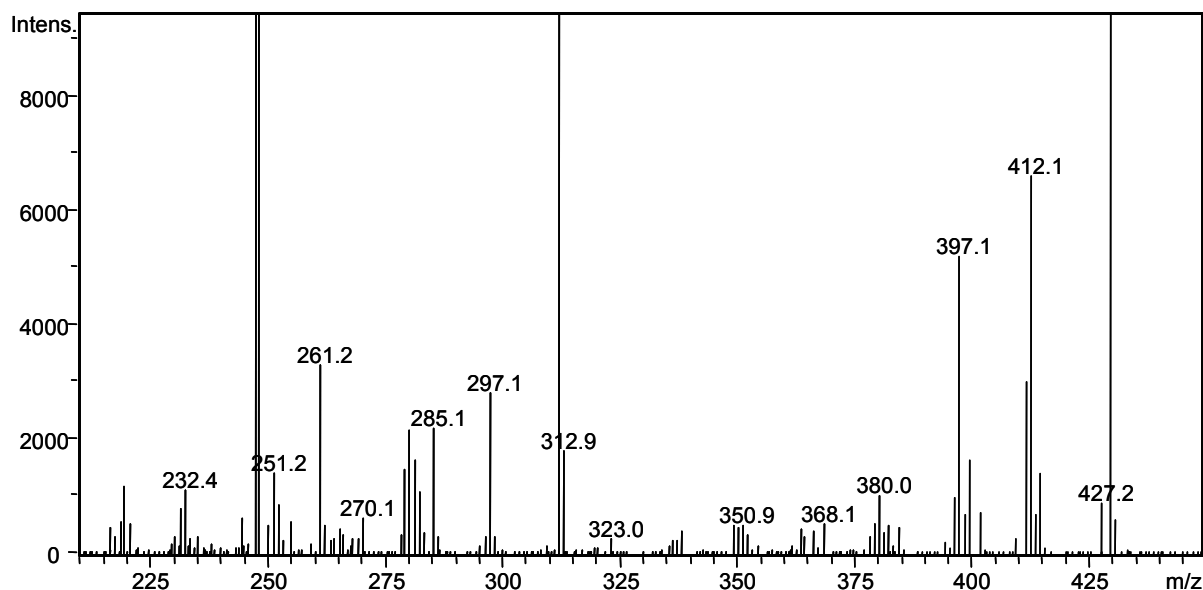
**Abb. 6.16: Repräsentatives Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläufers 429 Th) des in 12-Position hydroxylierten Metaboliten von BP-7.**

Im Substrat war eine Fragmentierung im wesentlichen bis hin zum Benzo[*c*]phenanthridingerüst zu beobachten, das Fragment mit 232 Th, bei dem der Kohlenstoff in 11-Position mit dem Phenylrest abgespalten wird, trat nur in sehr untergeordnetem Maße auf. Durch eine Hydroxylierung in 12-Position wird die Bindung zwischen C-11 und C-12 geschwächt, so dass der Austritt des Benzylrestes im Vergleich zum Phenylrest bevorzugt wird. Dadurch wurde die dann verbleibende Struktur mit 248 Th zum Hauptfragment, wie folgendes Schema zeigt (Abb. 6.17).



**Abb. 6.17: Fragmentierungsschema des in 12-Position hydroxylierten Metaboliten von BP-7.**

Durch diesen andersartigen Zerfall stiegen die Ionenausbeute und die Intensität der MS<sup>2</sup>-Fragmente deutlich an. Im UV/VIS-Chromatogramm war allerdings zu sehen, dass die Konzentration dieser Metaboliten geringer war, als die Ionenausbeute nahe legte. Bei einer Vergrößerung des Massenspektrums aus Abb. 6.16 ist zu sehen, dass neben den ungewöhnlichen Fragmenten 248 Th und 312 Th in geringeren Mengen andere Fragmente gebildet werden. Diese sind im wesentlichen die Fragmente, die bei einer aliphatischen Hydroxylierung zu erwarten wären, nämlich die um 16 Th erhöhten Fragmente des Substrats und die Fragmente der entsprechenden maximal ungesättigten Verbindung, die durch Wasserabspaltung entsteht (Abb. 6.18).



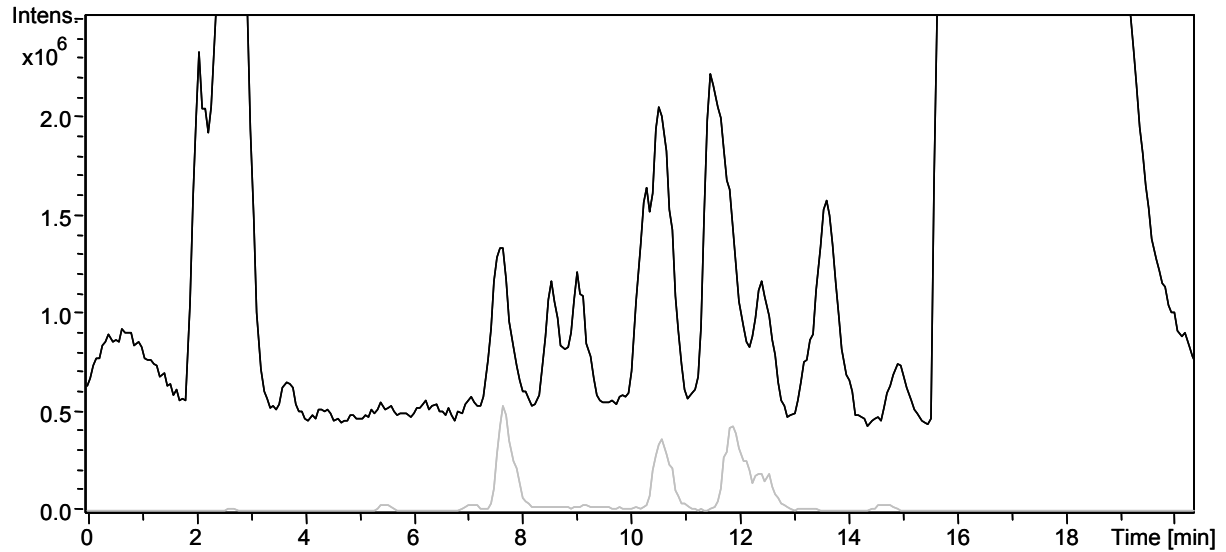
**Abb. 6.18:** Vergrößertes repräsentatives Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläuferions 429 Th) des in 12-Position hydroxylierten Metaboliten von BP-7.

Die Bildung des in 12-Position hydroxylierten Metaboliten erfolgte in besonders großem Ausmaß bei BP-6, BP-7 und BP-9, bei Verbindungen also, die keine sterische Hinderung durch Methoxysubstitution in 2'-Position aufwiesen.

In geringem Maße wurde die Struktur auch im Rahmen chemischer Zersetzung unter Inkubationsbedingungen ohne Enzymquelle und Cosubstrat gebildet.

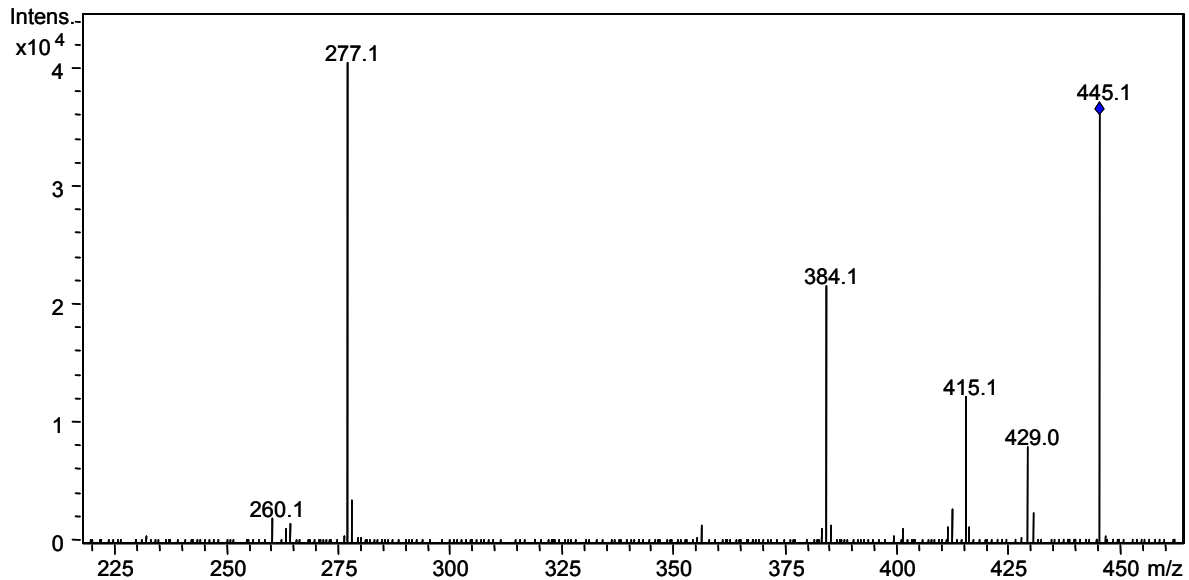
#### 6.3.4.5 Zweifache aromatische Hydroxylierung im Ringgerüst

Bei allen untersuchten Verbindungen traten ebenfalls mehrere Moleküle mit einer zusätzlichen relativen Masse von 32 Th im Vergleich zum Substrat auf. Für BP-7 mit dem Quasimolekülion  $[M+H]^+$  von 413 Th ergaben sich damit Metaboliten mit einem Quasimolekülion von 445 Th. Diese eluierten alle bei deutlich kleineren relativen Retentionszeiten und waren damit polarer als die Muttersubstanz (Abb. 6.19).



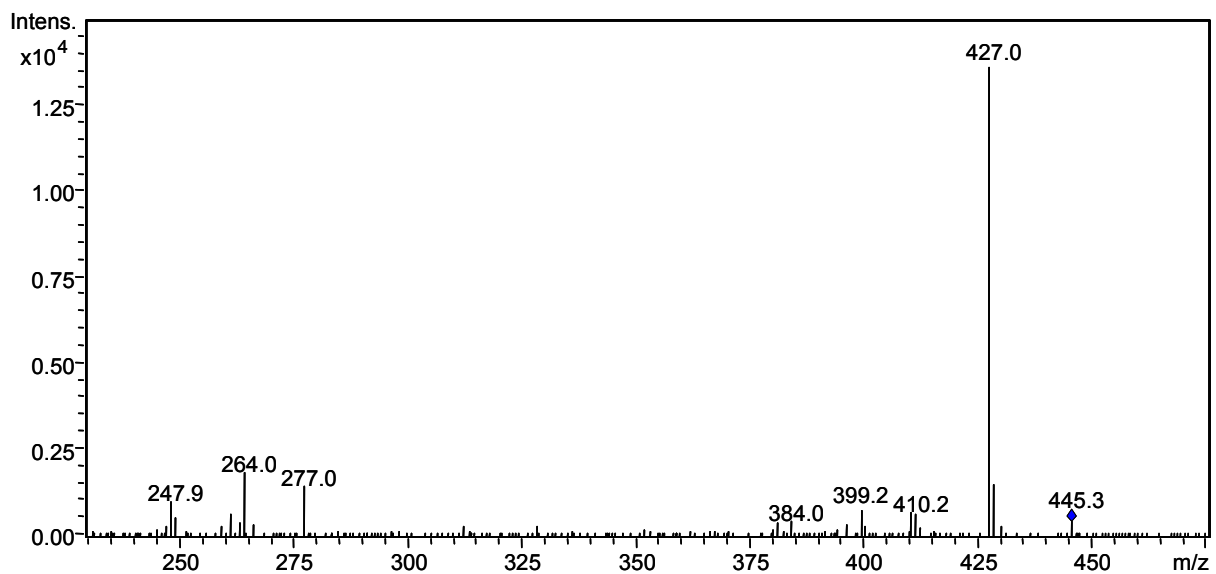
**Abb. 6.19: Repräsentative Ionenchromatogramme eines Inkubationsansatzes von BP-7 mit porcinen Lebermikrosomen. Das Totalionenchromatogramm ist schwarz, das Ionenchromatogramm des Ions 445 grau dargestellt.**

Diese Verbindungen ließen sich in zwei Gruppen einteilen. Die Spektren der einen Gruppe zeigten alle Fragmente des Massenspektrums des Substrats um 32 Th erhöht, unter diesen auch das Fragment für das unsubstituierte Benzo[*c*]phenanthridingerüst bei den Dihydro-Verbindungen. Es konnte daher geschlossen werden, dass es sich um Metaboliten handelte, bei denen im Ringgerüst zwei Sauerstoffatome eingefügt wurden, vermutlich in Form phenolischer Hydroxygruppen (Abb. 6.20). Da diese Verbindungen sehr früh eluiert wurden, ist anzunehmen, dass die Einführung der Sauerstoffatome unabhängig voneinander in verschiedenen Bereichen des Ringgerüsts erfolgte, wodurch die Lipophilie des ganzen Moleküls deutlich abnahm.



**Abb. 6.20: Repräsentatives Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläuferions 445 Th) eines im Grundgerüst zweifach hydroxylierten Metaboliten von BP-7.**

Die andere Gruppe der Metaboliten wies als Charakteristikum die Abspaltung von Wasser auf, Fragmente des Substrats, die um 32 Th erhöht waren, konnten hier kaum beobachtet werden (Abb. 6.21).



**Abb. 6.21: Repräsentatives Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläuferions 445 Th) eines Diol-Metaboliten von BP-7.**

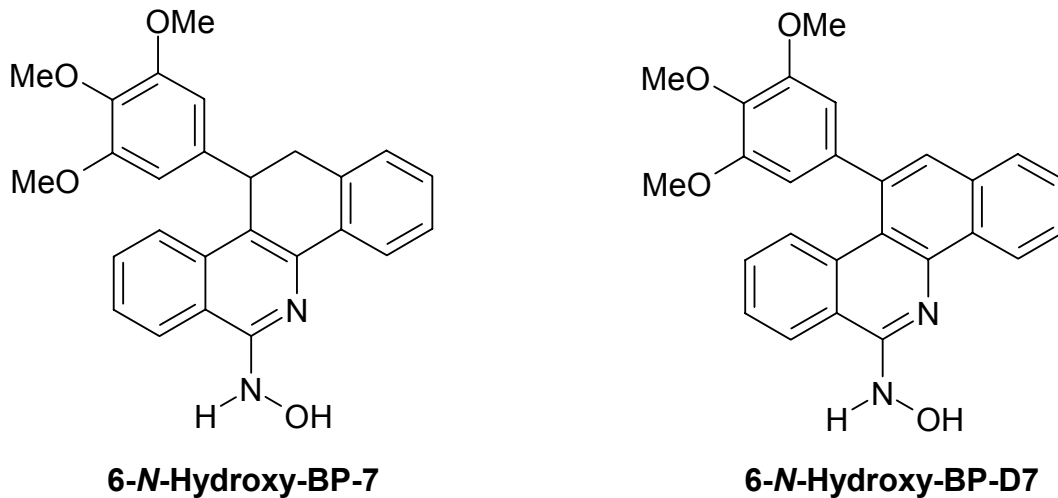
Diese Beobachtung könnte durch die Bildung eines Epoxids mit anschließender Hydrolyse zum Dihydro-Diol und nachfolgender Oxidation erklärt werden. Die Bildung von Dihydro-Diolen ist eine Reaktion, die bereits für Benzo[*c*]phenanthridin durch *Sphingomonas yanoikuyae* B8/36 [Boyd *et al.*, 1999] und Phenanthridin durch Aroclor-induziertes Rattenleberhomogenisat [LaVoie *et al.*, 1985] beschrieben wurde. Die Bildung von Dihydro-Diolen würde allerdings eine zusätzliche Masse von 34 Th bewirken, die aber in keinem der untersuchten Inkubationsansätze detektiert werden konnte. Die Dihydro-Diole von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen stellen typische Substrate für die Dihydro-Diol-Dehydrogenase dar [Klein *et al.*, 1991; Penning, 1993]. Die NADP<sup>+</sup>-abhängige Dihydro-Diol-Dehydrogenase wird zwar als cytosolisches Enzym beschrieben, könnte aber in geringen Mengen auch in den Mikrosomen enthalten sein. Das Enzym wurde sowohl in humanem als auch porcinem Lebermaterial nachgewiesen [Penning *et al.*, 1990; Furster *et al.*, 1989]. Die MS-Spektren der entsprechenden Metaboliten zeigten neben dem Hauptfragment, das durch die Abspaltung von Wasser entsteht, in geringerem Ausmaß ein Fragment mit 277 Th, was der zweifachen Einführung von Sauerstoff in das Benzo[*c*]phenanthridingerüst entspricht. Des Weiteren konnte ein sehr schwaches Fragment mit 259 Th, welches dem metabolisierten Grundgerüst nach Abspaltung von Wasser entspricht, nachgewiesen werden.

In geringerem Ausmaß erfolgte unter Inkubationsbedingungen bereits durch chemische Zersetzung eine Bildung dieser Strukturen in einer wässrigen gepufferten Lösung der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine ohne Zusatz von Enzymquellen oder Cosubstrat.

#### **6.3.4.6 Biotransformation durch Oxidation der 6-Aminofunktion**

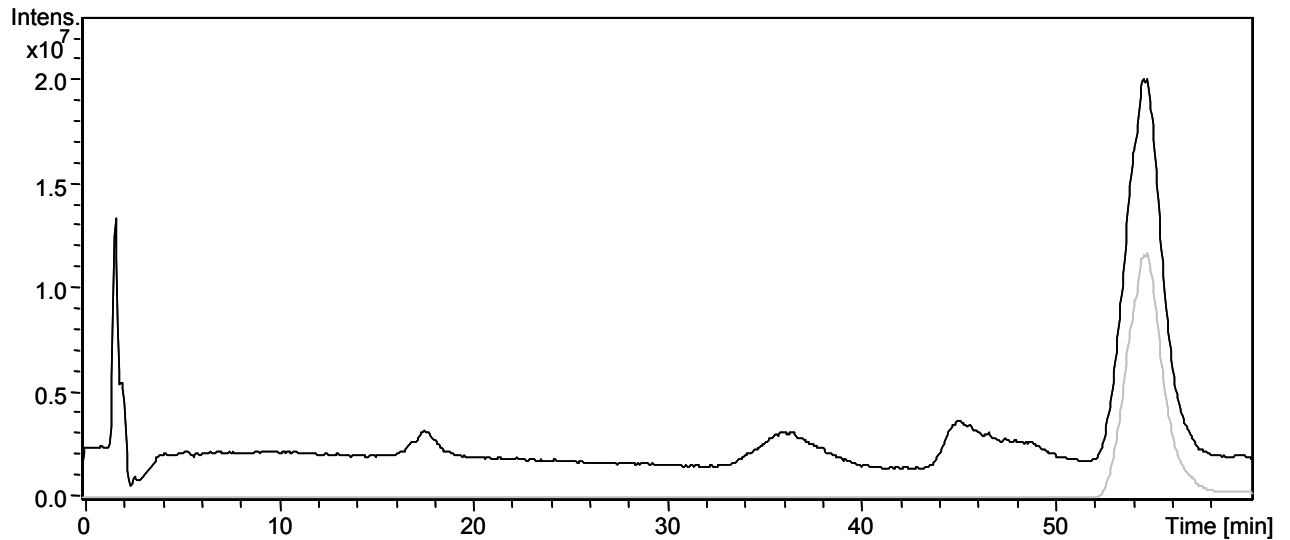
Weitere potentielle Metaboliten stellen die *N*-oxidierten Verbindungen dar. Während die Bildung von *N*-Oxiden meist eine Inaktivierung bedeutet [Testa, 1995 d], und keinen Einfluss auf die Toxizität einer Verbindung hat, ist die Biotoxifizierung durch Bildung von aromatischen Hydroxylaminen häufig der Fall [Frederick *et al.*, 1985; Kadlubar *et al.*, 1992]. Daher wurden die *N*-hydroxylierten Verbindungen von BP-7

und BP-D7 (Abb. 6.22) als Referenzsubstanzen für die LC-MS-Untersuchungen synthetisiert (siehe Kapitel 5).



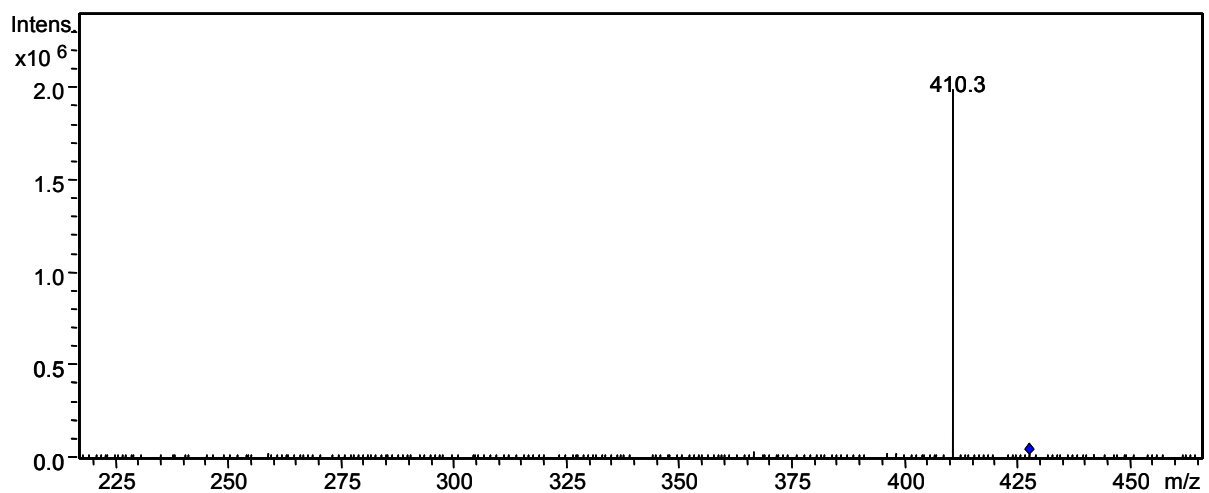
**Abb. 6.22: Strukturformeln der untersuchten Substanzen.**

Da die Basizität der *N*-hydroxylierten Verbindungen durch den  $-I$ -Effekt des eingeführten Sauerstoffatoms deutlich abnahm, erfolgte beim pH-Wert des Fließmittels von pH 3,5 keine Protonierung mehr. Dadurch wurden die Retentionszeiten im Vergleich zu den 6-Amino-Derivaten deutlich verlängert. Durch die Entwicklung entsprechender Gradienten konnte die HPLC-Analytik signifikant verkürzt werden. Das Ergebnis der LC-MS-Analytik für die Referenzsubstanz zeigt Abbildung 6.23.



**Abb. 6.23:** Repräsentative Ionenchromatogramme der Referenzsubstanz von 6-N-Hydroxy-BP-D7. Das Totalionenchromatogramm ist schwarz, das Ionenchromatogramm des Ions 427 grau dargestellt.

Das Massenspektrum ( $MS^2$ ) des Peaks bei 54 min zeigte nahezu ausschließlich die Abspaltung eines Fragments der Masse 17 Th (Abb. 6.24), was der Hydroxygruppe am Stickstoff entspricht (Abb. 6.22).

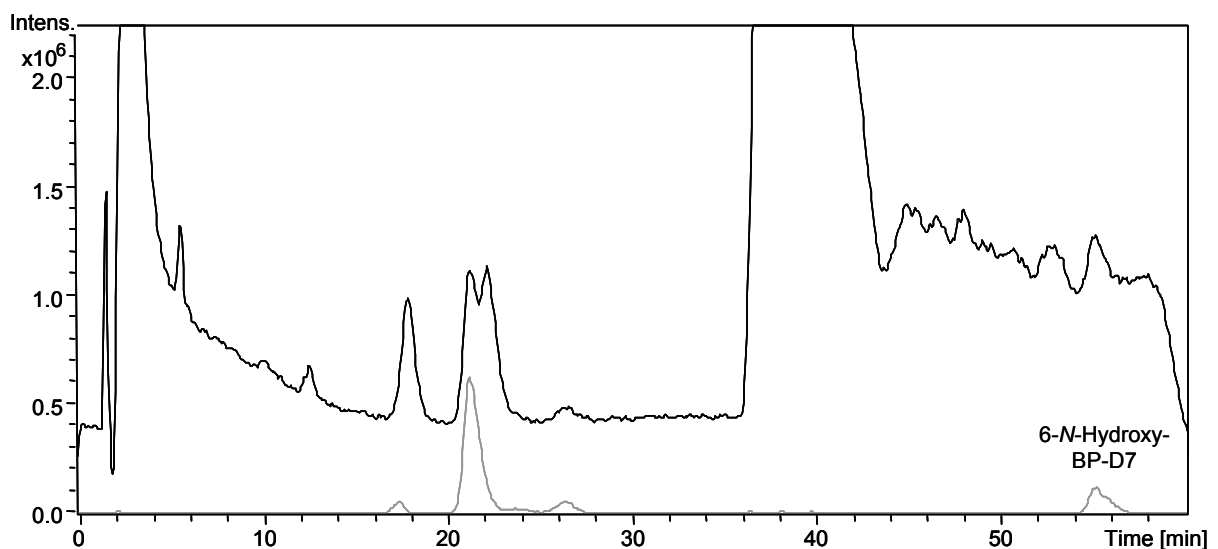


**Abb. 6.24:** Repräsentatives Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläuferions 427 Th) des 6-N-Hydroxy-BP-D7.



Das MS<sup>3</sup>-Spektrum des Tochterions 410 Th zeigt im Wesentlichen das Fragmentierungsmuster des Trimethoxyphenylsubstituenten, wie auch für BP-D7 beobachtet (Abb. 6.10).

Durch Vergleich mit der Referenzsubstanz (Abb. 6.23) konnte einer der monoxygenierten Metaboliten des BP-D7 als 6-*N*-Hydroxy-BP-D7 identifiziert werden. Sowohl bei Inkubation mit humanen als auch mit porcinen Lebermikrosomen wurde das *N*-hydroxylierte Produkt gebildet, allerdings in sehr geringem Ausmaß (Abb. 6.25).

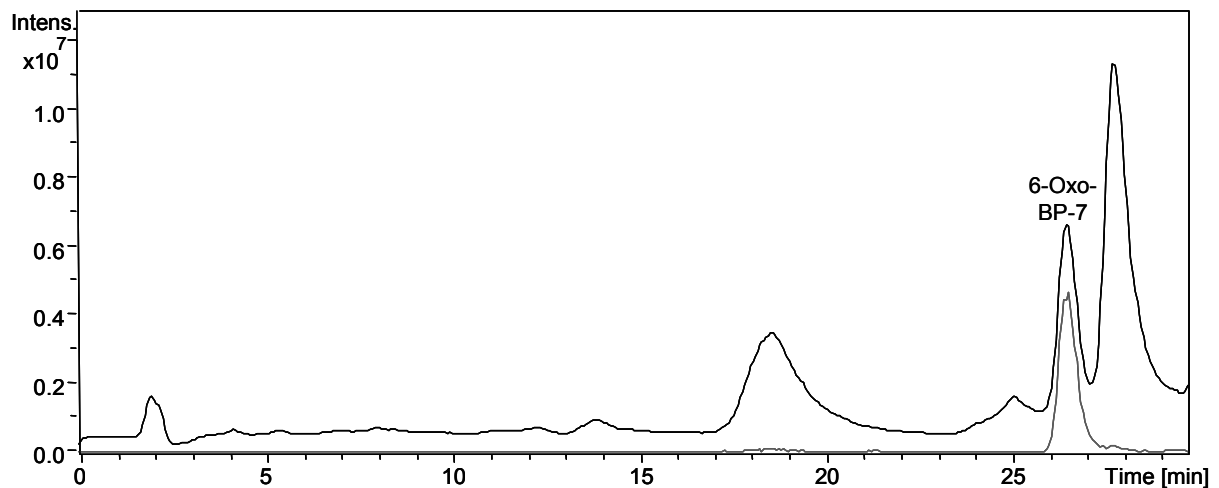


**Abb. 6.25: Repräsentative Ionenchromatogramme eines Inkubationsansatzes von BP-D7 mit humanen Lebermikrosomen. Das Totalionenchromatogramm ist schwarz, das Ionenchromatogramm des Ions 427 grau dargestellt.**

Die Untersuchungen für BP-7 führten zu ähnlichen Ergebnissen. Auch hier konnte mit Hilfe der Referenzsubstanz ein Metabolit als 6-*N*-Hydroxy-BP-7 identifiziert werden. Die Bildungsrate war aber ähnlich niedrig wie bei BP-D7.

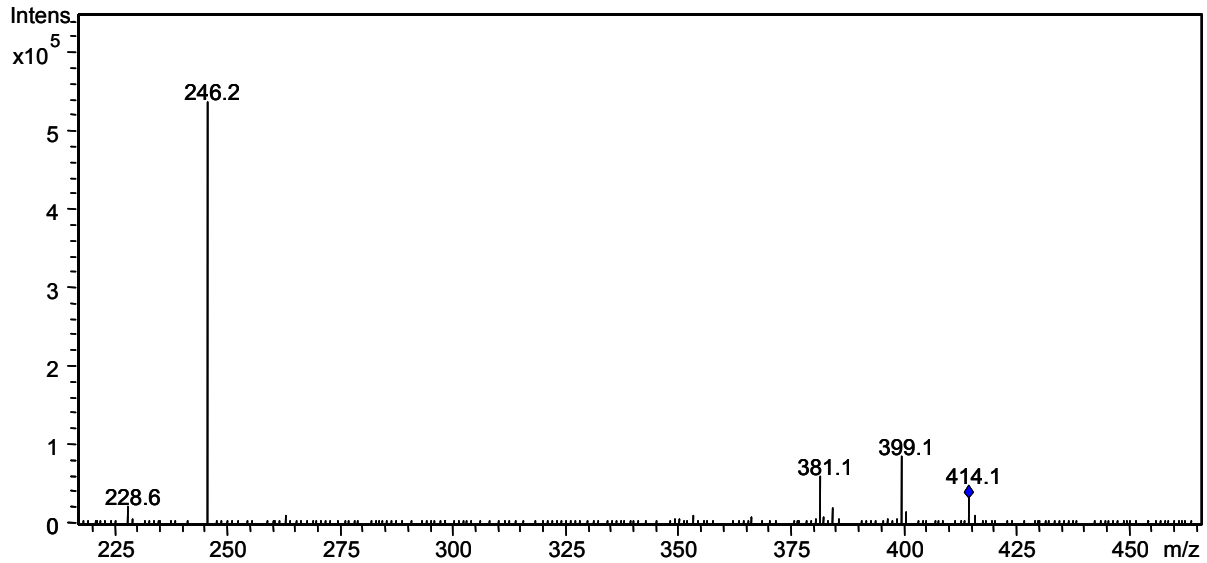
### 6.3.4.7 6-Oxo-Derivate als potentielle Metaboliten

Für Phenanthridin wurde mehrfach die Bildung des im Ames-Test mutagen wirkenden Phenanthridons [Seixas *et al.*, 1982] als Metabolit berichtet [Benson *et al.*, 1983; LaVoie *et al.*, 1985; Tunc *et al.*, 1997]. Die Bildung eines entsprechenden Metaboliten würde bei den untersuchten Verbindungen durch eine oxidative Desaminierung in 6-Position möglich sein. Daher wurden für BP-7 und BP-D7 unter Modifikation einer bestehenden Vorschrift (siehe Kapitel 5) die entsprechenden Verbindungen als Referenzsubstanzen synthetisiert [Wolschendorf, 2000] und durch LC-MS vermessen (Abb. 6.26).



**Abb. 6.26: Repräsentative Ionenchromatogramme der Referenzsubstanz von 6-Oxo-BP-7. Das Totalionenchromatogramm ist schwarz, das Ionenchromatogramm des Ions 414 grau dargestellt.**

Anhand des erhaltenen Massenspektrums der Verbindung (Abb. 6.26) konnte der Versuch unternommen werden, das 6-Oxo-BP-7 in den Inkubationsansätzen mit humanen und porcinen Lebermikrosomen zu detektieren (Abb. 6.27).



**Abb. 6.27: Repräsentatives Massenspektrum ( $MS^2$  des Vorläuferions 414 Th) des 6-Oxo-BP-7.**

Das Ionenchromatogramm der Masse 414 Th wies bei der Retentionszeit des 6-Oxo-BP-7 nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen keinen Peak auf, ebenso wenig wie der Ansatz mit porcinen Lebermikrosomen.

Die gleichen Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen für das vollaromatische Derivat BP-D7. Auch hier war in keinem der Inkubationsansätze das 6-Oxo-BP-D7 nachzuweisen. Es konnte also gezeigt werden, dass die 6-Amino-Funktion keiner Desaminierung unterliegt und damit einen wirksamen Schutz gegen die Bildung des potentiell mutagenen Benzo[*c*]phenanthridons darstellt.

### **6.3.5 Metaboliten nach Inkubation mit rekombinanten humanen CYP450-Isoenzymen**

Der Einsatz von rekombinanten humanen CYP450-Isoenzymen bewirkte keine Bildung von unbekanntem Metaboliten im Vergleich zum Einsatz humaner oder porciner Lebermikrosomen. Sowohl Demethylierungen als auch Hydroxylierungen

konnten immer beobachtet werden, weniger dagegen eine zweifache Hydroxylierung. Alle untersuchten Benzo[*c*]phenanthridine stellten Substrate für die verwendeten CYP450-Isoenzyme 1A2, 2C9, 2D6 und 3A4 dar. Je nach Substitution in 11-Position konnten allerdings Unterschiede im Ausmaß der Umsetzung durch die einzelnen Isoenzyme festgestellt werden. CYP1A2 war zwar an Demethylierungen beteiligt, katalysierte insgesamt aber eher Hydroxylierungen. CYP2D6 war in der Lage alle angebotenen Substrate zu demethylieren, was sich gut mit der Markerreaktivität der Dextromethorphan-O-Desalkylierung in Einklang bringen lässt, katalysierte aber außerdem Hydroxylierungen im Benzo[*c*]phenanthridin-Grundgerüst. Im Vergleich zu den anderen Isoenzymen war die Umsetzung durch CYP2D6 jedoch eher gering. CYP3A4 bildete verschiedene Metaboliten, es erreichte meist die höchsten Umsetzungsraten, was auf die Tatsache zurückgeführt werden kann, das CYP3A4 ein Enzym mit einer großen und variablen Bindungstasche und damit geringer Substratspezifität ist [Shou *et al.*, 1994]. Die Bildung der 6-*N*-Hydroxy-Derivate erfolgte in größerem Maße als durch Mikrosomen, vor allem durch CYP1A2 und CYP3A4. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigen die Tabellen 6.1 und 6.2.

	CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
Demethylierung	+	+/-	++	+
Phenolische Oxygenierung	++	+	+	++
Doppelte Oxygenierung	-	+	+/-	+
<i>N</i> -Hydroxylierung	+	-	-	+
11-Hydroxylierung	+	+/-	+	+
12-Hydroxylierung	++	++	+	++

**Tab. 6.1: Ausmaß der einzelnen Reaktionen durch die verschiedenen CYP450-Isoenzyme.**

	CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
BP-7	++	+	+	++
BP-D7	++	+/-	+	++
BP-11	+	+	+	++

**Tab. 6.2: Ausmaß der Umsetzung der Substrate durch die verschiedenen CYP450-Isoenzyme.**

Die geringe Isoenzympezifität der untersuchten Substanzen ist für die zukünftige Verwendung als Arzneistoffe vorteilhaft, weil auch bei Hemmung eines CYP-Isoenzym alternative Stoffwechselwege existieren sollten, wodurch die Wahrscheinlichkeit von Arzneimittelinteraktionen verringert wird.

### 6.3.6 Einfluss von Superoxiddismutase und Katalase

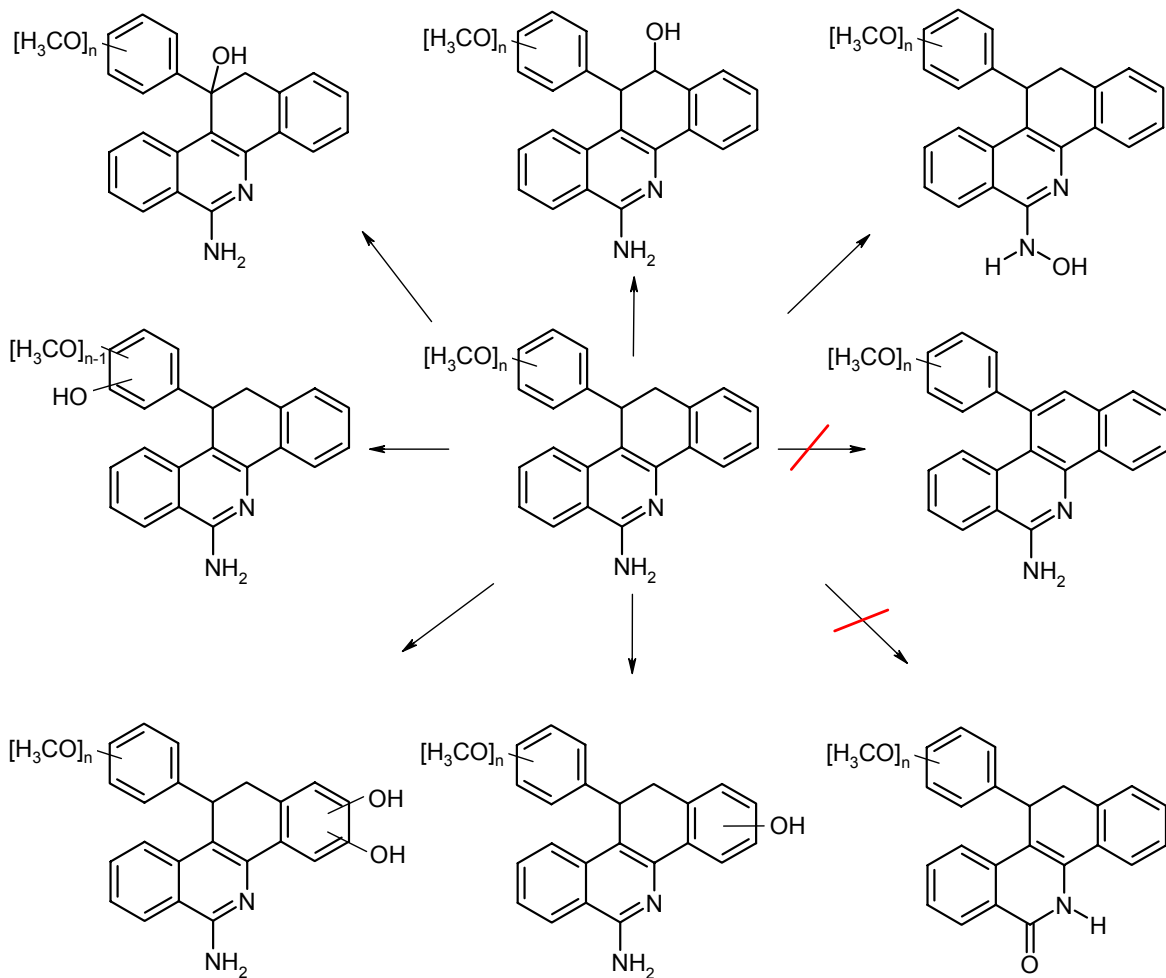
Der Zusatz von Superoxiddismutase (SOD) und Katalase zu den Inkubationsansätzen mit porcinen oder humanen Lebermikrosomen wurde vorgenommen, um zu untersuchen, ob die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine direkte Substrate der CYP450-Enzyme darstellen. Alternativ könnten bei mangelnder Affinität des Substrats zum Enzym durch Entkopplungsmechanismen Superoxidradikale oder Wasserstoffperoxid gebildet werden [Clejan *et* Cederbaum, 1992; Kuthan *et* Ullrich, 1982; Testa, 1995 c], die nachfolgend in einer chemischen Reaktion die beobachteten Metaboliten bilden würden. Falls die Biotransformation der untersuchten Verbindungen über Entkopplungsmechanismen laufen würde, sollte der Zusatz von SOD und Katalase die Entstehung dieser Metaboliten verhindern, da diese Enzyme die reaktiven Sauerstoffspezies zu Wasser und molekularem Sauerstoff umsetzen. Im Rahmen der Untersuchungen konnten aber keine Unterschiede durch den Enzymzusatz im Vergleich zu den Ansätzen die lediglich porcine Lebermikrosomen enthielten, festgestellt werden. Damit stellen die untersuchten Strukturen Substrate der gängigen Phase-I-Enzyme der Biotransformation dar.

### **6.3.7 Präparative LC-MS-Analytik und NMR-Spektroskopie des isolierten Metaboliten von BP-7**

Ziel der Untersuchung war die Isolierung eines der Hauptmetaboliten des BP-7, um durch  $^1\text{H}$ -NMR-Untersuchungen die aus den MS-Spektren erhaltene Struktur zu bestätigen. Durch das beschriebene Verfahren konnte der 12-Hydroxy-Metabolit des BP-7 mit geringen Verunreinigungen durch andere Metaboliten isoliert werden. Es gelang allerdings nicht, die Puffersubstanz des Fließmittels vollständig zu entfernen, so dass ein Teil des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von diesen Signalen überlagert wurde. Die Protonen des aromatischen Bereichs konnten allerdings größtenteils identifiziert werden. Dabei ergaben sich für die Protonen in 7-, 8-, 9- und 10- Position kaum Änderungen der chemischen Verschiebung im Vergleich zum Substrat, bei H1-4 waren deutliche Unterschiede zu sehen, was auf die Metabolisierung in struktureller Nähe zurückgeführt werden kann.

## **6.4 Zusammenfassung und Ausblick**

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine zu vielen verschiedenen Metaboliten umgesetzt werden. Das Ausmaß der Biotransformation war allerdings eher gering, was sich im besten Fall in einer langen Halbwertszeit und damit langen Applikationsintervallen niederschlagen könnte. Eine Zusammenfassung der beobachteten *in vitro*-Biotransformationsreaktionen zeigt Abb. 6.28.



**Abb. 6.28: Metabolismusschema der 6-Amino-11,12-dihydro-11-methoxyphenylbenzo[*c*]phenanthridin-Derivate.**

Es gab nur wenig Unterschiede zwischen den Metaboliten von porcinen und humanen Lebermikrosomen bzw. rekombinanten CYP450-Isoenzymen, womit einmal mehr das Schwein als gutes Modell für den humanen Metabolismus bestätigt wurde. Die Enzymquellen bildeten die gleichen Metaboliten, wenn auch in unterschiedlichen Mengen.

Der Metabolismus der maximal ungesättigten und der 11,12-Dihydroverbindungen war ähnlich. Bei allen untersuchten Verbindungen traten Hydroxylierungen des Ringgerüsts auf, ebenso wie die mehrfache Einführung von Sauerstoffatomen. Die Derivate mit Methoxyphenylsubstituenten unterlagen grundsätzlich Demethylierungen. Bei keiner der untersuchten Substanzen konnte die Bildung des

Benzo[*c*]phenanthridons nachgewiesen werden, so dass die 6-Amino-Funktion einen wirksamen Schutz gegen die Bildung dieser potentiell mutagenen Verbindung darstellt. Das ebenfalls potentiell mutagene 6-*N*-Hydroxyderivat wird nur in sehr geringen Mengen gebildet.

Für die Dihydro-Derivate konnten zwar aliphatische Hydroxylierungen im Rahmen der *in vitro*-Biotransformation beobachtet werden, unter den Inkubationsbedingungen unterliegen diese aber keiner Dehydratisierung, die maximal ungesättigten Derivate werden kaum gebildet. Damit sind die Unterschiede der *in vitro* und *in vivo*-Wirksamkeit nicht auf eine Funktion als Prodrug der dehydrierten Derivate zurückzuführen.

Weitere Untersuchungen zur Biotransformation der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine sollten *in vivo*-Experimente beinhalten, um die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen. Die Tierversuche haben für die Verbindungen besondere Bedeutung, da sie als Zytostatika direkt in die Phase II der klinischen Prüfung gehen würde. Alternativ könnten zunächst Untersuchungen mit Hepatocyten durchgeführt werden, die im Gegensatz zu Mikrosomen auch Phase-II-Biotransformationsreaktionen katalysieren können.



## 7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur präklinischen Entwicklung zytostatisch wirksamer 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine durchgeführt.

Dabei konnten einige wichtige physikochemische Eigenschaften charakterisiert werden. So wurden die Ergebnisse früherer Arbeiten [Kock, 2003; Wolschendorf, 2000] zur Wasserlöslichkeit der untersuchten Substanzen bestätigt. Obwohl die ermittelten Werte je nach dem gewählten Verfahren deutliche Unterschiede aufwiesen, bleibt festzuhalten, dass die Löslichkeit in wässrigen Medien im nano- bzw. unteren mikromolaren Bereich liegt. Eine Modifikation der Struktur mit verbesserter Löslichkeit ist daher das Ziel nachfolgender Arbeiten [zur Nieden, 2005]. Die Untersuchungen zur Bestimmung der Säurestärke ergaben pKa-Werte von 5-6, womit die Verbindungen trotz der zyklischen Amidinstruktur eher schwach basisch sind. Die Substanzen verhalten sich wie andere aminosubstituierte Stickstoffheterozyklen, beispielsweise wurden für 6-Aminobenzo[*a*]- und 6-Aminobenzo[*k*]phenanthridin pKa-Werte = 6,6 bestimmt [Keene *et* Tissington, 1965]. Bei den physiologischerweise im Duodenum, Jejunum und Ileum vorherrschenden pH-Werten würden die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine in ungeladener und damit gut resorbierbarer Form vorliegen. Somit könnte eine orale Applikationsform gewählt werden.

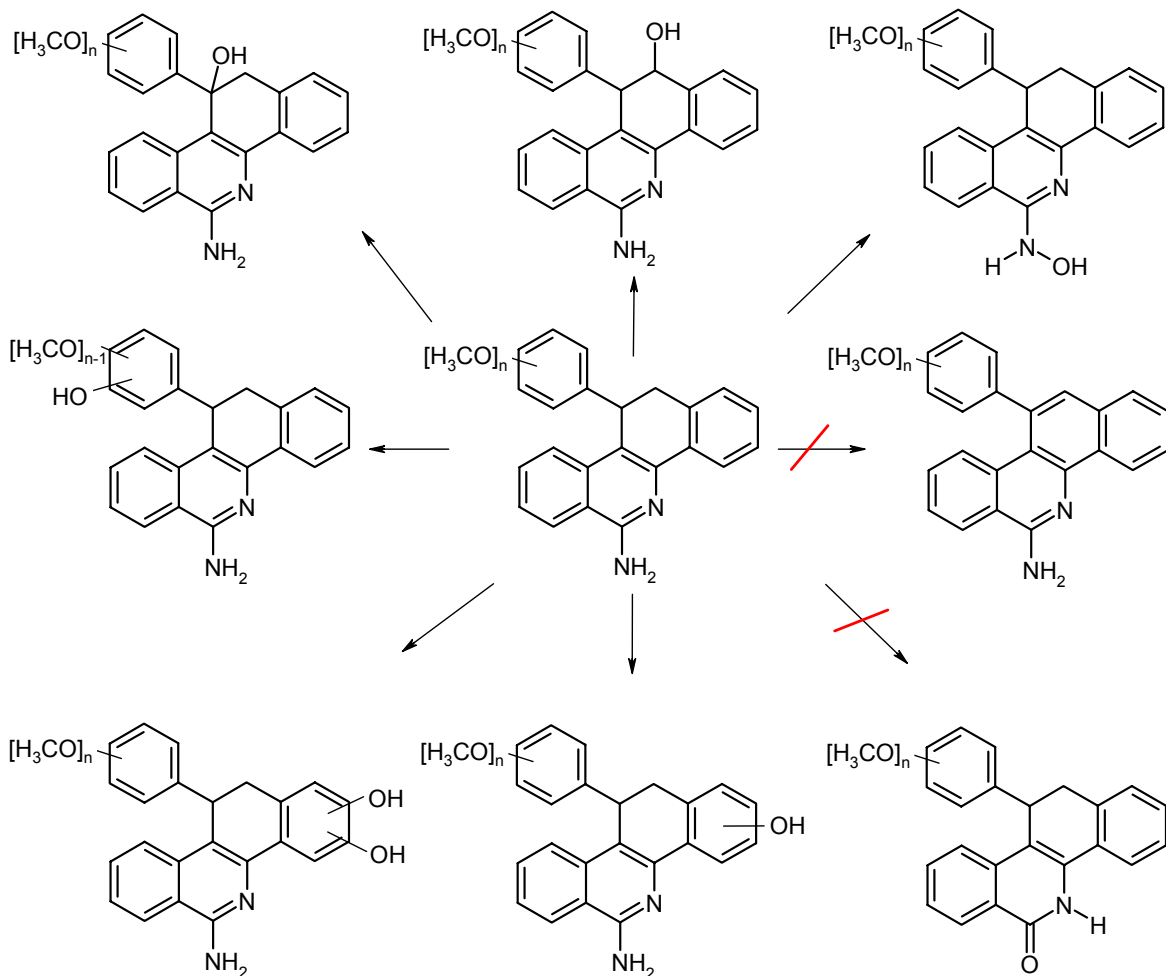
Wie die chemische Struktur erwarten ließ, ergaben die Untersuchungen zur Bestimmung der log D-Werte eine hohe Lipophilie für die untersuchten Verbindungen. Innerhalb gewisser Grenzen wird diese Eigenschaft aber für Arzneistoffe als eher positiv angesehen, da die Fähigkeit zur Membranpermeation mit steigender Lipophilie zunimmt. Bei zu großer Lipophilie wird dieser Effekt allerdings durch eine verringerte Wasserlöslichkeit abgeschwächt. Insgesamt fällt die Beurteilung der Substanzen anhand der „Rule of five“ positiv aus [Lipinski *et al.*, 2001]. Sobald die Probleme der Wasserlöslichkeit gelöst werden konnten, sind daher keine weiteren pharmakokinetischen Probleme, die auf den physikochemischen Eigenschaften beruhen, zu befürchten.

Desweiteren konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine zu vielen verschiedenen Metaboliten umgesetzt werden. Das Ausmaß der Biotransformation war allerdings eher gering, was sich positiv in Form einer langen Halbwertszeit und damit langen Applikationsintervallen bemerkbar machen könnte. Es konnten nur geringe Unterschiede zwischen den Metaboliten von porcinen und humanen Lebermikrosomen bzw. rekombinanten humanen CYP450-Isoenzymen beobachtet werden, womit einmal mehr das Schwein als gutes Modell für den humanen Metabolismus bestätigt wurde. Die Biotransformation durch die Enzymquellen der verschiedenen Spezies lief auf den gleichen Metabolismuswegen ab, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß.

Der Metabolismus der maximal ungesättigten und der 11,12-Dihydroverbindungen war ähnlich. Bei allen untersuchten Verbindungen traten Hydroxylierungen des Ringgerüsts auf, ebenso wie die mehrfache Einführung von Sauerstoffatomen. Die Derivate mit Methoxyphenylsubstituenten unterlagen grundsätzlich Demethylierungen. Bei keiner der untersuchten Substanzen konnte die Bildung des Benzo[*c*]phenanthridons nachgewiesen werden, so dass die 6-Amino-Funktion einen wirksamen Schutz gegen die Bildung dieser potentiell mutagenen Verbindung darstellt. Das ebenfalls potentiell mutagene 6-*N*-Hydroxyderivat wurde nur in sehr geringen Mengen gebildet.

Für die 11,12-Dihydro-Derivate konnten zwar aliphatische Hydroxylierungen im Rahmen der *in vitro*-Biotransformation beobachtet werden, unter den Inkubationsbedingungen unterlagen diese aber keiner Dehydratisierung, die Derivate mit Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 11 und 12 wurden kaum gebildet. Damit sind die Unterschiede der *in vitro* und *in vivo*-Wirksamkeit nicht auf eine Funktion als Prodrug der dehydrierten Derivate zurückzuführen.

Die synthetisch gewonnenen 6-*N*-Hydroxyderivate von BP-7 und BP-D7 konnten durch NMR- und LC-MS-Untersuchungen charakterisiert werden. Eine Reduktion des 6-*N*-Hydroxy-BP-D7 zum BP-D7 konnte weder mit mikrosomalen noch mit mitochondrialen Enzymquellen verschiedener Spezies detektiert werden (Abb. 7.1).



**Abb. 7.1: Metabolismusschema der 6-Amino-11, 12-dihydro-11-methoxyphenyl-benzo[c]-phenanthridin-Derivate.**

Für weitere Untersuchungen zur Biotransformation der 6-Aminobenzo[c]-phenanthridine sollten auf den Ergebnissen dieser Arbeit aufbauend Referenzsubstanzen synthetisiert werden. Damit könnten nicht nur die Ergebnisse der LC-MS-Analytik bestätigt, sondern auch eine Quantifizierung der Bildung der einzelnen Metaboliten durchgeführt werden. Weiterführende Studien könnten *in vivo*-Experimente beinhalten, um die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen und zu erweitern. Tierversuche haben für die Verbindungen besondere Bedeutung, da sie als Zytostatika nicht in der Phase I klinischer Prüfungen an gesunden Probanden eingesetzt werden dürfen, sondern direkt in die Phase II der klinischen Prüfung gehen würden. Zur weiteren *in vitro*-Untersuchung der

Metabolismuswege könnten vorläufig Experimente mit Hepatozyten durchgeführt werden, die im Gegensatz zu Mikrosomen auch Phase-II-Biotransformationsreaktionen katalysieren können.

Die Biotransformationsuntersuchungen ergaben, dass die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine von mehreren Cytochrom P450-Isoenzymen umgesetzt werden können. Daher ist die Gefahr von Arzneistoff-Interaktionen, bei denen ihr Abbau so stark gehemmt wird, dass unerwünschte Wirkungen auftreten, recht gering. Dagegen besteht auf der Basis der Studien zum Interaktionspotential von BP-11 und BP-D7 vor allem bei ersterem eine hohe Wahrscheinlichkeit von Wechselwirkungen mit Substanzen, die durch CYP1A2 und CYP2C9 metabolisiert werden. Eine Hemmung von CYP3A4 wurde für beide Verbindungen festgestellt, diese hat aber nur partiellen Charakter. Für BP-D7 ist das Interaktionspotential in Bezug auf CYP3A4 daher nicht größer als für viele bekannte Arzneistoffe. Eine deutliche Hemmung anderer Isoenzyme konnte nicht beobachtet werden. Eine Beurteilung anhand von *in vitro*-Daten auf der Basis von *in vitro* wirksamen Konzentrationen kann zwar kein Ersatz für weitere Untersuchungen im Rahmen der klinischen Entwicklung nach einer Dosisfindung am Menschen sein, trotzdem liefern die *in vitro*-Tests einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung des Interaktionspotentials und bereiten den Boden für entsprechende *in vivo*-Untersuchungen. Alle bisherigen *in vivo*-Untersuchungen beruhten auf der Verwendung von Mäusen als Modell und eine generelle Übertragung der dort verwendeten Dosen auf den Menschen ist aufgrund der Speziesunterschiede in Pharmakokinetik und Pharmakodynamik nicht ohne weiteres möglich, weswegen die Heranziehung der dort eingesetzten Konzentrationen keine weiterreichenden Erkenntnisse bringen würde.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die angestellten Untersuchungen nahezu durchweg positive Ergebnisse für BP-D7 ergaben, so dass die Entwicklung dieser Substanz vor allem in Bezug auf die Verbesserung der Wasserlöslichkeit weiter verfolgt werden sollte.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

ALBERT, A., SERJEANT, E. P.

The determination of ionization constants, London, New York: Chapman & Hall, 70-95, **1984**.

AMSCHLER, J. Dissertation, Kiel, **2004**.

ANZENBACHER, P., SOUCEK, P., ANZENBACHEROVA, E., GUT, I., HRUBY, K., SVOBODA, Z., KVETINA, J.

Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. Comparison with human liver samples. *Drug Metab Dispos* 26: 56-59, **1998**.

ANZENBACHEROVA, E., ANZENBACHER, P., SVOBODA, Z., ULRICOVA, J., KVETINA, J., ZOULOVA, J., PERLIK, F., MARTINKOVA, J.

Minipig as a model for drug metabolism in man: Comparison of in vitro and in vivo metabolism of propafenone. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 147: 155-159, **2003**.

AUTERHOFF, H., KNABE, J., HÖLTJE, H.-D.

Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie (14. Aufl.), Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 59, **1999**.

AVDEEF, A., BERGER, C. M.

pH-metric solubility. 3. Dissolution titration template method for solubility determination. *Eur J Pharm Sci* 14: 281-291, **2001**.

AVDEEF, A., COMER, J. E. A., THOMSON, S. J.

pH-metric log P. 3. Glass electrode calibration in methanol-water, applied to pKa determination of water-insoluble substances. *Anal Chem* 65: 42-49, **1993**.

BARTOLINI, M., BERTUCCI, C., GOTTI, R., TUMIATTI, V., CAVALLI, A., RECANATINI, M., ANDRISANO, V.

Determination of the dissociation constants (pKa) of basic acetylcholinesterase inhibitors by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 958: 59-67, **2002**.

BEATTIE, D. S.

Enzyme localization in the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 31: 901-907, **1968**.

BECKMANN-KNOPP, S., RIETBROCK, S., WEYHENMEYER, R., BOCKER, R. H., BECKURTS, K. T., LANG, W., FUHR, U.

Inhibitory effects of trospium chloride on cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes. *Pharmacol Toxicol* 85: 299-304, **1999**.

BECKMANN-KNOPP, S., RIETBROCK, S., WEYHENMEYER, R., BOCKER, R. H., BECKURTS, K. T., LANG, W., HUNZ, M., FUHR, U.

Inhibitory effects of silibinin on cytochrome P-450 enzymes in human liver microsomes. *Pharmacol Toxicol* 86: 250-256, **2000**.

BENSON, J. M., ROYER, R. E., GALVIN, J. B., SHIMIZU, R. W.

Metabolism of phenanthridine to phenanthridone by rat lung and liver microsomes after induction with benzo[a]pyrene and arochlor. *Toxicol Appl Pharmacol* 68: 36-42, **1983**.

BERGSTRÖM, C. A., NORINDER, U., LUTTMAN, K., ARTURSSON, P.

Experimental and computational screening models for prediction of aqueous drug solubility. *Pharm Res* 19: 182-188, **2002**.

BERTZ, J., HENTSCHEL, S., HUNSDÖRFER, G., KAATSCH, P., KATALINIC, A., LEHNERT, M., SCHÖN, D., STEGMAIER, C., ZIEGLER, H. Krebs in Deutschland; Häufigkeiten und Trends, Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, **2004**.

BISSWANGER, H.

Enzymkinetik: Theorie und Methoden, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 98-131, **1994**.

BOYD, D. R., SHARMA, N. D., HEMPENSTALL, F., KENNEDY, M. A., MALONE, J. F., ALLEN, C. C. R.

Bis-cis-dihydrodiols: a new class of metabolites resulting from biphenyl dioxygenase-catalyzed sequential asymmetric cis-dihydroxylation of polycyclic arenes and heteroarenes. *J Org Chem* 64: 4005-4011, **1999**.

BROCKMOLLER, J., ROST, K. L., GROSS, D., SCHENKEL, A., ROOTS, I.

Phenotyping of CYP2C19 with enantiospecific HPLC-quantification of R- and S-mephenytoin and comparison with the intron4/exon5 G→A-splice site mutation. *Pharmacogenetics* 5: 80-88, **1995**.

BUSBY, W. F., ACKERMANN, J. M., CRESPI, C. L.

Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of CDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 27: 246-249, **1999**.

CHAURET, N., GAUTHIER, A., NICOLL-GRIFFITH, D. A.

Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 26: 1-4, **1998**.

CLEJAN, L. A., CEDERBAUM, A. I.

Role of cytochrome P450 in the oxidation of glycerol by reconstituted systems and microsomes. *Faseb J* 6: 765-770, **1992**.

CLEMENT, B., CHRISTIANSEN, K., GIRRESER, U.

Phase 2 metabolites of *N*-hydroxylated amidines (amidoximes): synthesis, in vitro formation by pig hepatocytes, and mutagenicity testing. *Chem Res Toxicol* 14: 319-326, **2001**.

CLEMENT, B., DEMESMAEKER, M., LINNE, S.

Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanabenz and reduction of the *N*-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem Res Toxicol* 9: 682-688, **1996**.

CLEMENT, B., WEIDE, M.

Phenanthridinderivate und ihre Herstellung.

Dt. Patentanmeldung (1995), 195 38 088.6-44; PCT/DE 96/01958, Einleitung der nationalen Phasen (weltweit in 36 Staaten) ist erfolgt. Patenterteilung in vielen Ländern ist erfolgt (z. B. USA, 29.02.2000, 6.030.981, Europa 23.04.2003, 0873 315 131), **1995**.

CLEMENT, B., WEIDE, M., WOLSCHEENDORF, U., KOCK, I.

A two-step synthesis of cytostatically active benzo[*c*]phenanthridine derivatives. *Angew Chem Int Ed Engl* 44: 635-638, **2005**.

COON, M. J., DING, X. X., PERNECKY, S. J., VAZ, A. D.

Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb J* 6: 669-673, **1992**.

CPMP (COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS)

Note for guidance on the investigation of drug interactions, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), **1997**.

DALVI, R. R., PEEPLES, A.

In vivo effect of toxic alkaloids on drug metabolism. *J Pharm Pharmacol* 33: 51-53, **1981**.



DEROUSSENT, A., RE, M., HOELLINGER, H., VANQUELEF, E., DUVAL, O., SONNIER, M., CRESTEIL, T.

In vitro metabolism of ethoxidine by human CYP1A1 and rat microsomes: identification of metabolites by high-performance liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry and accurate mass measurements by time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 474-482, **2004**.

DETERS, S., CLEMENT, B.

Characterization of the mitochondrial reductase involved in the activation of *N*-hydroxylated Prodrugs. *Arch Pharm* 333: 12, **2000**.

EASTERBROOK, J., LU, C., SAKAI, Y., LI, A. P.

Effects of organic solvents on the activities of cytochrome p450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 29: 141-144, **2001**.

ETTMAYER, P., AMIDON, G. L., CLEMENT, B., TESTA, B.

Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* 47: 2393-2404, **2004**.

FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION)

Guidance for Industry; Drug Metabolism/Drug Interaction Studies in the Drug Development; Process: Studies *In vitro*, Department of Health and Human Services, **1997**.

FINI, A., DE MARIA, P., GUARNIERI, A., VAROLI, L.

Acidity constants of sparingly water-soluble drugs from potentiometric determinations in aqueous dimethyl sulfoxide. *J Pharm Sci* 76: 48-52, **1987**.

FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W., FÖRSTERMANN, U., STARKE, K.

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, München: Urban & Fischer Verlag, **2001**.

a) S. 27-56

b) S. 949-983

FREDERICK, C. B., HAMMONS, G. J., BELAND, F. A., YAMAZOE, Y., GUENGERICH, F. P., ZENSER, T. V., ZIEGLER, D. M., KADLUBAR, F. F. *N*-Oxidation of primary aromatic amines in relation to chemical carcinogenesis. In: Gorrod, J. W., Damani, L. A. (Eds.) *Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules. Chemistry, Toxicology and Pharmacology*, Chichester: Horwood, **1985**, pp. 131-148.

FURSTER, C., ZHANG, J., TOLL, A.

Purification of a 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase from pig liver microsomes active in major and alternative pathways of bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 271: 20903-20907, **1996**.

GUENGERICH, F. P.

Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* 266: 10019-10022, **1991**.

HARSDORF, A. Dissertation, Kiel, **1998**.

HICKMAN, D., WANG, J. P., WANG, Y., UNADKAT, J. D.

Evaluation of the selectivity of in vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities. *Drug Metab Dispos* 26: 207-215, **1998**.

KADLUBAR, F. F., BUTLER, M. A., KADERLIK, K. R., CHOU, H. C., LANG, N. P.

Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 98: 69-74, **1992**.

KALISZAN, R., HABERA, P., BCZEKA, T., SILUKA, D., VALKO, K.  
Lipophilicity and pKa estimates from gradient high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 965: 117-127, **2002**.

KAUP, H. Dissertation, Kiel, **1996**.

KEENE, B. R. T., TISSINGTON, P.  
Studies in the Phenanthridine Series:Part II. *J Chem Soc* 4426-4429, **1965**.

KHAN, M. N., ARIFIN, Z., A., G., WAHABI, A.  
Basicity of some aliphatic amines in mixed H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN solvents. *Int J Chem Kinet* 32: 146-152, **2000**.

KLEIN, J., SEIDEL, A., FRANK, H., OESCH, F., PLATT, K. L.  
Regiospecific oxidation of polycyclic aromatic dihydrodiols by rat liver dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Biol Interact* 79: 287-303, **1991**.

KLINE, E. S., BRANDT, R. B., LAUX, J. E., SPAINHOUR, S. E., HIGGINS, E. S., ROGERS, K. S., TINSLEY, S. B., WATERS, M. G.  
Localization of L-lactate dehydrogenase in mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 246: 673-680, **1986**.

KOCK, I. Dissertation, Kiel, **2003**.

KOCK, I., HEBER, D., WEIDE, M., WOLSCHENDORF, U., CLEMENT, B.  
Synthesis and biological evaluation of 11-substituted 6-aminobenzo[c]phenanthridine derivatives, a new class of antitumor agents. *J Med Chem* 48: 2772-2777, **2005**.

KOJDA, G.  
Pharmakologie/Toxikologie systematisch (1. Aufl. Edition): UNI-MED Verlag AG, Bremen, Lorch/Württemberg, 873-899, **1997**.

KRASS, J. D., JASTORFF, B., GENIESER, H.-G.

Determination of lipophilicity by gradient elution high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* 69: 2575-2581, **1997**.

KUTHAN, H., ULLRICH, V.

Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur J Biochem* 126: 583-588, **1982**.

LAVOIE, E. J., ADAMS, E. A., SHIGEMATSU, A., HOFFMANN, D.

Metabolites of phenanthridine formed by rat liver homogenate. *Drug Metab Dispos* 13: 71-75, **1985**.

LEWIS, D. F.

Human cytochromes P450 associated with the phase 1 metabolism of drugs and other xenobiotics: a compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families. *Curr Med Chem* 10: 1955-1972, **2003**.

LIN, J. H., LU, A. Y.

Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 49: 403-449, **1997**.

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J.

Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 3-26, **2001**.

LIPPER, R. A.

E pluribus product. *Mod Drug Dis* 2: 55-60, **1999**.

LIU, H., SANTOSTEFANO, M., SAFE, S.

2-Phenylphenanthridinone and related compounds: aryl hydrocarbon receptor agonists and suicide inactivators of P4501A1. *Arch Biochem Biophys* 313: 206-214, **1994**.

MANDERSCHIED, M., EICHINGER, T.

Determination of pKa values by liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 41: 323-326, **2003**.

MUTSCHLER, E., GEISSLINGER, G., KROEMER, H., SCHÄFER-KORTING, M.

Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, **2001**.

a) 23-37

b) 873-907

NELSON, D. R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., STEGEMAN, J. J., FEYEREISEN, R., WAXMAN, D. J., WATERMAN, M. R., GOTOH, O., COON, M. J., ESTABROOK, R. W., GUNSALUS, I. C., NEBERT, D. W.

P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42, **1996**.

OMURA, T., SATO, R.

The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2378, **1964**.

PEEPLES, A., DALVI, R. R.

Toxic alkaloids and their interaction with microsomal cytochrome P-450 in vitro. *J Appl Toxicol* 2: 300-302, **1982**.

PENNING, T. M.

Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chem Biol Interact* 89: 1-34, **1993**.

PENNING, T. M., SHARP, R. B.

Characterization of dihydrodiol dehydrogenase in human liver and lung. *Carcinogenesis* 11: 1203-1208, **1990**.

PETER, R., BOCKER, R., BEAUNE, P. H., IWASAKI, M., GUENGERICH, F. P., YANG, C. S.

Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem Res Toxicol* 3: 566-573, **1990**.

PRENTIS, R. A., LIS, Y., WALKER, S. R.

Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *Br J Clin Pharmacol* 25: 387-396, **1988**.

RELLING, M. V., AOYAMA, T., GONZALEZ, F. J., MEYER, U. A.

Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 442-447, **1990**.

RUCKPAUL, K.

Cytochrom P450 abhängige Enzyme- Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung?. *Pharm Unserer Zeit* 22: 296-304, **1993**.

SEIXAS, G. M., ANDON, B. M., HOLLINGSHEAD, P. G., THILLY, W. G.

The aza-arenes as mutagens for *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 102: 201-212, **1982**.

SHOU, M., GROGAN, J., MANCEWICZ, J. A., KRAUSZ, K. W., GONZALEZ, F. J., GELBOIN, H. V., KORZEKWA, K. R.

Activation of CYP3A4: evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site. *Biochemistry* 33: 6450-5, **1994**.

SIEBE, J. Dissertation, Kiel, **1998**.

SIMEON, S., RIOS, J. L., VILLAR, A.

Pharmakological activities of benzophenanthridine and phenanthrene alkaloids.

*Pharmazie* 44: 593-597, **1989**.

SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J., KLENK, D. C.

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, **1985**.

STEUDEL, R., SCHENK, P. W.

Hydroxylamin. In: Handbuch der präparativen anorganischen Chemie, Brauer G. (Hrsg.), Stuttgart: Ferdinand Enke, **1975**.

TAM, K. Y., TAKÁCS-NOVÁK, K.

Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study. *Anal Chim Acta* 434: 157-167, **2001**.

TESTA, B.

Biochemistry of Redox Reactions, London: Academic Press Limited, **1995**.

- a) 1-40
- b) 62-64
- c) 71-121
- d) 164-202

TUNC, N., YILMAZ, F., ULGEN, M., GORROD, J. W.

In vitro metabolic *N*- and *C*-oxidation of phenanthridine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 22: 345-349, **1997**.

WANG, R. W., NEWTON, D. J., LIU, N., ATKINS, W. M., LU, A. Y.

Human cytochrome P-450 3A4: in vitro drug-drug interaction patterns are substrate-dependent. *Drug Metab Dispos* 28: 360-366, **2000**.

WANG, R. W., NEWTON, D. J., SCHERI, T. D., LU, A. Y.

Human cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6 beta-hydroxylation and erythromycin *N*-demethylation. Competition during catalysis. *Drug Metab Dispos* 25: 502-507, **1997**.

WOLSCHEENDORF, U. Dissertation, Kiel, **2000**.

WRIGHTON, S. A., STEVENS, J. C., BECKER, G. W., VANDENBRANDEN, M.

Isolation and characterization of human liver cytochrome P450 2C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* 306: 240-245, **1993**.

ZUR NIEDEN, D. Dissertation in Vorbereitung, Kiel, **2005**.



Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.**

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas und die diesbezügliche Diskussionsbereitschaft sowie für die mir stets erwiesene Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater herzlich bedanken.

Anja B., Dana, Ulli G. und Karsten gilt mein herzlicher Dank für das zügige und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit und die daraus resultierenden Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Ulli G. für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft rund um die LC-MS. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. P. Rösner für die wertvollen Anregungen bei der Interpretation der MS-Spektren.

Für die Beantwortung enzymkinetischer Fragen und die damit verbundenen Diskussionen möchte ich mich bei Thomas bedanken.

Bei der Firma Aventis bedanke ich mich für die Bestimmung von Vergleichswerten im Bereich der physikochemischen Charakterisierung.

Bei Dana möchte ich mich für die Hilfe bei der Synthese der 6-*N*-Hydroxy-Derivate bedanken und bei Ilka für die generelle Einführung in die Synthese der 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine. Prof. Heber, Ulli und Martin danke ich für die wertvollen Anregungen bezüglich der Synthese. Ebenso danke ich Melissa und Maren für ihre Hilfe bei der Durchführung synthetischer Arbeiten. Bei Sven möchte ich mich für die Einführung in die HPLC, seine schnelle Hilfe bei technischen Problemen und für die Unterstützung bei den Messungen zum Interaktionspotential bedanken. Meike gilt mein Dank für die Hilfe bei der photometrische Bestimmung der pKa-Werte. Inga C. und Susan danke ich für die Einführung in die Lipophilie-Bestimmung sowie Antje und Juliane für die Bereitstellung von Enzympräparationen.

Für die nette Zusammenarbeit bei der Betreuung des 1. und 2. Semesters bedanke ich mich bei Andy, Antje, Ilka, Inga C., Jacek, Jens, Joscha, Juliane, Robert, Sabine und Sanja.

## Danksagung

---

Weiterhin danke ich den Professoren, Mitarbeitern und Kollegen des Pharmazeutischen Instituts, insbesondere denen meines Arbeitskreises, für die gute Arbeitsatmosphäre.

Meinen Freunden außerhalb der Uni, vor allem den Aikidoka vom PSV und meinen „Jungs“ vom Elrond danke ich für viele schöne Stunden, in denen ich Kraft und Motivation für diese Arbeit schöpfen konnte. Lilli gilt mein Dank für unsere Freundschaft, die auch die räumliche Trennung überlebt hat.

Bei Karsten möchte ich mich dafür bedanken, dass er für mich da ist, mir gerade in den schwierigen Phasen dieser Arbeit den Rücken gestärkt und mich bei allen Problemen unterstützt hat.

Meinen Eltern, Ute, Sarwar, Ursula, meinem Bruder und meiner gesamten Familie möchte ich für die Unterstützung in den letzten Jahren danken. Ich bin froh, dass ich euch alle habe.

---

## Persönliche Daten

Vor- und Familienname	Inga Zebothsen
Geburtstag	18. September 1976
Geburtsort	Lübeck
Staatsangehörigkeit	Deutsch

## Schulbildung

1982 - 1986	Kahlhorstschule, Grund- und Hauptschule Lübeck
1986 – 1995	Johanneum zu Lübeck, Städtisches Gymnasium
Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife

## Studium und Ausbildung

1995 - 1996	Studium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1996 – 2000	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
April 1998	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar – Dezember 1999	Wissenschaftliche Hilfskraft im Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Mai 2000	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juni – Dezember 2000	Pharmaziepraktikum in der Lornsen-Apotheke, Kiel
Januar – Juni 2001	Pharmaziepraktikum Zentralinstitut Arzneimittelforschung, Sinzig
Juli 2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung Approbation als Apothekerin

## Berufliche Tätigkeit und Weiterbildung

seit August 2001	Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. B. Clement
01.08.2001 – 31.12.2002	Wissenschaftliche Angestellte der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
01.01.2003 – 31.12.2004	Stipendium zur Förderung des künstlerischen und wissenschaftlichen Nachwuchses des Landes Schleswig-Holstein
01.01.2005 – 31.07.2005	Wissenschaftliche Angestellte der Firma Pharmatech GmbH, Flintbek
seit 20.01.2005	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik



Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, im Mai 2005

Inga Zebothsen



Neue Arzneistoffkandidaten müssen neben der Prüfung auf Wirksamkeit umfangreichen Tests zur Erhöhung der Arzneimittelsicherheit und der Optimierung der Applikation unterzogen werden. In dieser Arbeit wurde daher ein Beitrag zur präklinischen Entwicklung zytostatisch wirksamer 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine durch Untersuchungen zur physikochemischen Charakterisierung, dem Metabolismus und des Interaktionspotentials geleistet. Im Rahmen der physikochemischen Charakterisierung wurden Löslichkeit in wässrigen Medien, Lipophilie und pKa-Werte bestimmt. Dabei wiesen die Ergebnisse nach Beurteilung entsprechend der „Rule of five“ günstige Eigenschaften auf, so dass eine gute orale Bioverfügbarkeit anzunehmen ist. Eine Verbesserung der Löslichkeit wäre allerdings sowohl für eine spätere Applikation als auch für weitere Testungen wünschenswert. Die getesteten Verbindungen werden durch humane und porcine Lebermikrosomen sowie humane rekombinant hergestellte CYP450-Isoenzyme zu einer Vielzahl von Metaboliten umgesetzt, die durch LC-MS-Methoden identifiziert wurden. Die Umsetzungen werden durch mehrere CYP450-Isoenzyme katalysiert, eine besonders hohe Beteiligung konnte für CYP3A4 gezeigt werden. Untersuchungen zum Interaktionspotential ausgewählter Verbindungen ergaben für BP-11 ein hohes Risiko für Wechselwirkungen mit den CYP450-Isoenzymen CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4. Die *in vitro* sowie *in vivo* am besten wirksame Substanz BP-D7 wies dagegen lediglich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Wechselwirkungen mit Stoffen, die ebenfalls durch CYP3A4 metabolisiert werden, auf.





Besides assays for the evaluation of efficacy new drug candidates have to undergo extensive testings for enhancement of pharmaceutical drug safety and optimization of application. The objective of the present work was to contribute to the preclinical development of cytostatically active 6-aminobenzo[*c*]phenanthridines through studies on the physico-chemical characterization, the metabolism and the drug-drug interaction potential. In the context of the physico-chemical characterization solubility in aqueous media, lipophilicity, and pKa values were determined. According to the "rule of five" the results showed favourable characteristics indicating a good oral availability. Nevertheless an improvement of aqueous solubility is desirable for later application as well as for further testings. The examined compounds were transformed into a variety of metabolites by human and porcine liver microsomes as well as by human recombinant CYP450-isoenzymes. Metabolites were identified by LC-MS. Several isoenzymes were involved in the metabolism, with CYP3A4 playing a major role. Studies on the drug-drug interaction potential of selected derivatives showed a high risk for BP-11 for interactions with the cytochrom P450- isoenzymes CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4. BP-D7, with the highest efficacy in *in vitro* and *in vivo* assays showed only a slightly increased probability for interactions with drugs, also metabolized by CYP3A4.

